

Biophysikalische und strukturebiologische
Charakterisierung des ABC-Transporters

OpuA aus *Bacillus subtilis*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich

Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von

Carsten Horn

aus Frankfurt am Main

Frankfurt, 2004

(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

1. Gutachter: Dr. L. Schmitt

2. Gutachter: Prof. Dr. C. Glaubitz

Datum der Disputation:

*Welch ein Glück ist mir eröffnet! Mir schwindelt der Kopf vor Freude.
Ich gehe ab von der spanischen Fregatte „Pizarro“. Wir landen auf den Kanaren und an
der Küste von Caracas in Südamerika.....Von dort aus mehr.
Der Mensch muss das Gute und Große wollen!*

Alexander von Humboldt (1769 – 1859) am 4. Juni 1799 aus Coruña an Freiesleben

Aus: „Die Reise nach Südamerika“

für meine Familie

~

para mi familia

Zusammenfassung

Die Familie der ubiquitären ATP binding cassette (ABC)-Membranproteine katalysiert unter Hydrolyse von ATP die Translokation von Substraten über biologische Membranen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Struktur und Funktion des osmoprotectant uptake (Opu) Systems A aus *B. subtilis* untersucht, das aus drei Untereinheiten, der ATPase OpuAA, dem integralen Membranprotein OpuAB und dem Substrat-Bindeprotein OpuAC, besteht und unter hyperosmolaren Bedingungen die kompatiblen Solute Glycin-Betain (GB) und Prolin-Betain (PB) in die Zelle importiert, um eine Plasmolyse zu verhindern. Sämtliche Untereinheiten wurden getrennt oder als OpuAA/AB Komplex in *E. coli* überproduziert und bis zur Homogenität isoliert. OpuAA zeigte ein dynamisches Monomer-Dimer Gleichgewicht ($K_D = 6 \mu\text{M}$), das durch Nukleotide beeinflusst wurde. Unter Bedingungen hoher Ionenstärke konnten Monomer und Dimer getrennt isoliert und analysiert werden. Die Affinitäten und Stöchiometrien der OpuAA/Nukleotid Komplexe wurden unter Verwendung des fluoreszierenden TNP-ATP bzw. einer Nukleotid-sensitiven Trp-Mutante des OpuAA untersucht. Das Monomer hatte ein Molekül TNP-ATP gebunden, während zwei Moleküle TNP-ATP in dimerem OpuAA detektiert wurden. Die Affinität von Nukleotiden zu OpuAA nahm in folgender Reihe zu: $\text{ATP} < \text{ATP/Mg}^{2+} < \text{ADP/Mg}^{2+}$. Eine Erhöhung der Ionenstärke bewirkte nicht nur eine Erniedrigung der K_D -Werte von OpuAA/Nukleotid Komplexen, sondern auch eine Steigerung der ATPase Aktivität. In 1 M NaCl zeigte das Monomer basale ATPase Aktivität, während das Dimer nur sehr geringe Aktivität hatte, jedoch durch Zugabe von OpuAB und OpuAC aktiviert wurde. K^+ wurde als ein Modulator der ATPase Aktivität von OpuAA identifiziert. Die Zugabe von TNP-ADP/ Mg^{2+} induzierte in dimeren OpuAA einen konformellen Wechsel, der zu einem Zerfall des Dimers führte. Monomer und Dimer hatten gegenüber Nukleotiden unterschiedliche Affinitäten, was eine unterschiedliche Architektur der Nukleotid-Bindetasche implizierte. Die Architektur des OpuAA Dimers wurde mittels FRET untersucht. Dazu wurde OpuAA ortsspezifisch mit Fluorophoren markiert und ein Verfahren etabliert, in dem die intermolekularen Distanzen des Dimers bestimmt werden konnten. Ein Vergleich der Distanzen mit anderen NBD Dimeren zeigte, dass OpuAA eine zu BtuD oder MalK_{E. coli} vergleichbare Dimer Architektur mit einer *head-to-tail* Orientierung hat. Die Struktur des OpuAC/GB und OpuAC/PB Komplexes wurde durch Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2,7 Å bzw. 2,8 Å aufgeklärt und zeigte zwei globuläre Domänen, die über zwei Peptidsegmente miteinander verbunden waren. Die delokalisierte positive Ladung des Liganden war von einem *cluster* aus drei Trp-Resten, dem sog. „Tryptophan-Prisma“, über kationische- π -Interaktion komplexiert. Nach Ligandenbindung wurden beide Domänen durch eine Wasserstoffbrücke zwischen den konservierten Asp22 und Trp178 überbrückt. Dieser molekulare Schalter wurde von OpuAC genutzt, um Affinitäten von GB und PB zu regulieren.

Summary

The family of the ubiquitous ATP binding cassette (ABC) membrane proteins catalyzes the translocation of substrates across biological membranes under the hydrolysis of ATP. In the present work the structure and function of the osmoprotectant uptake (Opu) system A from *B. subtilis* was investigated. OpuA is composed of three subunits: the ATPase OpuAA, the integral membrane protein OpuAB and the extracellular substrate-binding protein OpuAC. Under hyperosmotic growth conditions OpuA imports the compatible solutes glycine betaine (GB) and proline betaine (PB) into the cell to prevent plasmolysis. All three subunits were overproduced in *E. coli* as separate proteins or as OpuAA/AB complex and purified to homogeneity. OpuAA revealed a dynamic monomer-dimer equilibrium ($K_D = 6 \mu\text{M}$) that was influenced by nucleotides indicating a coupling between oligomeric and functional state. Under conditions of high ionic strength both monomer and dimer could be isolated and analyzed separately. The affinities and stoichiometries of OpuAA/nucleotide complexes were determined by means of the fluorescent TNP-ATP or a nucleotide-sensitive Trp-mutant of OpuAA. The monomer bound one molecule TNP-ATP while two molecules TNP-ATP were associated with the dimer. The affinity of nucleotides to OpuAA increased in the following order: $\text{ATP} < \text{ATP}/\text{Mg}^{2+} < \text{ADP}/\text{Mg}^{2+}$. Increased ionic strength decreased the K_D values of OpuAA/nucleotide complexes and increased ATPase activity. In the presence of 1 M NaCl, monomeric OpuAA showed a basal ATPase activity, whereas the dimer showed little ATPase activity that could however be stimulated by OpuAB and OpuAC. K^+ was identified as a modulator of the ATPase activity. The addition of TNP-ADP/ Mg^{2+} induced a conformational change in dimeric OpuAA that led to a decay of the dimer. Monomer and dimer had different affinities for nucleotides suggesting a different architecture of the nucleotide-binding pocket. The architecture of the OpuAA dimer was investigated by FRET. For that purpose, the catalytic or regulatory domain of OpuAA was labeled with fluorophores and a method was established to determine intermolecular distances. A comparison with distances of related dimeric ATPases indicated that OpuAA assembled with a dimer-interface similar to BtuCD or MalK_{*E. coli*} in a head-to-tail orientation. The structure of OpuAC/GB and OpuAC/PB was solved by X-ray crystallography at a resolution of 2.7 Å and 2.8 Å, respectively. The complex showed two globular domains that were connected by two peptide segments and the ligand was localized in a cleft between the two domains. The delocalized positive charge of the ligand was coordinated by cationic- π -interactions in a cluster of three Trp residues, the so-called „tryptophane-prism“. After ligand binding both domains were bridged by a hydrogen bond between the conserved Asp22 and Trp178. This molecular switch was used by OpuAC to regulate affinities of GB and PB, respectively.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Osmoadaption bei Mikroorganismen	2
1.1.1	Regulation der Osmoadaption.....	2
1.1.2	Aufnahmesysteme von kompatiblen Soluten bei <i>B. subtilis</i>	4
1.2	ATP <i>binding cassette</i> (ABC)-Transporter	5
1.2.1	Molekularer Aufbau von ABC-Transportern	7
1.2.2	Struktur und Funktion von ABC-Transportern	10
1.3	OpuA – ein osmoreaktiver ABC-Transporter aus <i>B. subtilis</i>	14
1.4	Motivation und Aufgabenstellung.....	15
2	Materialien und Methoden.....	17
2.1	Materialien	17
2.1.1	Biologische Materialien, Plasmide und Oligodesoxynukleotide	17
2.1.2	Enzyme und sonstige Proteine.....	18
2.1.3	Chemikalien, Standards und Kits	19
2.1.4	Geräte und Verbrauchsmaterial	21
2.1.5	Puffer, Medien und Stammlösungen	23
2.2	Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> Stämmen.....	25
2.2.2	Isolierung von DNA aus <i>E. coli</i>	25
2.2.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid DNA	26
2.2.4	Gelelektrophorese, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA	27
2.2.5	Enzymatische Modifizierung von DNA.....	28
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion.....	28
2.2.7	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	29
2.3	Gentechnische Methoden.....	30
2.3.1	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	30
2.3.1.1	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> Kulturen in LB-Medium.....	30

2.3.1.2	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> Kulturen in Minimalmedium	31
2.3.1.3	Isolierung der zytosolischen Proteinfraktion aus <i>E. coli</i>	31
2.3.1.4	Isolierung der Membran-assoziierten Proteinfraktion aus <i>E. coli</i>	32
2.3.1.5	Isolierung des Gesamtzellproteins aus <i>E. coli</i>	32
2.4	Proteinchemische Methoden	33
2.4.1	Chromatographische Methoden	33
2.4.1.1	Streptavidin-Affinitätschromatographie	33
2.4.1.2	Amylose-Affinitätschromatographie	34
2.4.1.3	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie.....	35
2.4.1.4	Gelpermeationschromatographie.....	35
2.4.1.5	Analyse des Monomer-Dimer Verhältnisses von OpuAA.....	36
2.4.1.6	Ionenaustauschchromatographie.....	37
2.4.1.6.1	Isolierung von OpuAC aus dem Faktor Xa Proteolyseansatz.....	38
2.4.1.6.2	Isolierung des Fluorophor-markierten OpuAA.....	38
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration und Konzentrierung von Proteinen	40
2.4.4	Markierung von OpuAA Cystein-Mutanten mit Maleinimid-Farbstoffen.....	41
2.5	Immunchemische Methoden.....	42
2.5.1	Western Blotting	42
2.6	Enzymkinetische Methoden.....	43
2.6.1	ATPase Aktivitäts-Test.....	43
2.7	Spektroskopische Methoden	45
2.7.1	Bindungsstudien mit TNP-ATP.....	45
2.7.1.1	Titration von OpuAA mit TNP-ATP.....	45
2.7.1.2	Kompetitive Bindungsstudien.....	47
2.7.2	Zeitlicher Verlauf der TNP-ADP Fluoreszenz.....	48
2.7.3	Bindungsstudien durch Messung der intrinsischen Trp-Fluoreszenz	49
2.7.3.1	Bindungsaffinitäten von kompatiblen Soluten an OpuAC.....	49
2.7.3.2	Bindungsaffinität von Nukleotiden an OpuAA F19W.....	50

2.7.4	FRET-Untersuchungen	51
2.8	Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse	52
2.8.1	Proteinkristallisation	52
2.8.2	Phasenbestimmung durch mehrfache anormale Dispersion	53
2.9	Verwendete Computerprogramme und Datenbanken	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Molekularbiologische Ergebnisse	56
3.1.1	Konstruktion von Expressionsplasmiden zur bakteriellen Produktion von OpuAA und OpuAB mit Affinitätspeptiden.....	56
3.1.2	Ortsgerichtete Mutagenese des <i>opuAA</i> Gens.....	59
3.2	Produktion und Isolierung der Komponenten des OpuA-Transporters	61
3.2.1	Bakterielle Produktion und Isolierung des rekombinanten OpuAA.....	61
3.2.2	Bakterielle Produktion und Reinigung von OpuAB	65
3.2.3	Bakterielle Produktion und Reinigung von OpuAC.....	70
3.2.4	Bakterielle Produktion und Reinigung von OpuAA/AB	72
3.3	Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad von OpuAA.....	76
3.3.1	Einfluss von Salz auf die Monomer-Dimer Umwandlung.....	77
3.3.2	Einfluss von Nukleotiden auf die Monomer-Dimer Umwandlung	80
3.4	Analyse der ATPase Aktivität des OpuAA.....	82
3.4.1	Basale ATPase Aktivität von OpuAA	83
3.4.2	Stimulierte ATPase Aktivität von OpuAA	86
3.5	Affinität und Stöchiometrie von OpuAA/Nukleotid Komplexen	89
3.5.1	Untersuchungen mit TNP-Nukleotiden	90
3.5.1.1	Fluoreszenztitration des OpuAA mit TNP-ATP	90
3.5.1.2	Kompetitionsexperimente von OpuAA/TNP-ATP Komplexen	92
3.5.1.3	Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz von OpuAA/TNP-ADP Komplexen	95
3.5.2	Nukleotidbindung der OpuAA-Mutante F19W.....	96
3.6	Struktur des Substrat-Bindeproteins OpuAC.....	100
3.6.1	Ligandenbindung	101

3.6.2	Kristallisation und Bestimmung der Kristallparameter	102
3.6.3	Struktur Bestimmung	106
3.6.4	Faltung von OpuAC im Komplex mit Glycin-Betain oder Prolin-Betain	107
3.7	Intermolekulare Orientierung und Dynamik des OpuAA Dimers	113
3.7.1	Auswahl von Positionen im OpuAA zur Cystein-Substitution.....	114
3.7.2	Isolierung und Funktionalität der OpuAA-Mutanten S45C, G161C und S171C	116
3.7.3	Markierung der Cystein-Mutanten des OpuAA mit Fluorophoren	118
3.7.4	Konzeption der FRET-Messungen	120
3.7.5	FRET-Untersuchungen	123
4	Diskussion.....	126
4.1	Affinität und Selektivität der Ligandbindung von OpuAC.....	126
4.2	ATP Bindung und Hydrolyse von OpuAA.....	131
4.2.1	Einfluss der Ionenstärke	131
4.2.2	ATP Hydrolyse des OpuAA Dimers	134
4.3	Architektur des OpuAA Dimers.....	137
4.3.1	FRET in homo-dynamischen/statischen Systemen.....	137
4.3.2	Vergleich der Distanzen.....	142
4.4	Katalytischer Zyklus von OpuAA.....	147
4.4.1	Monomer-Dimer Gleichgewicht im Nukleotid-freien Zustand.....	147
4.4.2	Nukleotid-induzierte Modulation der Dimer-Interaktionsfläche von OpuAA ..	150
4.4.3	Energetische Betrachtung und Modell für die <i>in vivo</i> Situation	152
5	Ausblick.....	154
6	Appendix	156
7	Literatur.....	159
8	Abkürzungen	172

1 Einleitung

Biologische Membranen stellen ein hoch organisiertes Aggregat von Lipiden und Proteinen dar und sind essentieller Bestandteil eines jeden Organismus (Singer & Nicolson, 1972; Finean, 1984). Die Zelle als die Grundeinheit des Lebens ist durch die sie umhüllende Plasmamembran begrenzt. Bei Eukaryoten sind darüber hinaus viele subzelluläre Organellen wie Kern, Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat durch Membranen begrenzt. Die Aufgabe biologischer Membranen besteht zunächst im Schutz der Zelle vor Einflüssen aus der Umwelt. Durch Kompartimentierung wird darüber hinaus die Regulation wichtiger biologischer Prozesse wie beispielsweise der kontrollierte Stoffaustausch, die Energiegewinnung und der Aufbau elektrochemischer Gradienten ermöglicht.

Die meisten hydrophilen Substanzen und Ionen können Membranen nicht passieren. Der Austausch dieser Substanzen über biologische Membranen muss daher von spezifischen Transportproteinen katalysiert werden, die in die Membran eingebettet sind. Ein aktiv katalysierter Transport von Substanzen benötigt eine Energiequelle, die den Prozess antreibt. Eine solche Energiequelle kann beispielsweise durch die Entladung eines elektrochemischen Gradienten generiert werden und wird von sekundären Transportproteinen genutzt. Ein prominentes Beispiel für einen solchen Transportmechanismus ist die Laktose-Permease (Kaback, 1986). Primäre Transportproteine nutzen dagegen die Hydrolyse von ATP, um den Transportprozess zu energetisieren. ATP *binding cassette* (ABC)-Transporter stellen in diesem Zusammenhang eine der größten Klassen paraloger Transmembranproteine dar (Higgins, 2001; Schmitt & Tampe, 2002). Die Gruppentranslokation ist eine Variante des ATP getriebenen aktiven Transports in Bakterien, in der die transportierten Moleküle gleichzeitig chemisch modifiziert werden (Saier, 1977). Eines der best untersuchten Beispiele ist das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase System von *Escherichia coli* (*E. coli*) (Kundig *et al.*, 1964).

Eine Kontrolle des Stoffaustausches ist jedoch nicht für alle Substanzen möglich. So passieren beispielsweise Wasser und kurzkettige Alkohole ungehindert die Lipiddoppelschicht der Membran. Darüber hinaus vermitteln speziell Mitglieder der ubiquitären Aquaporin Transmembranprotein Familie wie beispielsweise GlpF oder AqpZ aus *E. coli* einen selektiven und effektiven, jedoch passiven Austausch von Wasser oder Glycerin über die Plasmamembran durch erleichterte Diffusion (Preston *et al.*, 1992; Savage *et al.*, 2003). Eine Veränderung der Osmolarität der Umgebung bewirkt somit einen unkontrollierten Strom von Wasser und stellt daher für Organismen eine besondere physiologische Herausforderung dar (Kempf & Bremer, 1998).

1.1 Osmoadaption bei Mikroorganismen

Mikroorganismen sind in ihrem natürlichen Lebensraum häufigen, teilweise sogar sehr drastischen Schwankungen in der Verfügbarkeit von Wasser ausgesetzt (Galinski, 1995; Kempf & Bremer, 1998; Wood *et al.*, 2001). So kann beispielsweise die Osmolarität eines wässrigen Milieus durch Sonneneinstrahlung und Austrocknung stark ansteigen oder im entgegengesetzten Fall bei Regen innerhalb kurzer Zeit stark abfallen. Beide Szenarien bewirken eine deutliche Veränderung des osmotischen Gradienten zwischen dem Zellinneren und der Umgebung, und als Folge hiervon strömt Wasser entlang des osmotischen Gradienten passiv über die Zytoplasmamembran (Record *et al.*, 1998,a; Record *et al.*, 1998,b). Damit verändert sich der essentielle Zelldruck (Turgor) und für Mikroorganismen entsteht eine lebensbedrohliche Situation. Molekulare Mechanismen, die zum Erhalt oder der Wiederherstellung des Turgors innerhalb seiner physiologischen Grenzen dienen, werden als Osmoregulation bzw. Osmoadaption bezeichnet (Poolman *et al.*, 2002). Sie ermöglichen Mikroorganismen eine Anpassung an Schwankungen in der Umgebungsmolarität und dienen so der dauerhaften Besiedlung von natürlichen Lebensräumen.

1.1.1 Regulation der Osmoadaption

Bei allen Mikroorganismen ist die intrazelluläre Osmolarität unter normalen physiologischen Bedingungen höher als die der Umgebung (Record *et al.*, 1998,b). Daher besitzen Mikroorganismen einen positiven Turgor, der eine notwendige Voraussetzung für beispielsweise die Zellproliferation ist. Der Turgor wird alleine über die Konzentration der osmotisch aktiven Substanzen im Zytoplasma bestimmt, da Mikroorganismen keine aktiven Transportmechanismen für Wasser besitzen (Poolman *et al.*, 2002).

Im Fall einer Abnahme der Umgebungsmolarität, d.h. unter hypotonen Bedingungen, strömt Wasser entlang des osmotischen Gradienten ungehindert in die Zelle. Die Zelle beginnt zu schwellen und es droht eine Ruptur der Zytoplasmamembran. Um diesem Szenario entgegenzuwirken, öffnen sich aufgrund des erhöhten lateralen Drucks auf die Membran mechanosensitive Kanäle wie z.B. bei *E. coli* MscL und MscS deren Kristallstrukturen kürzlich beschrieben wurden (Chang *et al.*, 1998; Bass *et al.*, 2002). Sie entlassen unselektiv lösliche Bestandteile des Zytosols in die Umgebung und senken dabei die intrazelluläre Osmolarität (Sukharev *et al.*, 2001).

Im Fall eines Anstiegs der Umgebungsmolarität, d.h. unter hypertonen Bedingungen, strömen signifikante Mengen an Wasser entlang des osmotischen Gradienten ungehindert aus der Zelle heraus. Die Zelle beginnt zu dehydratisieren und es droht die Gefahr einer Plasmolyse. Um die intrazelluläre Osmolarität zu erhöhen, nehmen Bakterien als erste

zelluläre Adaptionsreaktion große Mengen an K^+ aus der Umgebung auf. Dabei zeigten Studien mit den Gram-negativen Bakterien *E. coli* und *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), dass unter hypertonen Wachstumsbedingungen K^+ bis zu einer Konzentration von 0,4 M im Zytoplasma akkumuliert wurde (Whatmore & Reed, 1990). In *E. coli* wurden bisher drei unterschiedliche Aufnahmesysteme für K^+ identifiziert: Kup, das eine konstitutive K^+ Aufnahme vermittelt, sowie die Multi-Komponenten Systeme Trk und Kdp, die über den Turgor und die Osmolarität der Umgebung aktiviert werden (Kempf & Bremer, 1998). Dieser ersten zellulären Anpassungsreaktion folgt nahezu parallel die Synthese von Glutamat, um den starken Anstieg von positiver Ladung zu kompensieren (McLaggan *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1996). Die strikte zeitliche Abfolge dieser Ereignisse während der ersten Phase der Osmoadaption lassen vermuten, dass K^+ /Glutamat als Signal fungiert und weitere zelluläre osmotische Adaptionsreaktionen aktiviert und koordiniert (McLaggan *et al.*, 1994).

Die intrazelluläre Anreicherung von Ionen ist jedoch ausschließlich für extrem-halophile Archea und halotolerante Bakterien eine geeignete Strategie, um dauerhaft auf hypertone Wachstumsbedingungen zu reagieren (Oren *et al.*, 2002). Nur ihre zelluläre Physiologie ist an Bedingungen permanent hoher Ionenstärke im Zytosol angepasst. Im Gegensatz dazu werden bei nicht-halotoleranten Bakterien viele vitale zelluläre Prozesse wie beispielsweise die Proteinbiosynthese, die DNA Replikation und andere metabolische Prozesse durch permanent hohe Ionenstärke im Zellinneren inhibiert. Aus diesem Grund ersetzen sie innerhalb kurzer Zeit als zweite zelluläre Adaptionsreaktion K^+ /Glutamat durch kompatible Solute (Kempf & Bremer, 1998). Diese organischen Substanzen, die in der Literatur auch als Osmoprotektiva Eingang gefunden haben, sind mit den zellulären Prozessen verträglich und erlauben eine Anreicherung bis in den sub-molaren Konzentrationsbereich (Brown, 1976). Dies führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Wassergehalts und stabilisiert den Zellturgor innerhalb seiner physiologischen Grenzen. Die Abbildung 1.1 gibt eine schematische Übersicht der sekundären Adaptionsreaktion zur Regulation des Zellvolumens von Bakterien am Beispiel von *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) wieder.

Die von Mikroorganismen genutzten kompatiblen Solute umfassen eine begrenzte Zahl organischer Verbindungsklassen (Brown, 1978): Zucker und andere Polyole wie z.B. Trehalose und Glycerin; Aminosäuren wie z.B. Prolin; Ammoniumcarboxylate wie z.B. Glycin-Betain, Prolin-Betain und Carnitin; Sulfoniumcarboxylate wie z.B. Dimethylsulfoniumpropionat oder kurzkettige Peptide wie z.B. N-Acetylglutaminyglutaminamid. Diese Substanzen weisen als gemeinsames Merkmal eine hohe Löslichkeit in Wasser auf und sind mit Ausnahme der Zucker und Polyole bei physiologischem pH-Wert zwitterionisch. Bakterienstämme nutzen ein jeweils nur ihnen eigenes Spektrum an kompatiblen Soluten, wobei die jeweilige Zusammensetzung von der Wachstumsphase und dem Wachstumsmedium abhängt. Die Trimethylammonium Verbindung N,N,N-Trimethyl-Glycin (Glycin-

Betain) stellt in diesem Zusammenhang eines der von pro- und eukaryotischen Zellen am häufigsten genutzten kompatiblen Solute zum Schutz vor hochosmolaren Bedingungen dar (Kempf & Bremer, 1998). Glycin-Betain wird von Mikroorganismen darüber hinaus als genereller Stabilisator von Proteinen wie z.B. zur Resistenz gegen Kälte- oder Hitzestress genutzt. Für die intrazelluläre Akkumulation kompatibler Solute unter hyperosmotischen Bedingungen haben Bakterien zwei Strategien entwickelt: Aktive Aufnahme aus der Umgebung mit Hilfe spezieller Transportsysteme oder *de novo* Synthese von kompatiblen Soluten aus Vorläufersubstanzen.

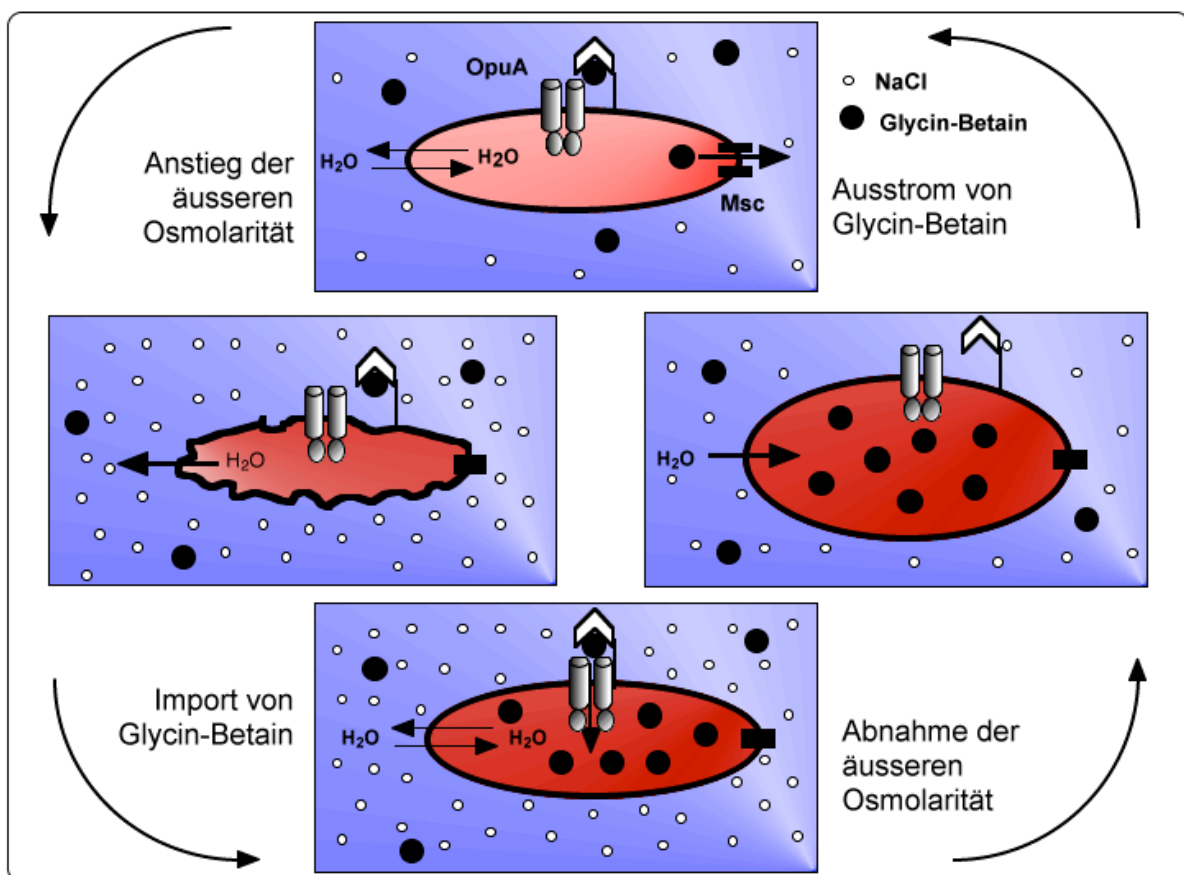


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Regulation des Zellvolumens von *B. subtilis* (rote Fläche) bei Veränderung der Umgebungsosmolarität. Die Aufnahme von Glycin-Betain (schwarze Kreise) wird durch den OpuA Transporter (graue Zylinder) vermittelt und ein Ausstrom von Glycin-Betain wird durch Öffnung von mechanosensitiven Kanälen (Msc) erreicht. Weitere Symbole siehe Abbildung.

1.1.2 Aufnahmesysteme von kompatiblen Soluten bei *B. subtilis*

Das Bodenbakterium *B. subtilis* stellt spätestens seit der kompletten Sequenzierung seines Genoms im Jahre 1997 (Kunst *et al.*, 1997) ein Modellorganismus für Gram-positive Bakterien dar. Es besiedelt hauptsächlich die oberen Erdschichten und ist daher häufigen und drastischen Veränderungen in der Umgebungsosmolarität ausgesetzt. Andererseits stellt

dieses natürliche Habitat *B. subtilis* ein breites Spektrum an exogenen Osmoprotektiva bereit.

Sowohl physiologische als auch molekularbiologische Untersuchungen haben zur Identifizierung von fünf Aufnahmesysteme für kompatible Solute bei *B. subtilis* geführt (Kempf & Bremer, 1998): OpuA, OpuB, OpuC, OpuD und OpuE (englisch: *osmoprotectant uptake system* (Opu)). Die Transkription aller entsprechenden Strukturgene unterliegt einer osmotischen Kontrolle. In diesem Zusammenhang nehmen die Stress induzierten Transkriptionsfaktoren σ^A und σ^B eine Schlüsselposition ein (Spiegelhalter & Bremer, 1998). So resultieren Hochsalzbedingungen in der verstärkten Transkription der unter der Kontrolle von σ^A und σ^B stehenden Gene. Diese osmotische Regulation der Genexpression konnte insbesondere für *opuE*, dessen Genprodukt ein Mitglied der Na^+ Symporter Familie ist und die Aufnahme von Prolin vermittelt, demonstriert werden (von Blohn *et al.*, 1997). Neben Prolin stellt Glycin-Betain für *B. subtilis* eines der wichtigen exogenen Osmoprotektiva dar. Der OpuB-Transporter importiert Cholin, das als Ausgangssubstanz für die *de novo* Synthese von Glycin-Betain genutzt wird (Kappes *et al.*, 1999). Für die aktive Aufnahme von Glycin-Betain stehen *B. subtilis* drei Aufnahmesysteme zur Verfügung: OpuA, OpuC und OpuD (Kempf & Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1999). OpuD besteht aus einer einzigen Polypeptidkette und gehört zur BCCT Familie der sekundären Transporter. OpuA, das in Kapitel 1.3 genauer beschrieben wird, und OpuC sind dagegen Multi-Komponenten Systeme. Sie gehören zu der Substrat-Bindeprotein abhängigen Unterfamilie der Familie der ATP *binding cassette* (ABC)-Transporter, die im folgenden Kapitel genauer erklärt werden.

1.2 ATP *binding cassette* (ABC)-Transporter

Im Jahre 1982 wurden erstmals die Strukturgene eines Substrat-Bindeprotein abhängigen Transportsystems, der Histidin-Permease aus *S. typhimurium*, kloniert und sequenziert (Higgins *et al.*, 1982). Dies hat zunächst zur Entdeckung von Sequenzmotiven geführt, die auch in bisher bekannten Nukleotid-Bindeproteinen vorkamen und an der Komplexierung von ATP beteiligt waren (Walker *et al.*, 1982). Durch nachfolgende Sequenzvergleiche konnte jedoch ein hochkonserviertes und bisher unbekanntes Motiv, die C-Schleife bzw. das Signaturmotiv, entschlüsselt und damit die Grundlage für die Identifizierung einer eigenen und bisher unbekanntenen Klasse von membranständigen Transportproteinen, den ABC-Transportern, gelegt werden. ABC-Transporter wurden bisher in jedem analysierten Organismus gefunden: Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms hat z.B. zur Identifizierung von 48 ABC-Transportern geführt (Dean *et al.*, 2001). In *E. coli* existieren 81 ABC-Transporter, und somit kodieren 5 % der Gene des *E. coli* Erbguts für Komponenten

von ABC-Transportern (Linton & Higgins, 1998). Mittlerweile ist klar gezeigt, dass ABC-Transporter in allen drei Bereichen des Lebens existieren und eine der größten Familien paraloger Transmembranproteine repräsentieren (Holland & Blight, 1999; Higgins, 2001).

ABC-Transporter transportieren mit hoher Selektivität Substrate, die ein breites Spektrum strukturell nicht verwandter Verbindungen umfassen, unter Hydrolyse von ATP über biologische Membranen (Higgins, 2001). Viele prokaryotische ABC-Transporter dienen den Zellen zum Import von Nahrungsstoffen wie z.B. Aminosäuren oder Zuckern. Exemplarisch sei die Histidin-Permease (Bishop *et al.*, 1989) und der Maltose-Importer (Morbach *et al.*, 1993) erwähnt. Dagegen sind nur wenige Beispiele für eine Exportfunktion prokaryotischer ABC-Transporter bekannt. Beispiele sind LmrA (van Veen *et al.*, 1996), ein Multi-Drogenexporter aus *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) und der Haemolysin B (HlyB)-Transporter (Wang *et al.*, 1991) aus *E. coli*, der eines der größten bekannten Substrate von Transportproteinen, das 107 kDa Haemolysin A Toxin, exportiert.

Eukaryotische ABC-Transporter funktionieren dagegen hauptsächlich als Exportpumpen. Prominente Beispiele sind das humane MDR1 (Ueda *et al.*, 1986) und Pdr5 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Balzi *et al.*, 1994), die beide ein breites Spektrum von organischen Drogen exportieren. Eukaryotische ABC-Transporter vermitteln aber auch den intrazellulären Austausch von Substraten und können Teil von makromolekularen Komplexen sein. Ein Beispiel ist der humane *transporter associated with antigen processing* (TAP) (Powis *et al.*, 1992), der immunogene Peptide vom Zytosol in das endoplasmatische Retikulum transportiert und mit MHC Klasse I Molekülen, Tapasin, Calreticulin und ERp57 assoziiert ist (Schmitt & Tampe, 2000). Der humane ABC-Transporter SUR ist mit dem K⁺ Kanals KIR6 assoziiert, und es wird vermutet, dass er auch an dessen Regulation beteiligt ist (Aguilar-Bryan *et al.*, 1998).

Viele menschliche ABC-Transporter besitzen medizinische Relevanz, da sie mit der Ausbildung von pathophysiologischen Prozessen oder genetischen Krankheiten assoziiert werden (Gottesman & Ambudkar, 2001). Die Überexpression des ABC-Transporter MDR1 (P-Glykoprotein) und MRP1 wird für die Multidrogenresistenz von Krebszellen in der Chemotherapie verantwortlich gemacht (Gottesman *et al.*, 1996). Auch für erblich erworbene Krankheiten können ABC-Transporter verantwortlich sein. Mutationen im *cystic fibrosis* Gen sind der Grund für eine Fehlfunktion des regulierten Chlorid-Ionen Kanal *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) (Riordan *et al.*, 1989). Dies führt zur Mukoviszidose, einer der häufigsten genetischen erworbenen Krankheiten mit Todesfolge unter Kaukasiern. Eine exemplarische Aufzählung dieser und weiterer Krankheiten, die mit humanen ABC-Transportern assoziiert sind, ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Krankheit	ABC-Transporter	Referenz
Adrenoleukodystrophie	ABCD1 (ALD)	(Shani & Valle, 1998)
Mukoviszidose	ABCC7 (CFTR)	(Riordan <i>et al.</i> , 1989)
Dubin-Johnson Syndrom	ABCC2 (MRP2)	(Paulusma <i>et al.</i> , 1996)
Stargardt Makuläre Dystrophie	ABCA4 (ABCR)	(Allikmets <i>et al.</i> , 1997)
Immundefizienz	ABCB2/3 (TAP1/2)	(Powis <i>et al.</i> , 1992)
Krebs	ABCB1 (MDR1), ABCC1 (MRP1)	(Ueda <i>et al.</i> , 1986) (Chen <i>et al.</i> , 1986)
Tangier Syndrom	ABCA1 (ABC1)	(Brooks-Wilson <i>et al.</i> , 1999)

Tabelle 1: Menschliche Krankheiten, die mit ABC-Transportern assoziiert sind.

1.2.1 Molekularer Aufbau von ABC-Transportern

Alle ABC-Transporter folgen in ihrem Aufbau einer modularen Anordnung von vier Domänen: zwei Nukleotid-Bindedomänen (-proteinen) (NBD) und zwei Transmembran-Domänen (-Proteinen) (TMD) (Schmitt & Tampe, 2002). NBDs bzw. TMDs können aus gleichen und/oder unterschiedlichen Proteinen/Domänen zusammengesetzt sein und ihre individuelle Organisation in ABC-Transportern ist in nahezu allen möglichen Kombinationen existent. In den meisten eukaryotischen ABC-Transportern sind alle vier Domänen zu einer einzigen Polypeptidkette fusioniert. Im Gegensatz zu dieser Architektur sind die Domänen prokaryotischer ABC-Transporter nicht fusioniert und werden durch separate Gene kodiert. Darüber hinaus besitzen viele prokaryotische ABC-Transporter ein Substrat-Bindeprotein (SBP). Diese fünfte Domäne wird jedoch per Definition nicht zum ABC-Transporter gezählt (Ames *et al.*, 1992; Ames, 1992).

SBPs befinden sich im Periplasma von Gram-negativen Bakterien oder sind, im Fall von Gram-positiven Bakterien, über eine Lipidmodifikation an einem aminoterminalen Cystein-Rest in der Zytoplasmamembran verankert. In seltenen Fällen ist das SBP auch direkt mit der TMD fusioniert (van der Heide & Poolman, 2002). Die SBPs, die für den Transportprozess vieler mikrobieller ABC-Transporter essentiell sind, binden ihre Liganden mit hoher Affinität und Spezifität (Davidson, 2002). Eine signifikante Homologie der SBPs auf Ebene der Primärsequenz besteht daher nicht. Jedoch zeigten die bisher publizierten Kristallstrukturen wie z.B. das D-Ribose Bindeprotein (Bjorkman *et al.*, 1994) (Abb. 1.2), das Oligopeptid Bindeprotein (Tame *et al.*, 1996) oder das Glutamin Bindeprotein (Hsiao *et al.*, 1996) eine sehr konservierte Faltung, die aus zwei globulären Domänen mit ähnlicher Topologie besteht. Jede dieser Domänen besteht aus einem zentralen β -Faltblatt, dass von mehreren α -Helizes flankiert ist (Abb. 1.2). Beide Domänen sind über zwei teilweise drei

Peptidsegmente miteinander verbunden und setzen sich damit aus nicht-kontinuierlichen Segmenten der Polypeptidkette zusammen. Die Substrate werden in einer Spalte, die von beiden Domänen, sowie der verbindenden Peptidsegmente geformt wird, gebunden und so vollständig von der wässrigen Umgebung abgeschirmt. Die Ligandenbindung der SBPs wird durch große relative Bewegungen der beiden Domänen begleitet, die sich um den Liganden verschließen (Davidson, 2002). Im ungebundenen Zustand liegen die Domänen in einer offenen Konformation vor. Die Struktur der individuellen Domänen bleibt bei diesem Mechanismus jedoch unberührt.

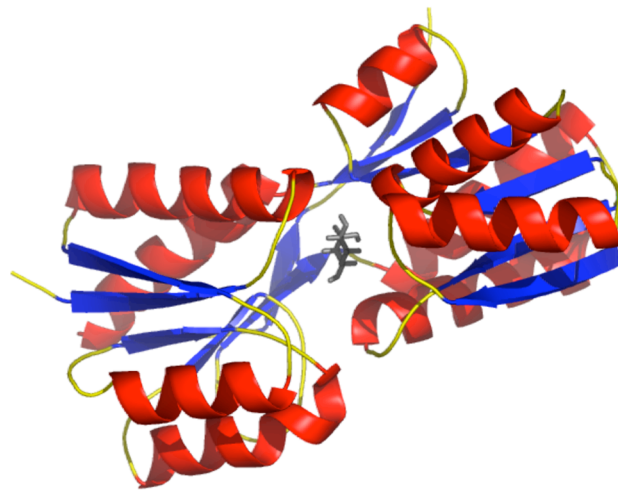


Abb. 1.2: Kristallstruktur des D-Ribose Substrat-Bindeproteins aus *E. coli* (Bjorkman *et al.*, 1994). Die Helizes sind in rot, β -Faltblätter sind in blau, Schlaufen sind in gelb und das Substrat ist in grauer Stäbchenform dargestellt.

Das SBP befördert seinen Liganden zu dem in der Zytoplasmamembran eingebetteten Translokationskomplex. Sowohl genetische (Higgins *et al.*, 1982), als auch biochemische Studien (van Veen *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002) konnten die Ausbildung eines TMD Dimers als funktionale Einheit der Translokationspore belegen. Diese Daten wurden durch die kürzlich gelöste Struktur des ABC-Transporters BtuCD (Locher *et al.*, 2002) unterstützt. Obwohl für einen kanonischen ABC-Transporter aufgrund von Hydrophobizitätsberechnungen sechs Transmembranhelizes (TMH) pro TMD postuliert werden, kann jedoch aufgrund der Struktur von BtuCD, die jeweils 10 α -Helizes pro TMD zeigte, von einer hohen Variabilität für die Anzahl der TMH in ABC-Transportern ausgegangen werden. Die TMDs sind für die Substratspezifität der ABC-Transporter mit verantwortlich und für einige ABC-Transporter wie z.B. TAP (Momburg *et al.*, 1996) oder MDR1 (Sauna & Ambudkar, 2000) konnten Substratbindestellen in der TMD nachgewiesen werden. Im Einklang mit dieser Funktion zeigen die TMDs nur eine begrenzte Sequenzhomologie. Andererseits besitzen alle bakterielle ABC-Importer eine Bindestelle für das SBP und enthalten eine hochkonservierte Schleifensequenz im Zytoplasma mit der Konsensussequenz EAA, die an der Interaktion mit der NBD beteiligt ist (Dassa & Hofnung, 1985; Mourez *et al.*, 1997).

Nukleotid-Bindeproteine von ABC-Transportern katalysieren die Energetisierung des Transportprozesses und sind wenigstens in einem Fall an der Interaktion mit dem Substrat beteiligt (Benabdelhak *et al.*, 2003). Sie weisen eine bis zu 40 %ige Sequenzhomologie untereinander auf und in Übereinstimmung damit werden in allen NBDs drei hoch konservierte Sequenzmotive gefunden: Die Walker A und B Motive (Walker *et al.*, 1982) und die C-Schleufe, die auch als Signaturmotiv bekannt ist. Das Walker A Motiv (Konsensussequenz (KS): GxxGxGKST, x= jede Aminosäure) und das Walker B Motiv (KS: $\square\square\square\square$ D, \square = jede hydrophobe Aminosäure) werden auch in anderen an der Nukleotidbindung beteiligten Proteinen wie z.B. Myosin, der F₁-ATPase oder Kinasen gefunden (Walker *et al.*, 1982). Dagegen ist die C-Schleufe (bakterielle KS: LSGGQ), die 20-40 Aminosäuren N-terminal zum Walker B Motiv lokalisiert ist, ausschließlich ABC-Transportern und ABC verwandten Proteinen wie z.B. Rad 50 vorbehalten und dient zu deren Identifizierung. Darüber hinaus existieren in NBDs weitere konservierte Aminosäuren und Schleifen, die in Abb. 1.3 anhand von HisP (Hung *et al.*, 1998), strukturell veranschaulicht sind: 1.) Ein Glutamat C-terminal des Walker B Motivs, das an der Koordinierung eines potentiell hydrolytischen Wasser Moleküls beteiligt ist und aufgrund dessen als katalytische Base bezeichnet wird (Smith *et al.*, 2002; Verdon *et al.*, 2003,a). Für einige NBDs konnte eine Inaktivierung der ATPase Aktivität bzw. eine ATP induzierte Dimerisierung durch Mutation des Glutamats zu Glutamin gezeigt werden (Urbatsch *et al.*, 2000; Moody *et al.*, 2002; Janas *et al.*, 2003). 2.) ein Glutamin in der sog. Q-Schleufe, das ebenfalls an der Koordinierung des potentiell hydrolytischen Wasser Moleküls und des Ko-Faktors Mg²⁺ beteiligt ist (Hopfner *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002). 3.) Ein Histidin in der sog. H-Schleufe, das als Sensor des \square -Phosphates von ATP interpretiert wird (Davidson & Sharma, 1997; Hung *et al.*, 1998; Nikaido & Ames, 1999; Schmitt & Tampe, 2002). 4.) eine aromatische Aminosäure, die an der Koordinierung des Adeninrings von ATP beteiligt ist (Hung *et al.*, 1998; Schmitt *et al.*, 2003). 5.) Ein Aspartat in der sog. D-Schleufe, die im NBD Dimer MJ0796 an der Ausbildung der Dimer-Interaktionsfläche beteiligt ist (Smith *et al.*, 2002). 6.) Die Gly-Schleufe, dessen Funktion bisher nicht bekannt ist (Schmitt *et al.*, 2003).

Die erste veröffentlichte NBD Kristallstruktur eines ABC-Transporters, HisP aus der Histidin-Permease von *S. typhimurium*, zeigte eine L-förmige Struktur, die aus zwei Domänen bestand (Hung *et al.*, 1998) (Abb. 1.3): Die katalytische Domäne und die Signaldomäne. Die katalytische Domäne, nimmt eine dem RecA Protein (Story & Steitz, 1992) oder der F₁-ATPase (Abrahams *et al.*, 1994) ähnelnde \square/\square -Faltung an. Sie enthält die Walker A und B Motive, die an der Bindung und Hydrolyse von ATP beteiligt sind. Die katalytische Domäne und die Signaldomäne werden durch die Q-Schleufe einerseits und die Pro-Schleufe, die ein konserviertes Prolin enthält, andererseits miteinander verbunden (Schmitt *et al.*, 2003). Die Signaldomäne besitzt ausschließlich helikale Sekundärstrukturen und

beherbergt die C-Schleufe. Eine spezifische Interaktion einer Unterregion der Signaldomäne mit der TMD, die für einen funktionalen Transport essentiell war, konnte für HisP und MalK demonstriert werden (Mimura *et al.*, 1991; Schmees *et al.*, 1999; Hunke *et al.*, 2000). Interessanterweise zeigt diese Unterregion ein hohes Maß an struktureller Variabilität (Schmitt *et al.*, 2003). Diese Daten deuteten auf eine besondere Bedeutung der helikalen Domäne in der Signaltransduktion zwischen TMD und NBD hin.

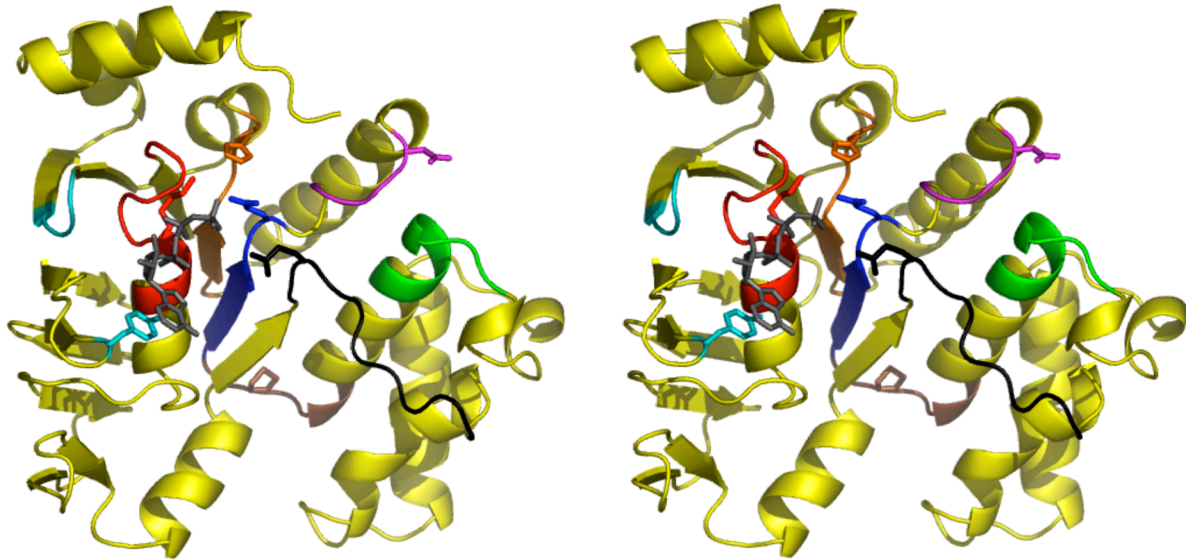


Abb. 1.3: Stereo-Repräsentation der Kristallstruktur von HisP aus *S. typhimurium* im Komplex mit ATP (Hung *et al.*, 1998). Konservierte Motive und Aminosäuren (siehe Text) sind gekennzeichnet: Walker A Motiv (rot), Q-Schleufe mit Gln (schwarz), C-Schleufe (grün), Pro-Schleufe mit Pro (braun), Walker B Motiv mit Glu (blau), D-Schleufe mit Asp (rosa), H-Schleufe mit His (orange), Gly-Schleufe und Tyr16 (türkis). Das Substrat ist in grauer Stäbchenform dargestellt.

1.2.2 Struktur und Funktion von ABC-Transportern

Seit der Identifizierung der ABC-Transporter als eigenständige Proteinfamilie war das Verständnis ihres Mechanismus, d.h. der Umwandlung der chemischen Energie des ATP in einen gerichteten Transport, zentrales Thema biochemischer, genetischer und struktureller Untersuchungen. In diesem Zusammenhang sollen wichtige, ausgewählte Aspekte bezüglich Struktur und Funktion im Feld der ABC-Transporter kurz zusammengefasst werden:

Die Tatsache, dass alle ABC-Transporter zwei NBDs besitzen, implizierte eine physiologische Relevanz beider NBDs in der Energetisierung der Substrattranslokation. Für die Histidin-Permease und den Maltose-Transporter wurde eine positive Kooperativität der ATP Hydrolyse gezeigt (Davidson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997,a). Diese Ergebnisse implizierten eine Interaktion der NBDs während der ATP Bindung und/oder Hydrolyse. Sauna und Ambudkar untersuchten die Funktion der NBDs des ABC-Transporter MDR1 und zeigten eine sequenzielle Bindung und Hydrolyse von ATP, die für eine Modulation der Substrat-

Bindestellen im MDR1 genutzt wurde (Sauna & Ambudkar, 2000). Im Einklang damit postulierten sie ein Modell, in dem die NBDs distinkte, aber unterschiedliche Aufgaben hatten. Ein ähnliches Modell wurde für LmrA vorgeschlagen (van Veen *et al.*, 2000).

Die Analyse der isolierten NBDs ergab weitere wichtige Details für den Hydrolysezyklus von ABC-Transportern. Im Gegensatz zu der Substrat stimulierten ATPase Aktivität intakter ABC-Transporter zeigten isolierte NBDs eine niedrige konstitutive, basale ATPase Aktivität (Nikaido *et al.*, 1997). Ames und Mitarbeiter zeigten für HisP einen exponentiellen Anstieg der ATPase Aktivität mit der Proteinkonzentration (Nikaido *et al.*, 1997). Dies implizierte die direkte Gegenwart eines katalytisch aktiven NBD Dimers während der ATP-Hydrolyse und eröffnete die Frage nach dem strukturellen Aufbau eines solchen NBD Dimers. Die Kristallstruktur von Rad50, einem ABC-verwandten DNA-Reparaturprotein, gab erstmals eine strukturelle Antwort auf die Frage nach einer plausiblen physiologischen Interaktion der NBDs (Hopfner *et al.*, 2000). Während die Faltung des Rad50 Monomers der von HisP (Hung *et al.*, 1998) (Abb. 1.3) ähnelte, zeigte das Rad50 Dimer eine neuartige Interaktionsfläche, in der ein gebundenes ATP beide Monomere überbrückte und die Nukleotid-Binde-tasche vom Walker A Motiv eines Monomers und der C-Schleufe des anderen Monomers gebildet wurde (Abb. 1.4). Diese Architektur fand in der Literatur als *head-to-tail* Orientierung Eingang. Die Strukturen weiterer NBD Monomere oder Dimere, in Gegenwart oder Abwesenheit von Nukleotiden und unterschiedlicher Interaktionsfläche im Fall eines Dimers, wurden publiziert (Tabelle 2) und waren Gegenstand kontroverser Diskussionen.

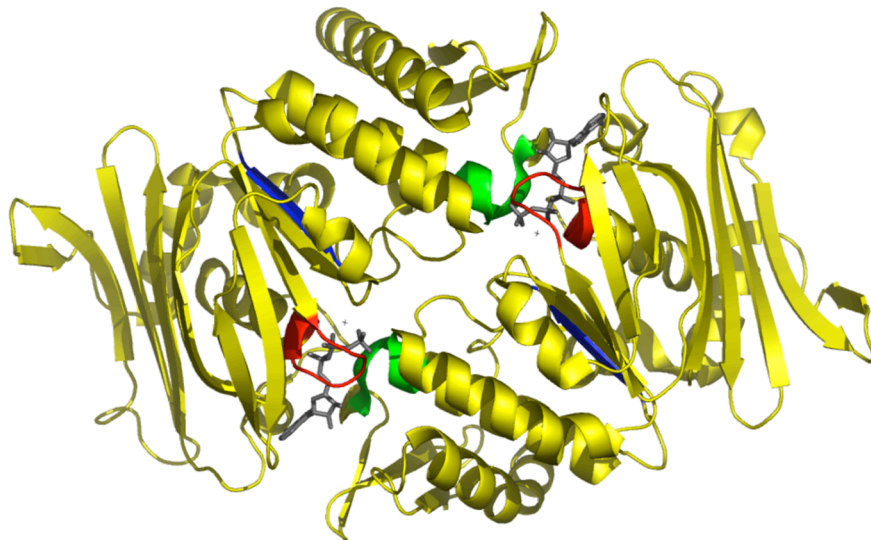


Abb. 1.4: Kristallstruktur des Rad50 Dimers im Komplex mit ATP (Hopfner *et al.*, 2000). Konservierte Motive sind gekennzeichnet: Walker A Motiv (rot) und C-Schleufe (grün). Das Substrat ist in grauer Stäbchenform dargestellt.

Thomas und Mitarbeiter entwickelten erstmals eine Strategie, ein ATP überbrücktes NBD Dimer stabil zu isolieren (Moody *et al.*, 2002). Hierzu mutierten sie ein phylogenetisch

konserviertes Glutamat (Kapitel 1.2.1), das die potentielle katalytisch aktive Base für die ATP Hydrolyse darstellte, zu Glutamin. Eine solche NBD Mutante konnte kein ATP hydrolysieren, bildete jedoch in Gegenwart von ATP ein stabiles Dimer. Im Jahre 2002 wurde die Struktur einer solchen NBD Mutante (MJ0796 E171Q) aus *Methanococcus janaschii* (*M. janaschii*) veröffentlicht und zeigte ein ATP überbrücktes Dimer, das in Analogie zu Rad50 eine *head-to-tail* Orientierung hatte (Smith *et al.*, 2002). Sowohl biochemische Daten (Fetsch & Davidson, 2003) als auch strukturelle Daten des Maltose-Transporters (Chen *et al.*, 2003) unterstützten anschließend die Relevanz einer *head-to-tail* Orientierung des NBD Dimers.

NBD / Organismus	Ligand	Oligomere Spezies	Interaktions-Fläche	Referenz
HisP / <i>S. typhimurium</i>	ATP	Dimer ¹	KD-KD	(Hung <i>et al.</i> , 1998)
MalK / <i>T. litoralis</i>	PP _i	Dimer ²	KD-KD, SD-SD	(Diederichs <i>et al.</i> , 2000)
MalK / <i>E. coli</i>	N-f (offen) Nf (halb-offen) ATP	Dimer Dimer Dimer	RD-RD RD-RD RD-RD, KD-SD	(Chen <i>et al.</i> , 2003) (Chen <i>et al.</i> , 2003) (Chen <i>et al.</i> , 2003)
HlyB-NBD / <i>E. coli</i>	N-f	Monomer	-	(Schmitt <i>et al.</i> , 2003)
Tap1-NBD / <i>H. sapiens</i>	ADP/Mg ²⁺	Monomer	-	(Gaudet & Wiley, 2001)
GlcV / <i>S. sulfatericus</i>	N-f ADP/Mg ²⁺ AMP-PNP/Mg ²⁺	Monomer Monomer Monomer	- - -	(Verdon <i>et al.</i> , 2003,a) (Verdon <i>et al.</i> , 2003,a) (Verdon <i>et al.</i> , 2003,a)
GlcV G144A	N-f	Monomer	-	(Verdon <i>et al.</i> , 2003,b)
MJ0796 / <i>M. janaschii</i>	N-f ADP/Mg ²⁺	Monomer Monomer	- -	(Yuan <i>et al.</i> , 2001) (Yuan <i>et al.</i> , 2001)
MJ0796 E171Q	ATP/Na ⁺	Dimer	KD-SD	(Smith <i>et al.</i> , 2002)
MJ1267 / <i>M. janaschii</i>	N-f ADP/Mg ²⁺	Monomer Monomer	- -	(Karpowich <i>et al.</i> , 2001) (Karpowich <i>et al.</i> , 2001)
CFTR-NBD / <i>M. musculus</i>	N-f AMP-PNP/Mg ²⁺ ATP/Mg ²⁺ ADP/Mg ²⁺	Monomer Monomer Monomer Monomer	- - - -	(Lewis <i>et al.</i> , 2004) (Lewis <i>et al.</i> , 2004) (Lewis <i>et al.</i> , 2004) (Lewis <i>et al.</i> , 2004)

Tabelle 2: Publierte Kristallstrukturen von NBDs. KD: Katalytische Domäne, SD: Signaldomäne, RD: Regulatorische Domäne, N-f: Nukleotid-frei. ¹: HisP ist ein kristallographisches Dimer, da in der asymmetrischen Einheit nur ein Monomer beobachtet wurde. ²: Dimer mit 170 ° Symmetrie.

Das MJ0796 E171Q Dimer zeigte aufgrund der 180° Symmetrie keine Unterscheidungen in der Architektur der beiden Nukleotid-Bindetaschen (Smith *et al.*, 2002). Diese Tatsache

implizierte keine intrinsische Präferenz einer der beiden Nukleotid-Bindetaschen bezüglich ATP-Hydrolyse und favorisierte entsprechend eine parallele gegenüber einer sequenziellen ATP Hydrolyse. Es ist jedoch plausibel, dass eine Asymmetrie durch zwei unterschiedliche NBDs oder TMDs wie z.B. im Fall von CFTR oder MRP1 erzeugt werden kann (Aleksandrov *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2002). Die genaue Stöchiometrie von hydrolysiertem ATP pro transportiertes Substrat gab in diesem Zusammenhang keinen Hinweis, da sie bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt werden konnte. Während für OpuA aus *L. lactis* 2 ATP pro transportiertes Substrat bestimmt wurden (Patzlaff *et al.*, 2003), lag die Stöchiometrie bei MDR1 bei ungefähr 1 (Shapiro & Ling, 1998).

Davidson und Mitarbeiter konnten die direkte posthydrolytische Konformation des Maltose-Transporters mit Hilfe von Vanadat stabil isolieren (Chen *et al.*, 2001). Unter diesen Bedingungen war die ATPase Aktivität inhibiert und das SBP fest an die TMD gebunden. Dies implizierte eine Interaktion des SBP mit dem extrazellulären Teil der TMD und die Übertragung eines Signals an die NBD. Die Struktur von BtuCD zeigte erstmals strukturell eine direkte Wechselwirkung der TMD und der NBD (Locher *et al.*, 2002) (Abb. 1.5 A und B). Dabei wurde eine zytoplasmatische Schlaufe, die sog. L-Schleife in der TMD, BtuC, identifiziert, die mit der Q-Schleife von BtuD interagiert und eine lokale Sequenzhomologie zu dem EAA Motiv (Dassa & Hofnung, 1985; Mourez *et al.*, 1997) aufwies. Die L-Schleife, die in BtuCD aus zwei kurzen α -Helizes besteht, könnte ein strukturelles Motiv für eine generelle Interaktionsfläche zwischen TMD und NBD von ABC-Transportern repräsentieren.

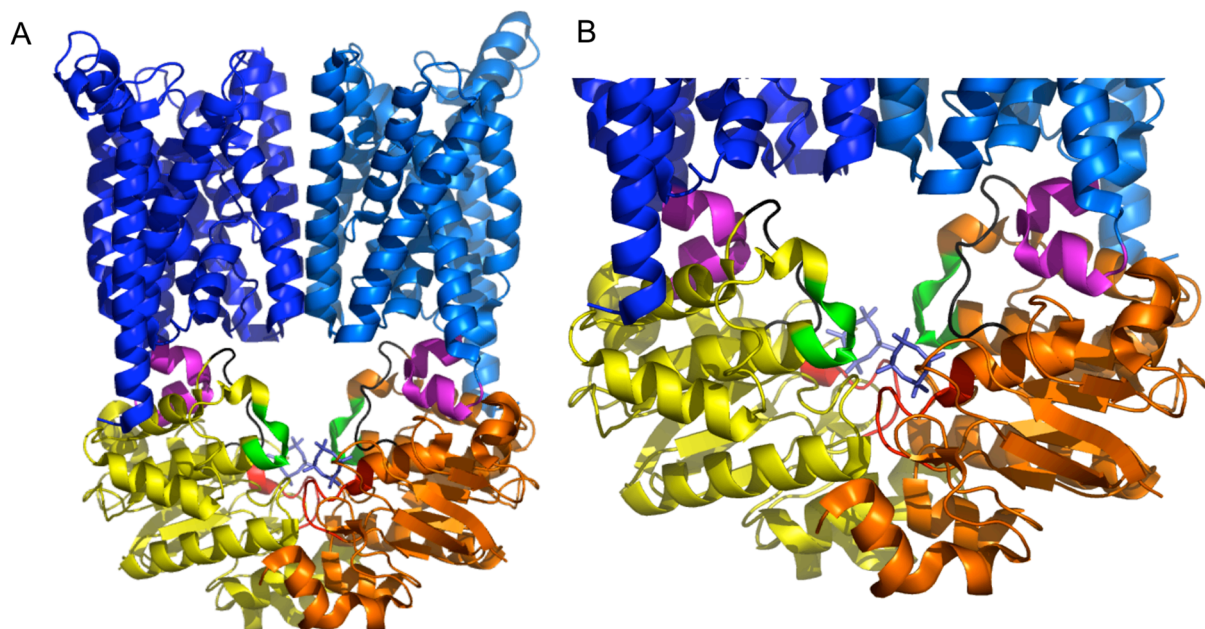


Abb. 1.5 A und B: Kristallstruktur des BtuCD Dimers in Komplex mit Zyklotetranvanadat (Locher *et al.*, 2002). BtuC ist in blau und marine; BtuD, ist in gelb und orange dargestellt. Konservierte Motive sind gekennzeichnet: Walker A Motiv (rot), C-Schleife (grün) und L-Schleife (rosa), D-Schleife (schwarz). Das Substrat ist in grauer Stäbchenform dargestellt. **B:** Ausschnittsvergrößerung von A.

Diese Übersicht verdeutlicht die vielen noch ungeklärten Aspekte im Katalysemechanismus von ABC-Transportern. So ist z.B. unklar, ob die ATP-Bindung und/oder die ATP-Hydrolyse und/oder die ADP-Dissoziation die Energie zur Substrattranslokation liefert und wie genau die Übertragung auf die TMD erfolgt. Auch in Bezug auf die Kommunikation und Interaktion der beiden NBDs verbleiben weiterhin viele offene Fragen.

1.3 OpuA – ein osmoreaktiver ABC-Transporter aus *B. subtilis*

Die für OpuA kodierenden Strukturgene *opuAA*, *opuAB* und *opuAC*, wurden im Jahr 1995 von Bremer und Kempf durch genetische Komplementierungsexperimente einer chromosomalen *B. subtilis* Bibliothek mit dem *E. coli* Stamm MKH13, mit einer Defizienz in Synthese und Aufnahme von Glycin-Betain, durch Selektion unter hyperosmolaren Wachstumsbedingungen identifiziert (Kempf & Bremer, 1995). Die Gene *opuAA*, *opuAB* und *opuAC* waren im *opuA* Operon organisiert, dessen Transkription unter osmotischer Kontrolle stand.

Die Kinetik der durch OpuA vermittelten Aufnahme von Glycin-Betain wurde homolog *in vivo* untersucht und zeigte einen K_M -Wert im mikromolaren Bereich (Kempf & Bremer, 1995). Die maximale Aufnahmerate wurde durch Erhöhung der Ionenstärke des Mediums um das 2,5 fache gesteigert und demonstrierte, dass OpuA ein osmoreaktiver Transporter war. Der Vergleich dieser Daten mit den kinetischen Parametern von OpuC und OpuD zeigte die Dominanz von OpuA als Aufnahmesystem für Glycin-Betain in *B. subtilis*.

OpuA wies Sequenzhomologien mit den osmoreaktiven ABC-Transportern ProU von *E. coli* (Haardt *et al.*, 1995) und OpuA von *L. lactis* (Bouvier *et al.*, 2000) auf. Insbesondere OpuAA zeigte einen hohen Grad an Sequenzidentität mit den ATPasen der genannten Transporter: ProV: 50 % und OpuAA: 58 % (Kempf & Bremer, 1995). Das Transmembranprotein OpuAB zeigte eine 47 %ige Sequenzidentität zu ProW, der TMD von ProU. Dagegen zeigte das SBP OpuAC nur geringe Sequenzkonservierung zu anderen SBPs wie z.B. 33 % in einem 46 Aminosäure Segment zu ProX, dem SBP von ProU. Die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren von OpuAC waren homolog zu der Signalsequenz von Lipoproteinen und enthielten eine Erkennungsstelle der Signalpeptidase II (KS: LAAC) (Sutcliffe & Russell, 1995). In biochemischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass OpuAC post-translational mit einer Fettsäure kovalent verbunden wird, die es in die Membran verankert und einen Verlust in das Medium verhindert (Kempf *et al.*, 1997).

Diese Daten zeigten, dass OpuA zu der Substrat-Bindeprotein abhängigen Unterfamilie der Familie der ABC-Transporter gehört und aus drei Proteinen besteht: dem Nukleotid-Bindeprotein OpuAA, dem integralen Membranprotein OpuAB und dem extrazellulären Substrat-Bindeprotein OpuAC. Die Substrate von OpuA, Glycin-Betain und Prolin-Betain

(Kempf & Bremer, 1998) werden von OpuAC gebunden und zum Translokationskomplex befördert. In Anlehnung an den BtuCD Komplex besteht ein solcher OpuA-Transporter *in vivo* potentiell aus einem OpuAA/AB Dimer, der das Substrat vermutlich unter Hydrolyse von ATP in die Zelle gepumpt (Abb. 1.6).

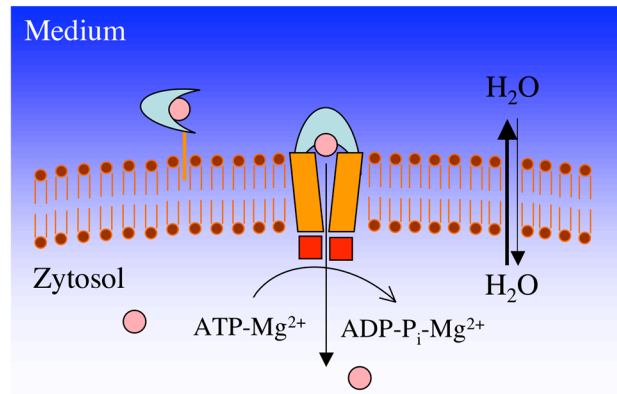


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des osmoreaktiven Transporters OpuA aus *B. subtilis*. OpuAA: rote Quadrate; OpuAB: orange Rechtecke, OpuAC: türkises Elipsoid; Glycin-Betain: rosa Kreise. Weitere Informationen siehe Text.

1.4 Motivation und Aufgabenstellung

Ein mechanistisches Verständnis von ABC-Transportern auf molekularer Ebene bildet die Grundlage für eine potentielle Modulation ihrer Aktivität und könnte damit im Fall von medizinisch relevanten, humanen ABC-Transportern die Ausbildung von pathophysiologischen Prozessen verhindern. Aus dieser Motivation wurde im Rahmen dieser Arbeit die Struktur und Funktion von ABC-Transportern am Beispiel des OpuA Systems aus *B. subtilis*, einem Mitglied der Substrat-Bindeprotein (SBP) abhängigen Unterfamilie der Familie der ABC-Transporter, untersucht. Diese Strategie bot den Vorteil, dass einerseits die Sequenzhomologie zwischen bakteriellen und humanen ABC-Transportern eine konservierte Funktionsweise impliziert, jedoch andererseits bakterielle ABC-Transporter im Vergleich zu ihren humanen Homologen eine höhere proteinbiochemische Stabilität aufweisen und damit eine funktionale Isolierung und *in vitro* Untersuchung erleichtern. Eine solche Vorgehensweise wurde bereits für die Histidin-Permease und den Maltose-Transporter erfolgreich angewandt. Ziel dieser Arbeit war somit eine *in vitro* Charakterisierung des osmoreaktiven ABC-Transporters OpuA aus *B. subtilis*, um das strukturelle und funktionale Verständnis der SBP-abhängigen ABC-Transporter durch Untersuchung eines weiteren Mitglieds dieser Klasse nicht nur zu festigen, sondern zu erweitern und zu vertiefen.

Um eine solche *in vitro* Charakterisierung von OpuA zu ermöglichen, mussten zunächst sämtliche Untereinheiten des OpuA Transporters, OpuAA, OpuAB und OpuAC, in isolierter Form oder als OpuAA/AB Komplex in ausreichender Menge und Reinheit vorliegen. Dazu sollten die entsprechenden Strukturgene in Fusion mit verschiedenen Affinitätspeptiden kloniert und Bedingungen etabliert werden, die eine rekombinante Produktion der Proteine in *E. coli* ermöglichen. Die Isolierung der Komponenten sollte anschließend durch chromatographische Methoden erfolgen, so dass sie in einer Reinheit und Homogenität vorlagen, die eine Kristallisation potentiell ermöglichen würde.

Im nächsten Schritt sollte eine funktionale Charakterisierung der OpuA Untereinheiten erfolgen. Dafür sollte die Aktivität und der oligomere Zustand der Untereinheiten analysiert und Parameter identifiziert werden, die diese beeinflussen. Um ein weiterführendes Verständnis der mechanistischen Abläufe zu ermöglichen, sollten Affinitäten und Stöchiometrien der verschiedenen oligomeren Protein/Ligand Komplexe untersucht werden. Hierzu sollten zwei unterschiedliche Strategien entwickelt werden: Die Verwendung von fluoreszierenden Ligand-Analogen bzw. die Analyse einer Ligand-sensitiven intrinsischen Tryptophan Fluoreszenz. Diese Methoden sollten es auch gestatten, potentielle Ligand-induzierte Konformationsänderungen zu detektieren.

Neben dieser funktionalen Charakterisierung sollten insbesondere strukturelle Untersuchungen zum mechanistischen Verständnis von OpuA beitragen. Mit Hilfe der Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse sollten strukturelle Aspekte wie beispielsweise die Architektur der Ligand-Bindetasche auf atomarem Niveau beantwortet werden. Andererseits konnten Fragestellungen wie die nach einer intermolekularen Orientierung der Untereinheiten durch Förster Resonanz Energietransfer (FRET) adressiert werden, dessen Vorteil in der Möglichkeit lag, Distanzänderungen zeitaufgelöst detektieren zu können.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit sollte die Analyse der Wechselwirkung der OpuA Komponenten sein. Dafür sollte der Einfluss der TMD und des SBP auf die ATPase Aktivität von OpuAA analysiert werden, da eine potentielle Aktivierung nicht nur ein Maß für die Interaktion der Komponenten wäre, sondern auch mit einer Signalübertragung durch Konformationsänderungen korreliert werden könnte.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Biologische Materialien, Plasmide und Oligodesoxynukleotide

E. coli Stämme:

DH5 α	F ⁻ <i>gyrA96</i> (Nal ^r) <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> (r _k -m _k +) <i>glnV44 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 [\square 80d Δ <i>lacZ</i> Δ M15], (Woodcock <i>et al.</i> , 1989) von Prof. R. Tampé, Universität Frankfurt.
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal [dcm]</i> (DE3), (Studier & Moffatt, 1986), (Wood, 1966) von Prof. R. Tampé, Universität Frankfurt.
BL21 (DE3) C41	wie BL21 (DE3) modifiziert nach (Miroux & Walker, 1996), von Prof. R. Tampé, Universität Frankfurt.
BL21 (DE3) C43	wie BL21 (DE3) modifiziert nach (Miroux & Walker, 1996) von Prof. R. Tampé, Universität Frankfurt.

Plasmide:

pBAD33-GFPuv	<i>araBAD^{p/o}</i> , <i>GFPuv</i> , <i>cat</i> (cam ^r), M13/p15 ori, (Guzman <i>et al.</i> , 1995) von Dr. M. Blight & Prof. B. Holland, Université Paris Sud, Frankreich.
pET21a(+)	T7 <i>lac^{p/o}</i> , <i>mcs</i> , <i>bla</i> (amp ^r), f1 ori (Studier & Moffatt, 1986) von Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach.
pBKB1	(Kempf & Bremer, 1995) von Prof. E. Bremer, Universität Marburg.
pBKB76	T7 <i>tac^{p/o}</i> , <i>MBP-Xa-OpuAC</i> , <i>bla</i> (amp ^r), (Kempf <i>et al.</i> , 1997) von Prof. E. Bremer, Universität Marburg.

Oligodesoxynukleotide wurden von MWG Biotech, München synthetisiert und in einer Stammlösung von 100 pmol/ μ L in Wasser bei 4 °C gelagert. T7-Sequenzierprimer wurden von Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach erworben.

Sequenzierprimer:

T7 _{Promotor} :	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7 _{Terminator} :	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
pBAD _{forward} :	5'-TAC TGT TTC TCC ATA CCC GTT TTT TTG GGC TAG AA
pBAD _{reverse} :	5'-ACC GCT TCT GCG TTC TGA TTT AAT CTG TAT CAG GC
Sequ1:	5'-CTC GTT GGA CTG GAA GGA TTT G

Oligodesoxynukleotide für Mutagenese und PCR:

CH7	5'-GGAATTCCATATGAGTGTAGATGAGAAACCAATTA
CH8	5'-ATA TAT AAA GCT TAT TAG TGA TGG TGA TGG TGA TGT TTC ACC TCC TGT GCA GAA GGA TCT TG

CH9	5'-GGAATTCCATATGGATAGACTGCCTAGAATACCTT
CH10	5'-ATA TAT AAA GCT TAT TAA CCA CCG AAC TGC GGG TGA CGC CAA GCG CTG GCA TTC CCC CTG CTT TTC TTC TT
CH11	5'-GGA ATT CCA TAT GCA TCA CCA TCA CCA TCA CAG TGT AGA TGA GAA ACC AAT TAA G
CH12	5'-ATA TAT AAA GCT TAT TAT TTC ACC TCC TGT GCA GAA GGA T
CH14	5'-GGC AAG CAT TTG AAC TGC TTT CTT TGT TTG TTG CCC
CH15	5'-GGG AAA CAA ACA AAG AAA GCA GTT CAA ATG CTT GCC
CH16	5'-ATA TAT AAA GCT TAT TAG TGA TGA TGG TGG TGG TGG TGA TGA TGG TGT TTC ACC TCC TGT GCA GAA GGA TCT TG
CH17	5'-GGA ATT CCA TAT GCA TCA CCA TCA CCA TCA CCA TCA CCA TCA CAG TGT AGA TGA GAA ACC AAT TAA G
CH21	5'-GGA ATT CCA TAT GCA TCA CCA TCA CCA TCA CGA TAG ACT GCC TAG AAT ACC TTT AGC A
CH22	5'-ATA TAT AAA GCT TAT CAG GCA TTC CCC CTG CTT TTC TTC T
CH25	5'-CTT TCC GTT GGC AAG CAC TTG AAC TGC CTT CTT
CH26	5'-AAG AAG GCA GTT CAA GTG CTT GCC AAG CCA AAG
CH28	5'-ATT AAC CCC AAC GGT ACA TCC GGT TGC TTT CAG
CH29	5'-CTG AAA GCA ACC GGA TGT ACC GTT GGG GTT AAT
CH30	5'-CTG CTG CAT CCC GCC GCA AAG CTG GTC GGG ATA
CH31	5'-TAT CCC GAC CAG CTT TGC GGC GGG ATG CAG CAG
CH40	5'-ATA TTG GTG TTC AAA ACA TTC CAG TGG AAC GAG
CH41	5'-CTC GTT GGA CTG GAA TGT TTT GAA CAC CAA TAT
CH44	5'-GAG CGC ACT GAA CGC TTG GTC CAT CAG AAG GAT
CH45	5'-ATC CTT CTG ATG GAC CAA GCG TTC AGT GCG CTC
CH46	5'-ATA TAT AAA GCT TAT TAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG TGA TGG GCA TTC CCC CTG CTT TTC TTC TT
CH47	5'-ATT CTT TGT TTG TTT CCC CCA AAT CTT AGA GAC
CH48	5'- GTC TCT AAG ATT TGG GGG AAA CAA ACA AAG AAG

2.1.2 Enzyme und sonstige Proteine

Avidin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Benzonase®	E. Merck KGaA, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA), Frakt. V	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ni ²⁺ /NTA Alkalische Phosphatase Konjugat	Quiagen GmbH, Hilden
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagen, Amsterdam, Niederlande
Pyruvat Kinase/Laktat Dehydrogenase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M; MBI Fermentas, Wilna, Litauen
Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP)	Amersham Buchler GmbH, Braunschweig

Konjugat	
T4 DNA Ligase (3 U/ μ L)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M, MBI Fermentas, Wilna, Litauen
Faktor Xa	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M

2.1.3 Chemikalien, Standards und Kits

Acrylamid-Stammlösung 30 %ig mit 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat, Na ₂ -Salz (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Adenosin-5'-diphosphat, Na ₂ -Salz (ADP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agar	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Agarose, <i>electrophoresis grade</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Aminosäuren (Lysin, Threonin, Isoleucin, Valin, Leucin, Phenylalanin, Cystein, Tryptophan)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumazetat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ammoniumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniummolybdat Tetrahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampicillin, Na-Salz (Amp)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
AMP-PNP, Li ₄ -Salz	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
L(+)-Arabinose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure	E. Merck KGaA, Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat- 4-Toluidinsalz (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
C ₁₂ E ₁₈	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
CHAPS	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Chloramphenicol (Cam)	Acros Organics, New Jersey, NJ, USA
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Citrat, Na ₃ -Salz Dihydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
CooMaße Brilliantblau R-250 (CBB)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
dNTP set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Takara Bio Inc., Otsu, Japan
D-Desthiobiotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxyd (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	BTS Biotech Trade GmbH, St Leon-Rot
n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Glycon GmbH, Luckenwalde
n-Decyl- β -D-maltosid (DM)	Glycon GmbH, Luckenwalde
EDTA, Na ₂ -Salz Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Essigsäure (AcOH), p.a., technisch	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol (EtOH), p.a., technisch	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid (1% w/v in Wasser)	E. Merck KGaA, Darmstadt

Ethylenglykol	
N-Ethylmaleinimid (NEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D(+)-Glucose Monohydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Formaldehyd (37 % (v/v))	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Glycin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycin-Betain (GB)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Hefe-Extrakt	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure (HABA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Imidazol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol (p.a., technisch)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	BTS Biotech Trade GmbH, St Leon-Rot
Kaliumacetat (KOAc)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxyd	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kobaltchlorid Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kupferchlorid Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Lauryl-Dimethylamin-Oxid (LDAO)	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Magnesiumchlorid Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat Hydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid Tetrahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
□-Merkaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Methanol (MeOH)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumacetat (NaOAc)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxyd	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Nikotin-Adenin-Dinukleotid, reduziert (NADH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nitro-Tetrazolium Blau (NBT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
n-Octyl-□-D-Glukopyranosid (OG)	Glycon GmbH, Luckenwalde
Oregon Green [®] 488-Maleinimid (OG)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Phosphoenolpyruvat, K-Salz (PEP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polyethylenglykol 4000 (PEG)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Prolin-Betain (PB)	Extrasynthese, Genay, Frankreich
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	WTW, Weilheim
Salzsäure (37 % w/v)	E. Merck KGaA, Darmstadt
L-Selenomethionin (SeMet)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Taurocholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Texas Red [®] C ₂ -Maleinimid (TR)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Thyaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Thiosulfat Pentahydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2', 3'-O-(2, 4, 6-trinitrophenyl)-Adenosin 5' triphosphat (TNP-ATP)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
2', 3'-O-(2, 4, 6-trinitrophenyl)-Adenosin 5' diphosphat (TNP-ADP)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Triton X-100 [®] , X-114 [®] (TX-100, TX-114)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tween 20 [®]	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zinksulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Zwittergent 3-12	Calbiochem, La Jolla, CA, USA

DNA-Größenstandards:

100 bp DNA Leiter	New England Biolabs, Frankfurt/Main
1 kb DNA Leiter	New England Biolabs, Frankfurt/Main

Protein-Größenstandards für SDS-PAGE:

Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, Wilna, Litauen

Protein-Größenstandards für Gelfiltration:

Molecular Weight Marker Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
-----------------------------	--------------------------------------

Kits zur DNA-Isolierung und Reinigung:

QIAprep Plasmid Midiprep und Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden

2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterial**Optische Geräte:**

Fluoreszenz-Spektrometer, Cary-Eclipse	Varian, Malgrave Victoria, Australien
UV-VIS-Spektrometer, Cary 50-Bio	Varian, Malgrave Victoria, Australien
ELISA-Lesegerät, Polarstar Galaxy	BMG Labortechnologie GmbH, Jena
UV-Küvetten; 600 µL, 1.500 µL	Hellma GmbH & Co. KG, Mülheim

Inkubatoren:

Innova 4330-Schüttler (kühlbar)	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
---------------------------------	--

Infors-Schüttler
Heraeus Brutschrank

Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Kendro GmbH, Rodenbach

Zentrifugen:

Beckmann L-70 Ultrazentrifuge
Sorvall RC 5 B Plus
Sorvall RC 3 C Plus
Tischkühlzentrifuge Biofuge primo R

Beckmann Instruments GmbH, München
Kendro GmbH, Rodenbach
Kendro GmbH, Rodenbach
Kendro GmbH, Rodenbach

Elektrotransfer und Elektrophorese:

Transblot SD (Semi Dry Transfer Cell)
Electrophoresis Power Supply EPS 200
Elektrophoreseapparaturen
Glasplatten, Taschenformer, Abstandhalter

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Technische Werkstätten, Universität Marburg
Technische Werkstätten, Universität Frankfurt

Chromatographieanlagen:

Äkta Explorer
FPLC-System;
Pump P-500, Control Unit UV-1, REC-102, Programmer GP-250 Plus, Frac-100
GradiFrac;
Pump P-1, Uvicord SII, Rec-102

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Andere Geräte:

Thermocycler T-personal
Thermoblock, Thermomixer compact
Autoglav, 5075 ELVC
Branson Sonfier 250
Milli-Q⁵⁰ Plus Anlage
Druckzelle, Amicon 8200
Präzisionswaage, Kern 770
PH-Meter, inoLab
Gilson Pipetten; P-2, -10, -20, -200, -1000
Vortexer, Vortex-Genie²
Magnetrührer, IKAMAG²-Reo

Whatman Biometra GmbH, Göttingen
Eppendorf AG, Hamburg
System GmbH, Wetzlar
Heinemann Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
Millipore, Eschborn
Millipore, Eschborn
Kern & Sohn GmbH, Balingen
WTW, Weilheim
Abimed, Langenfeld
Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Janke und Kunkel GmbH, Staufen i. Breisgau

Verbrauchsmaterial:

Reaktionsgefäße; 1 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL
Pipettenspitzen; klar, gelb, blau
Einmalspritzen; 1 mL
Einmalspritzen; 5 mL, 20 mL
Injektionskanülen
Spritzenfilter steril, Rotilabo², 0,45 µM
PS Microplatte, 96 well
Nitrozellulosemembran, Immobilon-P

Greiner Bio-One GmbH, Nümbrecht
Greiner Bio-One GmbH, Nümbrecht
Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Braun Melsungen AG, Melsungen
Braun Melsungen AG, Melsungen
Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Greiner Bio-One GmbH, Nümbrecht
Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Konzentrationszellen, Amicon [□] Ultra-15, Ultrafree-0,5, 5 und 10 kDa MWCO	Millipore, Eschborn
Ultrafiltrationsmembran für Amicon [□] 8200 Polyethersulfon, 10 kDa MWCO	Millipore, Eschborn

Säulen und Chromatographiematerial:

HiTrap-Chelating [□] ; 1 mL, 5 mL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HiTrap Q [□] ; 1 mL, 5 mL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex 200 HR 10/30; 24 mL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex 200 <i>prepgrade</i> ; 120 mL, 350 mL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Strep-Tactin [□] Sepharose	IBA GmbH, Göttingen
Amylose-Agarose	New England Biolabs, Frankfurt/Main
PD-10 Säule	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.5 Puffer, Medien und Stammlösungen

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Lösungen mit Milli-Q⁵⁰-gereinigtem Wasser, im Fall von Nährmedien für Bakterienkulturen mit entionisiertem Wasser hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert. Für die Arbeit mit Bakterien und DNA wurden alle Medien und Lösungen entweder im Autoclaven oder durch Filtration sterilisiert. Die zur Chromatographie verwendeten Lösungen wurden entgast und bei 4 °C gelagert.

Antibiotika- und Induktorlösungen (Lagerung bei -20 °C):

1000 fach Ampicillin Lösung	100 mg/mL
L(+)-Arabinose	20 % (w/v)
1000 fach Chloramphenicol Lösung	30 mg/mL in 70 % (v/v) EtOH p.a.
Isopropylthiogalaktosid	1 M

Luria-Bertani (LB) Medium:

Pepton aus Casein	10 g/L
Hefe-Extrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L
Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen.	

Kulturplatten:

LB-Medium versetzt mit Agar	15 g/L
und Antibiotikumslösung	

Mineralsalzlösung:

Na ₂ HPO ₄ •2 H ₂ O	31 mM
KH ₂ PO ₄	19 mM
NH ₄ Cl	25 mM
Na ₃ -Citrat•2 H ₂ O	5,0 mM

Spurenelementlösung:

MnCl ₂ •4 H ₂ O	3,0 g/L
CuCl ₂ •6 H ₂ O	0,3 g/L
H ₃ BO ₃	0,6 g/L
CoCl ₂ •6 H ₂ O	0,5 g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4 H ₂ O	1,2 g/L
EDTA	4 mM

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:TAE-Puffer:

Tris	40 mM
AcOH	20 mM
EDTA	1,0 mM

TBE-Puffer:

Tris	89 mM
H ₃ BO ₃	89 mM
EDTA	2,0 mM

Puffer für SDS-PAGE, Elektrotransfer und Western Blot:4 fach Lower Tris:

Tris/HCl pH 8,85	3,0 M
SDS	4,0 g/L

4 fach Upper Tris:

Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
SDS	4,0 g/L

Laufpuffer nach Fling & Gregerson (pH 8,8):

Tris	50 mM
Glycin	190 mM
SDS	1,0 g/L

Blotpuffer:

Laufpuffer versetzt mit	
MeOH	20 % (v/v)

PBS (pH 7,4) :

Na ₂ HPO ₄ •2 H ₂ O	16 mM
KH ₂ PO ₄	4,0 mM
NaCl	115 mM

PBST (pH 7,4):

PBS versetzt mit	
Tween [□] 20	0,1 % (v/v)

TBS (pH 8,0):

Tris/HCl pH8,0	20 mM
NaCl	0,25 M

TBST (pH 8,0):

TBS versetzt mit	
Tween [□] 20	0,1 % (v/v)

Probenauftragspuffer:10 fach Auftragspuffer für Agarosegele:

Bromphenolblau	1,0 mg/mL
Xylencyanol	1,0 mg/mL
Glycerin	50 % (v/v)

5 fach Auftragspuffer für SDS-PAGE:

Tris/HCl pH 8,0	0,25 M
SDS	7,5 % (w/v)
Glycerin	25 % (v/v)
Bromphenolblau	0,25 mg/mL
□-Merkaptoethanol	12,5 % (v/v)

Puffer für die Chromatographie:Low Imidazole (LI)-Puffer:

NaP _i pH 8,0	50 mM
NaCl	0,1 M
Imidazol	10 mM

K Puffer:

KP _i pH 8,0	50 mM
KCl	0,2 M
Glycerin	20 % (v/v)

B Puffer:

NaP _i pH 7,5	10 mM
EDTA	0,1 mM

Hochsalz (HS) Puffer:

B Puffer mit NaCl	1M
-------------------	----

Niedrigsalz (LS) Puffer:

B Puffer mit NaCl	150 mM
-------------------	--------

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli* Stämmen

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf einer Petrischale mit Agar-Medium und Inkubation im Brutschrank über Nacht bei 37 °C erhalten. Bei plasmidtragenden *E. coli* Stämmen wurde ein mit einem geeigneten Antibiotikum versetztes LB-Medium verwendet. Die bebrüteten Agar-Platten wurden bei 4 °C zur Konservierung gelagert und waren für mehrere Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendbar.

Flüssigkulturen wurden in der Regel mit LB-Medium unter Zusatz eines geeigneten Antibiotikums angesetzt. Verwendete Volumina waren 4 mL in 15 mL Glas-Kulturröhrchen, sowie 50 mL und 1 L in 0,25 L und 2 L Erlenmeyerkolben, jeweils mit einem Verschluss aus Aluminiumfolie. Die kleineren Kulturen (4 mL und 50 mL) wurden direkt mit jeweils einer Kolonie von der Agar-Platte oder mit 50 µL aus einer Glycerinkultur, die größeren Kulturen mit einer stationären Übernachtskultur im Verhältnis 1:50 angeimpft.

Übernachtskulturen für die Isolierung von Plasmid DNA wurden bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm für 16 h inkubiert. Zur Proteinproduktion wurden Übernachtskulturen bei 37 °C oder 30 °C (zum Animpfen von Hauptkulturen bei einer Wachstumstemperatur von 30 °C bzw. 22 °C) unter Schütteln bei 200 rpm für 16 h inkubiert. Zelldichten wurden durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm (OD_{550}) mit einem Spektralphotometer bestimmt.

Zur dauerhaften Konservierung der *E. coli* Stämme wurden Glycerinkulturen angelegt, indem 0,5 mL einer stationären Übernachtskultur mit 1,5 mL 85 % (v/v) sterilem Glycerin gemischt und bei -20 °C aufbewahrt wurden.

2.2.2 Isolierung von DNA aus *E. coli*

Für die Analyse von Transformanten nach der Neukonstruktion von Plasmiden wurde Plasmid DNA aus *E. coli* mit Hilfe der Plasmid Isolierungskits der Firmen Qiagen isoliert. Diese beruhen auf der Methode der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979), gefolgt von der Immobilisierung der Plasmid DNA an einem Trägermaterial wie z.B. ein Anionentauscher mehreren Waschschritten und der abschließenden Elution der DNA bei niedriger Ionenstärke. Zur Abtrennung von Salzen wurde die erhaltene Plasmid DNA nachfolgend einer Ethanol-fällung unterzogen.

Für „low-copy“-Plasmide, mit einer Kopienzahl von 1-10 Plasmiden pro Zelle, erfolgte die Isolierung im „Midi“-Maßstab, und für „high-copy“-Plasmide, mit einer Kopienzahl von mehr als 100 Plasmiden pro Zelle, erfolgte die Isolierung im „Mini“-Maßstab. Dazu wurde eine stationäre 50 mL bzw. 4 mL Übernachtskultur verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verarbeitet. Die Plasmid DNA wurde im letzten Schritt in TE Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Die Ausbeute an isolierter Plasmid DNA betrug bei diesen Isolationsverfahren 5-10 µg DNA und wurde direkt zur Hydrolyse mit Restriktionsenzymen, zur Sequenzierung oder zur Transformation eingesetzt.

2.2.3 Transformation von *E. coli* mit Plasmid DNA

Für die Aufnahme von Plasmid DNA wurden *E. coli* Zellen in eine transformationskompetente Form überführt. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit nach der CaCl₂-Methode (Cohen *et al.*, 1972; Sambrook, 1989) vorgegangen, die typischerweise 10⁵-10⁶ Transformanten pro µg Plasmid DNA lieferte.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

50 mL LB-Medium werden mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli* Stammes im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer optischen Dichte OD₅₅₀ = 0,5 bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Die Kultur wird in ein 50 mL Plasikröhrchen überführt und in einer Tischkühlzentrifuge bei 4 °C für 10 min und 4.000 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wird nach sorgfältiger Trennung vom Medium in 40 mL auf 4 °C gekühlter und steriler 0,1 M MgCl₂ Lösung resuspendiert. Die Zellen werden wie bereits beschrieben zentrifugiert, in 20 mL auf 4 °C gekühlter und steriler 50 mM CaCl₂ Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen wie bereits beschrieben sedimentiert und in 2 mL auf 4 °C gekühlter und steriler CaCl₂/Glycerin Lösung (50 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin) aufgenommen. Die Zellsuspension wird in Aliquots von 200 µL auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei -80 °C eingefroren.

Für die Transformation werden 200 µL der frisch hergestellten oder auf Eis aufgetauten Zellsuspension mit 1 ng der Plasmid DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation von 5 min bei 37 °C wird die gesamte Suspension in ein mit 2 mL LB-Medium gefülltem sterilem 15 mL Kulturröhrchen überführt und für 45 min bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. 100 µL der Zellsuspension werden auf einer mit Antibiotikum versetzten LB-Agar-Kulturplatte ausgestrichen. Die übrige Kultur wird wie beschrieben zentrifugiert, das Medium abgezogen, die Zellen im verbleibenden Flüssigkeitsrest resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Beide Platten werden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.4 Gelelektrophorese, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook, 1989) verwendet. Dieses Verfahren wurde zur analytischen Restriktionsanalyse von Plasmiden oder zur präparativen Isolierung von DNA Fragmenten durchgeführt.

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden Gele mit 1 % (w/v) Agarose für Fragmente von 0,8 kb – 10 kb, 1,5 % (w/v) Agarose für Fragmente von 0,2 kb – 0,8 kb und 2 % (w/v) Agarose für Fragmente bis 0,2 kb verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 50 mL TAE Puffer suspendiert und erhitzt. Die unter Sieden entstandene klare Lösung wurde auf Handwärme abgekühlt und 1:10.000 (v/v) mit einer 1 % (w/v) Ethidiumbromid Lösung versetzt. Die Flüssigkeit wurde zum Durchmischen kurz geschwenkt und sofort in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformer gegossen. Die Abmessungen des Gels betragen 10 cm in der Länge, 7,5 cm in der Breite und 0,5 cm in der Höhe. Das erstarrte Agarosegel wurde nach Entfernen des Geltaschenformers in eine mit TAE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die DNA Probe, 10 µL bei Restriktionsanalysen und 50 µL bei präparativer Isolierung, wurde 1:10 (v/v) mit 10 fach Auftragspuffer versetzt und in die Taschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V für eine Dauer von 1 h betrieben. Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA Fragmente wurden durch Bestrahlen mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und zur Dokumentation mit einer Digitalkamera fotografiert.

Bei präparativer Isolierung von DNA Fragmenten wurde hierbei UV-Licht mit verminderter Intensität verwendet, um Strahlenschäden an der DNA zu vermeiden. Das Gelstück mit dem gewünschten DNA Fragment wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Abtrennung der Agarose von der DNA wurde unter Verwendung des Nucleo-Spin Extraction Kits nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurde die DNA an ein Anionentauschermaterial gebunden, gewaschen und anschließend mit 20 µL TE Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Lösung bei 4 °C gelagert.

Die Konzentration von Plasmid DNA oder gereinigten DNA Fragmenten erfolgte spektroskopisch durch Absorptionsmessung bei 260 nm, wobei eine $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 ng/µL doppelsträngiger DNA entsprach. Alternativ wurden DNA Konzentrationen in einer Agarose-Gelelektrophorese anhand eines DNA Standards abgeschätzt.

2.2.5 Enzymatische Modifizierung von DNA

Für die Restriktionsanalyse (Sambrook, 1989) von Plasmiden, die Präparation von Fragmenten aus Plasmiden oder PCR Produkten wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Dabei wurde das Puffersystem der Firma New England Biolabs verwendet. Die Wahl des optimalen Puffers (als 10 fache Stammlösung) und eventueller Zusätze wie z.B. BSA bei Restriktion mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Spaltungen mit mehreren Restriktionsenzymen, die unterschiedliche Reaktionstemperaturen oder Pufferbedingungen benötigten, wurden sequenziell durchgeführt.

Bei einer Restriktionsanalyse wurde 0,5 µg Plasmid DNA mit je 2-5 U einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen in einem Volumen von 10 µL gespalten. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 1 h bei der für die optimale Aktivität des Enzyms empfohlenen Temperatur. Spaltungen im präparativen Maßstab wurden in einem Volumen von 50 µL mit 2-5 µg DNA und jeweils 20 U der Restriktionsendonukleasen für mindestens 2 h durchgeführt. Zur Abtrennung der Restriktionsendonukleasen wurde die DNA abschließend mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kit nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

Die Ligierungsreaktion wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µL bei einer Temperatur von 16 °C durchgeführt, wobei in der Regel über Nacht inkubiert wurde. Die DNA Menge im Reaktionsansatz betrug typischerweise jeweils 50 fmol des Vektorfragmentes, mit Replikationsursprung und Antibiotika-Resistenzgens, und 150 fmol des Genfragments. Im Ansatz befanden sich außerdem 3 U Ligase sowie der vom Hersteller mitgelieferte Puffer. Als Negativkontrolle wurde eine Ligierungsreaktion in Abwesenheit des Genfragments durchgeführt. 5 µL des Ansatzes bzw. der Kontrolle wurden jeweils für eine Transformation von *E. coli* DH5α Zellen eingesetzt.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. PCR) (Saiki *et al.*, 1988) wurde zu zwei verschiedenen Zwecken durchgeführt: Der selektiven Amplifizierung von Genen und zum gerichteten Austausch einzelner Aminosäurekodons in Genen. Für die im ersten Fall eingesetzten Oligodesoxynukleotide (engl. *Primer*) flankierten den zu amplifizierenden Bereich und besaßen an ihrem 3'-Ende eine mindestens 15 Basen lange zur Matrizen DNA komplementäre Sequenz. Die nicht komplementären Überhänge am 5'-Ende besaßen Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme und kodierten für Peptide, die an das Genprodukt angehängt werden sollten.

Für den zweiten Fall wurde eine zweistufige PCR durchgeführt. Die Sequenz der zwei komplementären Mutationsprimer enthielt das auszutauschende Kodon flankiert von einer jeweils 15 Basen langen zur Matrizen DNA komplementären Sequenz. In der ersten Stufe wurden in zwei parallelen PCRs unter Verwendung der flankierenden und der Mutationsprimer ein 5'- und 3'-Fragment des Gens amplifiziert, die im Bereich der Mutation überlappten. Diese Fragmente dienten als Matrize für die zweite PCR Stufe, in der nur die flankierenden Primer eingesetzt wurden.

Für alle PCR-Reaktionen wurde die *Pfu* DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991) eingesetzt, die sich aufgrund ihrer 3' zu 5'-Exonukleaseaktivität (engl. *proofreading*) durch eine niedrige Fehlerrate auszeichnete. Der Standardreaktionsansatz für eine PCR enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µL zwischen 0,1 und 10 ng Matrizen DNA und je 25 pmol der beiden Primer. Weiterhin enthielt der Ansatz 5 µL 10 fachen *Pfu*-Puffer (200 mM Tris/HCl, pH 8,8, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1,0 % Triton X-100, 1 mg/mL BSA) und 4 µL dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Nach Auffüllen mit Wasser wurde der Reaktionsansatz im Thermocycler zwecks Denaturierung der DNA für 2 min auf 94 °C erhitzt. Dann wurden 2,5 U der Polymerase bei 94 °C zugegeben und das PCR Programm gestartet. In typischerweise 25 Zyklen wurde für je 1 min bei 94 °C (Denaturierung des DNA Doppelstranges), für 1 min bei 62 °C (Hybridisierung der Primer an die DNA Matrize) und für 2,5 min bei 73 °C (Polymerasereaktion) inkubiert. Eine abschließende Inkubation erfolgte für 7 min bei 73 °C (Komplettierung der Syntheseprodukte). Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Reaktionsansatz ohne Matrizen DNA mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen nachzuweisen.

Die Produkte der PCR Reaktion wurden grundsätzlich in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert und im Fall störender Nebenprodukte aus dem Gel isoliert. Soweit keine Nebenprodukte nachweisbar waren, wurde das PCR Produkt mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kit nach den Angaben des Herstellers gereinigt und soweit notwendig mit Restriktionsendonukleasen geschnitten.

2.2.7 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Durch Mutagenese veränderte oder durch PCR amplifizierte DNA Abschnitte wurden vollständig der automatisierten Sequenzanalyse unterworfen. Dazu wurde zirkuläre doppelsträngige Plasmid DNA unter Verwendung fluoreszierender Terminatoren und spezifischer Sequenzierprimer einem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) unterzogen. Sämtliche Sequenzierungen erfolgten durch die Firma Scientific Research and Development GmbH, Oberursel.

2.3 Gentechnische Methoden

2.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden rekombinante Proteine heterolog in *E. coli* produziert. Die hierfür verwendeten Plasmide zur Expression des Fremdgens zeichneten sich durch unterschiedliche Gene zur Vermittlung einer Antibiotikaresistenz und unterschiedliche Promotor/Operator-Systeme aus. Dabei wurden i) das durch L(+)-Arabinose induzierbare Expressionsplasmid pBAD33 (Guzman *et al.*, 1995) mit dem araBAD Promotor/Operator und dem Chloramphenicol-Acetyltransferase Gen und ii) die durch IPTG induzierbaren Expressionsplasmide pET21a(+) (Studier & Moffatt, 1986) bzw. pBKB76 (Kempf *et al.*, 1997) mit lac/T7- bzw. tac/T7-Promotor/Operator und dem β -Lactamase Gen verwendet. In letzterem Fall erforderte die Transkription des Fremdgens die Anwesenheit der T7-RNA Polymerase, die beispielsweise im *E. coli* Stamm BL21(DE3) (Studier & Moffatt, 1986) durch einen λ Prophagen kodiert ist.

Die löslichen Proteine OpuAA und OpuAC wurden aus der zytosolischen Proteinfraction von *E. coli* BL21(DE3) gewonnen. Für die Produktion des Membranproteins OpuAB wurden die modifizierten *E. coli* Stämme C41 und C43 (Miroux & Walker, 1996) verwendet und das rekombinante Protein aus den bakteriellen Membranen isoliert. Für eine Produktion von OpuAA/AB wurde ein mit pBAD33 und pET21a(+) transformierter *E. coli* C41 Stamm verwendet, wobei die Expressionsplasmide jeweils eines der beiden Fremdgene trug. Dies erforderte die Zugabe zweier Antibiotika (Ampicillin und Chloramphenicol) zum Kulturmedium und eine parallele Induktion mit L(+)-Arabinose und IPTG.

2.3.1.1 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli* Kulturen in LB-Medium

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Zur Anzucht wird 1 L LB-Medium, das mit geeigneten Antibiotika versetzt ist, in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit 40 mL einer stationären Übernachtskultur des mit dem (den) entsprechenden Plasmid(en) transformierten *E. coli* Stammes angeimpft. Die Inkubation erfolgt bei 25 °C bzw. 30 °C, wobei die Kultur mit 200 rpm geschüttelt und ihr Wachstum durch regelmäßige Probenentnahme zur Messung der optischen Dichte verfolgt wird. Bei $OD_{550} = 0,6 - 0,8$ wird durch Zugabe eines oder mehrerer Induktoren die Genexpression induziert. Die Induktionsdauer beträgt, abhängig von Stamm und Vektor, 1,5-3 Stunden.

Die Kultur wird dann in einen 1 L Zentrifugenbecher gegossen, und die Bakterien bei 4 °C für 15 min und 5.000 rpm in einer Sorvall RC 3 C Plus Zentrifuge sedimentiert. Der Medienüberstand wird vollständig dekantiert und die sedimentierten Zellen in 15 mL kalten

PBS Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird abschließend in einer Tischkühlzentrifuge bei 4 °C für 15 min und 5.000 rpm zentrifugiert und das Zellsediment bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

2.3.1.2 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli* Kulturen in Minimalmedium

Zur Produktion von OpuAC wurden die mit Expressionsplasmid pBKB76 transformierten Zellen in einem Glukose-Minimalmedium angezogen. Dies ermöglichte einerseits eine Selenomethion (SeMet) Markierung des Proteins und verhinderte andererseits eine unselektive Bindung kompatibler Solute, die in LB-Medium enthalten sind, an OpuAC.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Zu 900 mL Mineralsalzlösung werden folgende sterile Lösungen gegeben: 100 mL 20 % (w/v) Glukose Lösung, 10 mL 1 M MgSO₄-Lösung, 1mL Thiamin/HCl Lösung, 1mL Spurenelementlösung, je 0,5 mL 35 g/L HCl saure FeCl₃·6H₂O Lösung und 8 g/L Zn(OAc)₂·2H₂O und 1 mL Ampicillin Stammlösung. 40 mL einer stationären Übernachtskultur des mit pBKB76 transformierten *E. coli* Stammes werden in ein 50 mL Plasikröhrchen überführt und in einer Tischkühlzentrifuge bei 4 °C für 10 min und 5.000 rpm zentrifugiert. Nach sorgfältiger Trennung vom Medium wird das Zellsediment in 15 mL Mineralsalzlösung resuspendiert, und das Medium mit dieser Zellsuspension angeimpft.

Im Fall einer SeMet-Markierung des Proteins werden 15 min vor Induktion der Genexpression dem Medium folgende Aminosäurelösungen zugesetzt, die die Methion-Biosynthese in *E. coli* inhibieren: je 10 mL Aminosäurelösung 1 (Lysin, Phenylalanin, Threonin, je 10 mg/mL), Aminosäurelösung 2 (Isoleucin, Valin und Leucin, je 5 mg/mL) und L-SeMet (6 mg/mL) (Doublie, 1997).

Die Kultur wird bei einer OD₅₅₀ = 0,8 für 2,5 h induziert und anschließend wie in Kapitel 2.3.1.1 beschrieben geerntet.

2.3.1.3 Isolierung der zytosolischen Proteinfraction aus *E. coli*

Das bei –20 °C gelagerte Zellsediment wurde über Nacht bei 4 °C aufgetaut und anschließend in einem für den sich anschließenden Chromatographieschritt geeigneten Puffer resuspendiert. Im Fall von Membranproteinen wurde dem Puffer zusätzlich 10 % (v/v) Glycerin zugesetzt. Die Zellsuspension wurde mit 1:10 (v/v) 10 mg/mL Lysozym Lösung, 1:100 (v/v) 100 mM N-Ethylmaleinimid Lösung und 200 U Benzonase versetzt und 30 min bei 4 °C gerührt. Anschließend wurden die Zellen im Eisbad durch eine zweimalige Ultraschallbehandlung für jeweils 5 min mit Hilfe eines Branson Sonifier 250 bei einem *duty cycle* von 25 % und einer *output control* der Stärke 6 aufgebrochen. Unlösliche Bestandteile, die Membranfragmente und Vesikel enthielten, wurden durch Zentrifugation in einer Ultra-

zentrifuge bei 4 °C für 45 min und 100.000 g von der löslichen Proteinfraction abgetrennt, aus der das rekombinante Protein durch anschließende Affinitätschromatographie isoliert wurde.

2.3.1.4 Isolierung der Membran-assoziierten Proteinfraction aus *E. coli*

Bakterielle Membranen wurden, wie in Kapitel 2.3.1.3 beschrieben, von der löslichen Proteinfraction getrennt und für die Isolierung des rekombinanten Membranproteins verwendet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Nach Abtrennung der löslichen Proteinfraction werden die bakteriellen Membranen aus 1 L *E. coli* Kultur mit Hilfe eines *Potters* in 15 mL des für den anschließenden Chromatographieschritt geeigneten Puffers unter Zusatz von 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Für die Präparation von OpuAA/AB wird dazu generell K Puffer verwendet. Zur Solubilisierung der Membranproteine wird die Suspension mit Detergenz versetzt, wobei die Endkonzentration des Detergenz seiner 5 - 10 fachen kritischen Mizellenkonzentration (cmc) entspricht z. B. 2 % (w/v) DDM aus einer 10 % (w/v) Stammlösung. Die Suspension wird für 1 h bei 4 °C inkubiert und anschließend in einer Ultrazentrifuge bei 4 °C für 1 h und 100.000 g zentrifugiert. Aus dem löslichen Überstand wird das rekombinante Protein durch Affinitätschromatographie isoliert.

2.3.1.5 Isolierung des Gesamtzellproteins aus *E. coli*

Für analytische Zwecke wie beispielsweise der Überprüfung einer Proteinproduktion von *E. coli* Kulturen wurde Gesamtzellprotein aus *E. coli* Kulturen isoliert und anschließend durch SDS-PAGE bzw. *Western Blotting* untersucht.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

1 mL *E. coli* Kultur wird in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und wie folgt zentrifugiert: Tischzentrifuge bei RT für 5 min und 5.000 rpm. Der Überstand wird vollständig entfernt und das Zellsediment in 80 µL Benzonase Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5mM MgCl₂) resuspendiert. Die Suspension wird mit 20 µL SDS-PAGE Auftragspuffer und 50 U Benzonase versetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Im Allgemeinen werden 5 - 10 µL der Lösung in einer SDS-PAGE analysiert.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Chromatographische Methoden

Bakteriell produzierte Proteine wurden mit Hilfe von Affinitätspeptiden (engl. *tag*) oder Affinitätsproteinen an ihrem Amino- oder Carboxyterminus aus der Zytoplasma- bzw. der solubilisierten Membranfraktion isoliert. Proteine, die das Strep-*tag* trugen, wurden dabei mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt (Schmidt & Skerra, 1993). Für die Reinigung von Proteinen mit dem His₆- bzw. His₁₀-*tag* wurde die Metallchelate-Affinitätschromatographie (Hochuli, 1988) verwendet. Weiterhin wurde die Amylose-Affinitätschromatographie (Kellermann, 1982) für Proteine eingesetzt, die mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP) fusioniert waren. Zusätzlich zu den beschriebenen affinitätschromatographischen Verfahren wurden Proteine einer Gelpermeationschromatographie (GPC) unterzogen, um lösliche Proteinaggregate von Protein mit einem definierten oligomeren Zustand abzutrennen oder den Oligomerisierungszustand des Proteins zu bestimmen.

Für sämtliche chromatographische Verfahren wurden entweder FPLC Systeme oder Systeme mit peristaltischer Pumpe verwendet. Die Chromatographie wurde durch Messung der Proteinkonzentration mittels eines UV/VIS-Durchflussphotometers bei, soweit nicht anders vermerkt, 280 nm dokumentiert.

Im Falle einer Reinigung eines Membranproteins enthielten sämtliche für die Chromatographie verwendeten Puffer zusätzlich zu den angegebenen Komponenten 10 % (v/v) Glycerin und 0,05 % (w/v) DDM oder 0,05 % (v/v) Triton X-100. Die Isolierung des OpuAA/AB Komplex erfolgte in K Puffer unter Zusatz von Detergenz.

2.4.1.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie

In *E. coli* produzierte Proteine, die C-terminal mit dem Strep-*tag* bzw. N-terminal mit dem Strep-*tag* II fusioniert waren, wurden durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt (Schmidt & Skerra, 1993). Dabei wurde das rekombinante Protein über das Strep-*tag* reversibel an das Streptavidin der Säulenmatrix gebunden, während Proteine ohne Affinitätsanhängsel die Säule passierten und durch Waschen entfernt wurden. Das Zielprotein wurde daraufhin mit D-Desthiobiotin kompetitiv eluiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Üblicherweise werden 3 mL Strep-Tactin[®] Gelmaterial mit einem Beladungsgrad von 50-100 nmol/mL Gelmaterial für die Reinigung verwendet. Die Säule wird mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe mit einer Flussrate von 1 mL/min betrieben und zunächst mit SA Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) bis zum Erreichen einer stabilen

Basislinie äquilibriert. Die in SA Puffer vorliegende Proteinlösung aus einer 2 L *E. coli* Kultur wird mit 1:100 (v/v) Avidin (2 mg/mL in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0) versetzt und für 15 min bei 4 °C inkubiert, um biotinylierte Proteine mit Avidin zu maskieren. Anschließend wird die Proteinlösung auf die Säule aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen. Nach dem Waschen mit SA Puffer bis zum erneuten Erreichen der Basislinie wird das über das Streptag an die Säule gebundene Protein mit 2,5 mM D-Desthiobiotin in SA Puffer eluiert. Fraktionen zu 1 mL werden aufgefangen und durch SDS-PAGE auf ihren Gehalt an rekombinantem Protein und dessen Reinheit analysiert. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Regenerierung des Säulenmaterials wird dieses mit 10 Säulenvolumina 5 mM HABA in SA Puffer gespült, um das D-Desthiobiotin zu eluieren. HABA wird durch Spülen mit SA Puffer ausgewaschen.

2.4.1.2 Amylose-Affinitätschromatographie

In *E. coli* produzierte Proteine, die N-terminal mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP) fusioniert waren, wurden durch Amylose-Affinitätschromatographie gereinigt (Kellermann, 1982). Dabei wurde das rekombinante Protein über das MBP reversibel an die Amylose der Säulenmatrix gebunden, während Proteine ohne Affinitätsanhängsel die Säule passierten und durch Waschen entfernt wurden. Das Zielprotein wurde daraufhin kompetitiv mit Maltose Lösung eluiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Üblicherweise werden 10 mL kovalent an Agarose gekoppelte Amylose mit einem Beladungsgrad von 3 mg MBP/mL Gelmaterial für die Reinigung verwendet. Die Säule wird mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe mit einer Flussrate von 1 mL/min betrieben und zunächst mit AM Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie äquilibriert. Die in AM-Puffer vorliegende Proteinlösung aus einer 1 L *E. coli* Kultur wird auf die Säule aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen. Nach dem Waschen mit AM Puffer bis zum erneuten Erreichen der Basislinie wird das über das MBP an die Säule gebundene Protein mit 10 mM Maltose in AM Puffer eluiert. Fraktionen zu 1 mL werden aufgefangen und durch SDS-PAGE auf ihren Gehalt an rekombinantem Protein und dessen Reinheit analysiert. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Regenerierung des Säulenmaterials wird dieses mit 10 Säulenvolumina 0,1 % (w/v) SDS-Lösung in AM Puffer gespült, um bakterielle Amylosen zu eluieren. SDS wird abschließend durch Spülen mit AM Puffer ausgewaschen.

2.4.1.3 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

In *E. coli* produzierte Proteine, die am N- oder C-Terminus mit dem His₆-, bzw. His₁₀-tag fusioniert waren, wurden durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt (Hochuli, 1988). Als Säulenmaterial diente dabei an Sepharose gebundene Iminodiessigsäure in vorgepackten HiTrap-Chelating[®] Säulen mit einem Beladungsgrad von 25 µmol Zn²⁺/mL Matrix. Üblicherweise wurden Säulen mit 1 mL bzw. 5 mL Gelmatrix zur Reinigung von rekombinantem OpuAB bzw. OpuAA aus jeweils 2 L *E. coli* Kultur verwendet. Als Übergangsmetallion wurde Zn²⁺ verwendet, das mit den spezifischen Metallbindungsstellen des His₆-, bzw. His₁₀-tags in Wechselwirkung tritt, während Proteine ohne Affinitätsanhängsel die Säule passierten oder bei Imidazolkonzentrationen von weniger als 50 mM eluierten. Das Zielprotein wurde anschließend bei höheren Imidazolkonzentrationen kompetitiv von der Säule eluiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Eine Säule mit 1 mL bzw. 5 mL Bettvolumen wird mit Hilfe eines FPLC Systems mit einer Flussrate von 1 mL/min bzw. 4 mL/min mit 10 Säulenvolumina (SV) Wasser gespült und anschließend mit 5 SV 10 mM ZnSO₄ beladen. Dann wird mit 10 SV Wasser nachgespült und schließlich mit mindestens 10 SV LI Puffer (50 mM NaP_i, 100 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie äquilibriert. Anschließend wird die in LI Puffer vorliegende Proteinlösung auf die Säule aufgetragen, der Durchlauf aufgefangen und wiederum bis zum Erreichen der Basislinie mit LI Puffer nachgespült. Zur Elution von Proteinen, die mit niedriger Affinität an die Säulenmatrix binden, wird für 5 SV mit 50 mM Imidazol in LI Puffer (pH 8,0) gewaschen. Das Zielprotein wird anschließend mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 50 - 300 mM Imidazol in 15 SV LI Puffer (pH 8,0) eluiert. Fraktionen zu 1 mL bzw. 4 mL werden aufgefangen und durch SDS-PAGE auf ihren Gehalt an rekombinantem Protein und dessen Reinheit analysiert. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Entfernung der Zn²⁺ Ionen wird das Säulenmaterials mit 10 SV Regenerierungspuffer (50 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8,0) und anschließend für mindestens 20 SV mit Wasser gespült.

2.4.1.4 Gelpermeationschromatographie

Die in einem ersten affinitätschromatographischen Verfahren gereinigten Proteine, wurden abschließend einer Gelpermeationschromatographie (GPC) unterzogen. Dadurch wurden unterschiedliche Oligomerisierungszustände der Proteine detektiert und isoliert oder lösliche Proteinaggregate von Protein mit einem definierten oligomeren Zustand abgetrennt.

Dabei wurden Gelpemeationssäulen der Superdex 200 Serie (Kapitel 2.1.4) verwendet, dessen Gelmatrix aus quervernetzten porösen Agarose-Dextran Kügelchen besteht. Proteine

diffundieren in einer GPC gemäß ihrer dreidimensionalen Gestalt unterschiedlich tief in die Poren der Gelmatrix ein und eluieren daher in verschiedenen Volumina von der Säule. Dies ermöglicht die Auftrennung eines heterogenen Proteingemisches gemäß dem hydrodynamischen Radius seiner Komponenten, die für Säulen der Superdex 200 Serie im Bereich von 10 - 600 kDa (bezogen auf globuläre Proteine) lag. Eine Kalibrierung des Elutionsvolumen in Abhängigkeit von der Proteinmasse erfolgte mit den folgenden Proteinen: Carboanhydrase (29 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), Amylase (200 kDa) und Apoferritin (430 kDa).

Für analytische Zwecke mit einem maximalen Probenvolumen von 0,5 mL wurde dabei eine Superdex 200 HR 10/30 Säule mit einem Bettvolumen von 24 mL verwendet, die bei einem maximalen Druck von 1,5 MPa mit einer Flussrate von 0,5 mL/min betrieben wurde. Für präparative Zwecke wurden Superdex 200 *prepgrade* HR 16/60 bzw. Superdex 200 *prepgrade* HR 26/60 Säulen mit einem Bettvolumen von 120 mL bzw. 320 mL verwendet. Das Probenvolumen betrug dabei 2 mL bzw. 10 mL. Bei einem maximalen Druck von 1 MPa wurden die Säulen mit einer Flussrate von 1 mL/min bzw. 2,5 mL/min betrieben. Üblicherweise wurde die Säule vor dem Auftrag einer Probe mit 1,3 SV sterilfiltriertem und entgastem Chromatographiepuffer äquilibriert. Fraktionen wurden in der Regel über einen Zeitraum von 2 min gesammelt. Zur Regenerierung wurde die Säule mit 2 SV Wasser gespült und dauerhaft in 20 % (v/v) Ethanol gelagert.

2.4.1.5 Analyse des Monomer-Dimer Verhältnisses von OpuAA

Das Monomer-Dimer (M-D) Verhältnis von OpuAA wurde durch GPC bestimmt. Hierzu wurden 100 µL - 500 µL Proteinlösung auf eine Superdex 200 HR 10/30 Säule gegeben, die zuvor mit HS Puffer (10 mM NaP_i, pH 7,5, 1 M NaCl, 0,1 mM EDTA) äquilibriert wurde. Hochsalzbedingungen wurden gewählt, um das dynamische M-D Gleichgewicht des OpuAA zu verlangsamen und somit ungewollte Veränderungen des M-D Verhältnisses durch Verdünnung der Probe auf der Säule zu vermeiden (Kapitel 3.3.1). Die Proteinelution wurde durch Absorptionsmessung bei 216 nm verfolgt und das M-D Verhältnis gemäß Gleichung 1 berechnet.

$$\frac{[M]}{c_0} = \frac{A_{216, M}}{A_{216, D} + A_{216, M}}, \quad \frac{[D]}{c_0} = \frac{1}{2} \cdot \frac{[M]}{c_0} \quad \text{Gleichung 1}$$

$A_{216, M}$, $A_{216, D}$: Absorption bei 216 nm am Peakmaximum von Monomer oder Dimer
 $[M]$, $[D]$: Konzentration des Monomers oder Dimers
 c_0 : Gesamtkonzentration von OpuAA

Die Dissoziationskonstante des M-D Gleichgewichtes wurde unter Berücksichtigung des Massenwirkungsgesetzes mit Hilfe von Gleichung 2 berechnet.

$$\frac{[M]}{c_0} = \frac{1}{c_0} \cdot \left[\frac{K_D}{4} + \sqrt{\frac{K_D^2}{16} + \frac{c_0 \cdot K_D}{2}} \right] \quad \text{Gleichung 2}$$

K_D : Dissoziationskonstante
 $[M]$: Konzentration des Monomers
 c_0 : Gesamtkonzentration von OpuAA

Der zeitabhängige Zerfall von dimeren OpuAA unter Niedrigsalzbedingungen (150 mM NaCl) bzw. Hochsalzbedingungen (1 M NaCl) wurde gemäß den Gleichungen 3a bzw. 3b analysiert. Eine explizite Herleitung der Gleichung 3a wird im Appendix beschrieben.

$$\frac{[D]_{,t}}{c_0} = \frac{k_2 \cdot \arccot \cot \left[\frac{1}{2} \cdot (t + k_1) \cdot k_2 \right]}{8 \cdot k_{\text{off}} \cdot c_0} + \frac{K_D}{8 \cdot c_0} + \frac{1}{4} \quad \text{Gleichung 3 a}$$

$$\frac{[D]_{,t}}{c_0} = \frac{[D]_{,t=0}}{c_0} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad \text{Gleichung 3 b}$$

K_D : Dissoziationskonstante
 $[D]$: Konzentration des Dimers
 c_0 : Gesamtkonzentration von OpuAA
 t : Zeit der Probeninkubation
 τ : Halbwertszeit des Zerfalls
 k_{off} : Dissoziationsratenkonstante
 k_1, k_2 : kinetische Parameter

2.4.1.6 Ionenaustauschchromatographie

Komponenten eines Proteingemisches, die sich in ihrer Oberflächenladung unterscheiden, können mittels Ionenaustauschchromatographie voneinander getrennt werden. Liegt der pH Wert einer Proteinlösung oberhalb des isoelektrischen Punktes des Proteins, so ist es negativ geladen und kann an ein Anionenaustauschmaterial wie beispielsweise immobilisierte Ammoniumionen binden. So gebundene Proteine können durch selektive Erhöhung der Ionenstärke im Chromatographiepuffer eluiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Anionenaustauschchromatographie (AAC) für zwei Trennverfahren durchgeführt. Zum einen wurde rekombinantes OpuAC aus einem Faktor Xa

Proteolyseansatz des MBP-OpuAC Fusionsproteins isoliert. Zum anderen, erfolgte die Trennung des mit Fluoreszenzfarbstoff markierten OpuAA von nicht-markiertem OpuAA.

2.4.1.6.1 Isolierung von OpuAC aus dem Faktor Xa Proteolyseansatz

Das als N-terminale Fusion mit MBP produzierte OpuAC wurde durch eine Faktor Xa Proteolyse aus dem Fusionsprotein freigesetzt und mittels AAC isoliert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Eine 5 mL HiTrap Q⁺-Säule mit einem Beladungsgrad von 0,2 mmol Cl⁻/mL Gelmaterial dessen Gelmaterial aus kovalent an Sepharose gekoppelten quartären Ammoniumionen besteht, wird für die Reinigung verwendet. Die Säule wird mit Hilfe eines FPLC Systems mit einer Flussrate von 4 mL/min betrieben und zunächst mit Chromatographiepuffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 25 mM NaCl) bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie äquilibriert. Anschließend wird der gegen Chromatographiepuffer dialysierte Proteolyseansatz auf die Säule aufgetragen und bis zum erneuten Erreichen der Basislinie gewaschen. Der Durchlauf, der das rekombinante OpuAC enthält, wird in Fraktionen zu 4 mL aufgefangen. Die an die Säulenmatrix gebundenen Proteine (MBP und Faktor Xa) werden mit einem linearen Gradienten von 25 mM - 1 M NaCl in 10 SV Chromatographiepuffer eluiert. Die Fraktionen des Durchlaufs werden durch SDS-PAGE auf ihren Gehalt an rekombinantem OpuAC und dessen Reinheit analysiert. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Regenerierung wird die Säule mit 20 SV Wasser gespült.

2.4.1.6.2 Isolierung des Fluorophor-markierten OpuAA

Die Markierungseffizienz der OpuAA Cystein-Mutanten mit Oregon Green 488[®] oder Texas Red[®] lag im Bereich von 50 - 60 %. Dies erforderte eine Abtrennung des nicht-markierten OpuAA. Dabei wurden die durch den Fluoreszenzfarbstoff zusätzlich eingeführten negativen Ladungen am OpuAA ausgenutzt, um markiertes von nicht-markiertem OpuAA durch AAC zu trennen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Eine 1 mL HiTrap Q⁺-Säule mit einem Beladungsgrad von 0,2 mmol Cl⁻/mL Gelmaterial dessen Gelmaterial aus kovalent an Sepharose gekoppelten quartären Ammoniumionen besteht, wird für die Reinigung verwendet. Die Säule wird mit Hilfe eines FPLC Systems mit einer Flussrate von 1 mL/min betrieben und zunächst mit Chromatographiepuffer (10 mM NaPi, pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA) bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie äquilibriert. Die Chromatographie wird bei einer Wellenlänge von 280 nm und 492 nm für Oregon Green⁺ markiertes OpuAA bzw. 592 nm für Texas Red⁺ markiertes OpuAA verfolgt. Anschließend wird die in Chromatographiepuffer vorliegende Probe auf die Säule

aufgetragen, der Durchlauf aufgefangen und bis zum erneuten Erreichen der Basislinie gewaschen. Die an die Säulenmatrix gebundenen Proteine (markiertes und nicht-markiertes OpuAA) werden mit einem linearen Gradienten von 10 mM - 1 M NaCl in 12 SV Chromatographiepuffer eluiert. Fraktionen zu 1 mL werden aufgefangen. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Regenerierung wird die Säule mit 20 SV Wasser gespült.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Größe erfolgte durch die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss an die Elektrophorese durch Färbung mit Coomassie Brilliantblau (CBB) R250 oder Silberfärbung sichtbar gemacht. Die diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) wurde unter Hochsalzbedingungen mit dem Puffersystem von Fling und Gregerson durchgeführt (Fling & Gregerson, 1986). Proteine wurden je nach ihrer Größe in 12 %igen oder 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Trenngelen nach ihrer Molmasse aufgetrennt.

Zur Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden 16 gesäuberte Glasplatten (10 cm x 8 cm) mit Abstandhaltern (Dicke: 1 mm) in einem Gießblock aufgeschichtet. Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 75 mL bestand aus 18,75 mL 4 fachem Lower-Tris und einem der gewünschten Prozentigkeit des Gels entsprechendem Anteil einer 30 %igen Acrylamid-Stammlösung. Zur Herstellung von 12 %igen Gelen wurden 30 mL und für 15 %ige Gele 37,5 mL Acrylamid-Stammlösung verwendet. Mit Wasser wurde zum Endvolumen aufgefüllt. Nach dem Polymerisationsstart durch Zugabe von 70 µL TEMED und 0,3 mL 10 % (w/v) APS wurden 4 mL der Trenngelmischung zwischen jeweils zwei Glasplatten pipettiert und mit 1 mL Isopropanol überschichtet, um Luftzutritt zu vermeiden. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und 35 mL einer 4,5 %igen Sammelgelmischung mit 5,25 mL Acrylamid-Stammlösung, 8,75 mL 4 fachem Upper-Tris und 21 mL Wasser hergestellt. Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 70 µL TEMED und 210 µL 10 % (w/v) APS gestartet. Die Lösung wurde auf das erstarrte Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und ein Taschenformer mit zehn, zwölf oder fünfzehn Zähnen eingesetzt. Nach Erstarren des Sammelgels wurden die Gele aus dem Gießblock entfernt, in feuchte Zellstofftücher gewickelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Analyse wurden jeweils 20 µL Proteinlösung mit 5 µL SDS-PAGE Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Im Fall von Membranproteinen erfolgte die Denaturierung für 20 min bei 60 °C, um Aggregation zu vermeiden. Nach Entfernen des Taschenformers aus dem erstarrten Sammelgel wurde das Gel in eine vertikale Elektro-

phoresekammer gespannt, die mit Laufpuffer gefüllt wurde. Mit Hilfe einer 50 µL Glasspritze wurden die Geltaschen mit 25 µL Probe beladen. Zusätzlich wurde ein Protein Größenstandard, der ebenfalls mit 5 µL SDS-PAGE Auftragspuffer versetzt worden war, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer begrenzenden Stromstärke von 30 mA pro Gel und einer Spannung von 120 V solange betrieben, bis der Bromphenolblau-Marker nach ca. 2 h aus dem unteren Ende des Trenngels austrat. Anschließend wurde das Gel entnommen und das Sammelgel mit einem Skalpell abgeschnitten.

Zur Anfärbung der aufgetrennten Proteinbanden mit CBB R250 wurde das Gel zunächst für 30 min in Färbelösung (40 % (v/v) MeOH, 10 % (v/v) AcOH, 0,25 % (w/v) CBB) und dann bis zur Entfärbung des Hintergrundes in Entfärbelösung (40 % (v/v) MeOH, 10 % (v/v) AcOH) geschwenkt. Zur Dokumentation wurde das Bandenmuster mit einem Scanner digitalisiert. Die Nachweisgrenze von Proteinen bei Färbung mit CBB R250 liegt dabei im Bereich von 250 – 500 ng. Durch Silberfärbung erreicht man einen um den Faktor zehn sensitiveren Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift für Silberfärbung:

Das Gel wird für 15 min in Fixierlösung (30 % EtOH (v/v), 10 % AcOH (v/v)) geschwenkt und anschließend in Thiosulfatpuffer (30 % EtOH (v/v), 13,5 g/L NaOAc-H₂O, pH 6 mit AcOH), der zuvor mit 1 mg/mL Thiosulfat-Pentahydrat versetzt wurde, für 15 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser für jeweils 5 min wird das Gel für 25 min in Silberlösung (0,1 % AgNO₃, 0,04 % (v/v) Formaldehyd) geschwenkt und abschließend in Entwickler Lösung (2,5 % (w/v) Na₂CO₃, 0,04 % (v/v) Formaldehyd) gegeben. Nach deutlicher Entwicklung der Proteinbanden wird mit 1 mL Essigsäure die Reaktion beendet und das Bandenmuster zur Dokumentation mit einem Scanner digitalisiert.

2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration und Konzentrierung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration (c) wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm (A) in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke d= 1 cm unter Korrektur der Absorption des Puffers mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetztes (Gleichung 4) bestimmt. Hierzu wurde der jeweilige molare Extinktionskoeffizient (ε) des Proteins nach der Methode von Gill und von Hippel (Gill & von Hippel, 1989) mit Hilfe des Programms ProtParam (Kapitel 2.9) ermittelt. Dabei werden die Absorptionsbeiträge der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Cystein für eine vollständig entfaltete Polypeptidkette summiert.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Gleichung 4

Alternativ wurde die Proteinkonzentration durch einen BCA (Bicinchoninsäure)-Test (Smith *et al.*, 1985) gemäß dem Protokoll des Herstellers bestimmt. Dabei wird die Reduktion

von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Oxidation des Proteins ausgenutzt. Mit Hilfe der Bicinchoninsäure werden Cu^+ Ionen in einem violetten Komplex sichtbar gemacht, dessen Absorption bei 540 nm ein Maß für die Proteinkonzentration anhand eines Proteinstandards gibt. Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin verwendet. Die Gesamtkonzentration von OpuAA bezog sich immer auf ein vollständig in monomerer Form vorliegendes Protein.

Für verschiedene Anwendungen, insbesondere für die Kristallisation und die GPC, war es notwendig, Lösungen mit hoher Proteinkonzentration bzw. vorgegebenem Volumen herzustellen. Dabei wurde die Proteinlösung in Konzentratoren (Ultrafree-0,5, Amicon Ultra-5, Amicon Ultra-15) mit einer Kapazität von 0,5 mL, 5 mL oder 15 mL gegeben. Durch Zentrifugation (für 0,5 mL Konzentratoren: Tischkühlzentrifuge, 4 °C, 14.000 rpm; für 5 mL bzw. 15 mL Konzentratoren: Tischkühlzentrifuge, 4 °C, 3.500 rpm) wurde bis zum Erreichen einer der gewünschten Konzentration entsprechenden Volumens eingengt. Die molekulare Ausschlußgröße der Konzentratoren wurde je nach Protein variiert: für OpuAA und OpuAB wurde eine Ausschlußgröße von 10 kDa und für OpuAC eine Ausschlußgröße von 5 kDa verwendet. Proteinlösungen, die in einem großen Volumen (50 – 100 mL) vorlagen wurden mit Hilfe einer Druckzelle (Amicon® 8200) unter 3 bar N_2 an einer Polyethersulfon Membran auf ein minimales Volumen von 10 mL eingengt.

2.4.4 Markierung von OpuAA Cystein-Mutanten mit Maleinimid-Farbstoffen

Für die positionsspezifische Markierung von OpuAA mit Oregon Green® 488 Maleinimid oder Texas Red® C₂ Maleinimid wurden OpuAA Cystein-Mutanten konstruiert, deren freie Thiolgruppe eine selektive Markierung mit dem Maleinimidrest der Farbstoffe erlaubte.

Für die Markierung wurde das OpuAA Monomer der Cystein-Mutanten durch GPC isoliert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 2 mL der Proteinlösung mit einem entsprechenden Volumen der Farbstofflösung (Oregon Green® Stammlösung: 20 mM in DMF, Texas Red® Stammlösung: 4,1 mM in MeOH) versetzt, so dass der Farbstoff in 2,5 fachen molaren Überschuss zum Protein vorlag. Die Markierungsreaktion wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt und anschließend der freie Farbstoff durch eine Entsalzung von markiertem Protein abgetrennt. Dabei wurde der Reaktionsansatz auf eine PD-10 Säule gegeben, die zuvor mit 25 mL Puffer (10 mM NaP_i , pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA) äquilibriert wurde. Fraktionen zu je 1 mL wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt untersucht. Anschließend wurde die Markierungseffizienz bestimmt und gegebenenfalls markiertes OpuAA von nicht-markiertem OpuAA durch Ionenaustauschchromatographie (Kapitel 2.4.1.6.2) abgetrennt.

2.5 Immunchemische Methoden

2.5.1 Western Blotting

Für die immunchemische Analyse von Proteinen auf dem *Western Blot* (Blake *et al.*, 1984) wurden diese zunächst mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Rekombinante Proteine wurden über ihr Affinitätsanhängsel mit Hilfe geeigneter Nachweisreagenzien detektiert. Im Fall des Strep-tags diente hierzu ein Streptavidin-Alkalische Phosphatase Konjugat, während im Fall des Hexahistidin-Peptids ein Ni²⁺/NTA (Nitrilo-Tri-Essigsäure)-Alkalische Phosphatase Konjugat verwendet wurde. Die Entwicklung des Signals erfolgte durch enzymatische Umsetzung des chromogenen Substrates BCIP der Alkalischen Phosphatase (AP) in Gegenwart von NBT (Blake *et al.*, 1984).

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben durchgeführt. Für den anschließenden Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden vier Filterpapiere (8,5 cm x 5,5 cm) mit Blotpuffer (SDS-PAGE Laufpuffer mit 20 % (v/v) Methanol) getränkt und auf die Graphit-Kathode der Elektoblotapparatur geschichtet. Auf diesen Stapel wurde das für 20 min in Blotpuffer inkubierte Trenngel gelegt und darauf Membran sowie vier weitere Filterpapiere geschichtet. Der Proteintransfer wurde nach Auflegen der Graphit-Anodenplatte für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA durchgeführt. Anschließend wurde die Membran entnommen, in eine Petrischale gelegt und für 30 min mit viermaligem Wechseln in PBST geschwenkt. Dann wurde die Membran für 1 h mit 10 mL Lösung des jeweiligen Nachweisreagenz in PBST auf einem Taumelschüttler inkubiert.

Für den Nachweis des Hexahistidin-Peptids wurde Ni²⁺/NTA-AP Konjugat in einer Verdünnung von 1:500 (v/v) verwendet. Für den Nachweis des Strep-tags wurde zunächst für 10 min mit Avidin Lösung (2 mg/mL in 0,1 M Tris/HCl pH 8,0) in einer 1:1.000 (v/v) Verdünnung inkubiert und dann 1:1.000 (v/v) Streptavidin-AP Konjugat zugesetzt.

Anschließend wurde jeweils zweimal für je 5 min mit PBST und PBS gewaschen. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 20 mL AP Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) mit 10 µL NBT (75 mg/mL in 70 % (v/v) DMF) und 60 µL BCIP (50 mg/mL in DMF) gestartet und nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität durch mehrfaches Waschen mit Wasser die Reaktion beendet. Die Membran wurde abschließend an der Luft getrocknet und das Bandenmuster zur Dokumentation mit einem Scanner digitalisiert.

2.6 Enzymkinetische Methoden

2.6.1 ATPase Aktivitäts-Test

Die ATPase Aktivität von OpuAA wurde mit Hilfe der Pyruvat Kinase und Laktat Dehydrogenase (PK/LDH) in einem gekoppelten Enzymtest bestimmt (Senior *et al.*, 1998). Dabei wurde die Oxidation von NADH zu NAD⁺ bzw. die Reduktion von Pyruvat zu Laktat ausgenutzt, um die Phosphatgruppe des Phosphoenolpyruvats (PEP) auf ADP zu übertragen und damit verbrauchtes ATP zu regenerieren. Der Test wurde in einer 96 *well plate* ausgeführt und in einem ELISA-Meßgerät ausgelesen. Dabei wurde die Abnahme der NADH Konzentration als ein direktes Maß für verbrauchtes ATP spektroskopisch bei 340 nm verfolgt.

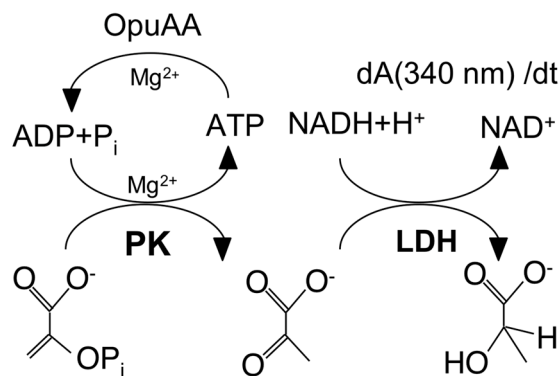


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des für OpuAA verwendeten ATPase Aktivitätstests. Verbrauchtes ATP wird mit Hilfe der Pyruvat Kinase (PK) und Laktat Dehydrogenase (LDH) regeneriert. Dabei wird Pyruvat zu Laktat reduziert und NADH zu NAD⁺ oxidiert. Die zeitabhängige Oxidationsreaktion wird spektroskopisch bei 340 nm verfolgt ($dA_{340 \text{ nm}}/dt$).

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

In jede Vertiefung einer 96 *well plate* werden 0,2 mM NADH, 1,5 mM PEP, 45 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 5 U PK, 7 U LDH und ein entsprechendes Volumen der auf ATPase Aktivität zu untersuchenden Proteinlösung gegeben. ATP wird von einer 100 mM Stammlösung, pH 6,8 zugegeben. Salz und weitere Zusätze werden in einem der gewünschten Endkonzentration entsprechenden Volumen zugegeben und mit Wasser auf ein Endvolumen von 200 µL aufgefüllt. Nach einer 2 min Inkubation wird die Absorption bei 340 nm in 1 min Intervallen über einen Zeitraum von 15 min in einem ELISA-Meßgerät bei 22 ± 2 °C ausgelesen. Die Daten der gesamten Messdauer oder soweit bis alles NADH umgesetzt ist, mindestens jedoch über einen Zeitraum von 7 min, werden verwendet, um lineare Steigungen $\Delta A(340 \text{ nm}) / \Delta t$ zu berechnen. Um der ATP Autohydrolyse Rechnung

zu tragen, werden identische Experimente durchgeführt, wobei die auf ATPase Aktivität zu untersuchende Proteinlösung durch Puffer ersetzt wird.

Nach Subtraktion des Hintergrundes wurden gemäß Gleichung 5 die Reaktionsgeschwindigkeiten berechnet, die auf die Endkonzentration von OpuAA im Reaktionsansatz normalisiert waren. Die berechneten Reaktionsgeschwindigkeiten wurden über zwei unabhängige Messungen gemittelt. Im Fall verschiedener ATP Konzentrationen wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten mit Hilfe von Gleichung 6 ausgewertet, um die Michaelis-Menten Parameter zu bestimmen.

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t_{OpuAA}} - \frac{\Delta A}{\Delta t_{Puffer}}$$

$$v = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1}{2.590 M^{01} \cdot c_0}$$

Gleichung 5

v: Reaktionsgeschwindigkeit
c₀: Konzentration von OpuAA

$$v = \frac{[ATP] \cdot k_2}{K_M + [ATP]}$$

Gleichung 6

v: Reaktionsgeschwindigkeit
K_M: Michaelis-Menten Konstante
k₂: Wechselzahl

2.7 Spektroskopische Methoden

2.7.1 Bindungsstudien mit TNP-ATP

Die Bindungsaffinität von Adenosinnukleotiden zu OpuAA und die Stöchiometrie des Komplexes wurde mit Hilfe des fluoreszierenden ATP-Analoga TNP-ATP (2', 3'-O-(2, 4, 6-trinitrophenyl)-Adenosin-5'-triphosphat) bestimmt. Dabei wurde zunächst Bindungsaffinität und Stöchiometrie von TNP-ATP zu OpuAA in einer Fluoreszenztitration bestimmt. Anschließend wurden TNP-ATP/OpuAA Komplexe durch schrittweise Zugabe von ATP oder ADP titriert und die Kompetition des TNP-ATP analysiert. Dies erlaubte die Bestimmung der Bindungsaffinitäten von ATP oder ADP zu OpuAA.

2.7.1.1 Titration von OpuAA mit TNP-ATP

Die Bindungsstudien wurden im Allgemeinen nach der Methode von Faller (Faller, 1989) durchgeführt. Die Fluoreszenz der TNP-Nukleotide wurde bei einer Emissionswellenlänge von 540 nm mit einem Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug 409 nm bei einer Schlitzweite von 4 nm. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines zirkulierenden Wasserbades während der Messung konstant bei 20 ± 1 °C gehalten. Für alle Experimente wurde 10 mM NaP_i, pH 7,5, 0,1 mM EDTA mit der entsprechenden NaCl und MgCl₂ Konzentration als Puffer verwendet.

Typischerweise wurde eine Blauverschiebung des Emissionsmaximums um 15 nm, von 550 nm auf 535 nm, bei Bindung von TNP-ATP oder TNP-ADP an OpuAA beobachtet. Darüber hinaus wurde ein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet, dessen absoluter Wert von der molekularen Umgebung der TNP-Nukleotide in der Bindungstasche des OpuAA abhing. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität wurde durch den Fluoreszenz-erhöhungsfaktor (Δ) quantifiziert, der als Verhältnis der Fluoreszenzen einer konstanten TNP-ATP Konzentration bei unendlich hoher Proteinkonzentration (F_{\max}) und bei Abwesenheit von Protein (F_{Puffer}) definiert ist (Gleichung 7 b). Δ wurde in einer unabhängigen Messung bestimmt. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität von 4 μM TNP-ATP oder TNP-ADP/Mg²⁺ bei steigenden OpuAA Konzentrationen gemessen und die Daten gemäß Gleichung 7 a angepasst.

$$F_{total} = F_{Puffer} + F_{max} \cdot (1 - e^{-k \cdot c_0}) \quad \text{Gleichung 7 a}$$

$$\square = \frac{F_{max}}{F_{Puffer}} \quad \text{Gleichung 7 b}$$

F_{total}, F_{Puffer} :	Fluoreszenzintensität bei 540 nm in Gegenwart oder Abwesenheit von OpuAA
c_0 :	Gesamtkonzentration von OpuAA
F_{max}, k :	Parameter
\square	Fluoreszenzerhöhungsfaktor

Die Fluoreszenzintensität von TNP-ATP in Puffer und in Abwesenheit von OpuAA war gering und stieg mit steigenden TNP-ATP Konzentrationen zunächst linear an. Bei höheren TNP-ATP Konzentrationen traten jedoch innere Filtereffekte (Faller, 1989) wie beispielsweise Reabsorption auf, die zum Absinken der Fluoreszenz führten. Die Fluoreszenzeigenschaften von TNP-ATP in einem gegebenen Puffer unter Berücksichtigung des inneren Filter-Effektes wurde mit Hilfe der Fluoreszenzkonstanten Q_1 und Q_2 beschrieben. Dabei wurde TNP-ATP schrittweise (0,5 μM Schritte im Bereich 0 - 4 μM und 1 μM Schritte im Bereich 4 - 14 μM) von einer 1 mM Stammlösung, bei einer maximalen Verdünnung von weniger als 1 % (v/v), zu Puffer gegeben. Die Fluoreszenz wurde 30 s nach Zugabe und Mischen der Lösung gemessen. Von allen experimentellen Daten wurde die Fluoreszenz in Abwesenheit von TNP-ATP subtrahiert und diese über wenigstens zwei unabhängige Messungen gemittelt. Zur Bestimmung der Fluoreszenzkonstanten Q_1 und Q_2 wurden die Daten gemäß Gleichung 8 angepasst.

$$F_{Puffer} = Q_1 \cdot L_0 + Q_2 \cdot L_0^2 \quad \text{Gleichung 8}$$

Q_1, Q_2 :	Fluoreszenzkonstanten von TNP-ATP
L_0 :	Gesamtkonzentration von TNP-ATP
F_{Puffer} :	Fluoreszenzintensität bei 540 nm

Für die Fluoreszenztitration wurde OpuAA in Puffer auf eine Endkonzentration von 3 - 6 μM verdünnt und anschließend mit TNP-ATP titriert. Von allen experimentellen Daten wurde die Fluoreszenz in Abwesenheit von TNP-ATP subtrahiert und diese über wenigstens zwei unabhängige Messungen gemittelt. Zur Bestimmung des K_D -Wertes der OpuAA/TNP-ATP Komplexe (K_{DL}) und der entsprechenden Stöchiometrie (N) wurden die Daten gemäß Gleichung 9 angepasst. Eine ausführliche Herleitung der Gleichung erfolgt im Appendix.

$$F_{total} = Q_1 \cdot L_0 + Q_2 \cdot L_0^2 + \left(\frac{Q_1}{2} \cdot L_0 + Q_2 \cdot L_0 \right) \cdot \left[A + \sqrt{A^2 + 4 \cdot L_0 \cdot N \cdot P_0} \right] \quad \text{Gleichung 9}$$

$$A = (K_{DL} + L_0 + N \cdot P_0)$$

F_{total} :	Fluoreszenzintensität bei 540 nm
Q_1, Q_2 :	Fluoreszenzkonstanten von TNP-ATP
\square :	Fluoreszenzerhöhungsfaktor
L_0, P_0 :	Endkonzentration von TNP-ATP oder OpuAA
K_{DL} :	Dissoziationskonstante der OpuAA/TNP-ATP Komplexe
N :	Zahl von Liganden

Für eine alternative Auswertung der Gleichgewichtsbindungsdaten wurde eine Scatchard Auftragung gemäß Gleichung 10 durchgeführt. Diese Art der Auswertung ermöglichte einen direkten Vergleich der Dissoziationskonstanten und der Ligandenanzahl des OpuAA Monomers und Dimers, da die Daten auf die verwendete Proteinkonzentration normalisiert waren. Die Herleitung dieser Gleichung erfolgt im Appendix.

$$\frac{L_{bound}}{P_0} = N \cdot K_{DL} \cdot \frac{L_{bound}}{L_{free} \cdot P_0} \quad \text{Gleichung 10}$$

L_{bound}, L_{free} :	Konzentration von gebundenem oder freiem TNP-ATP
P_0 :	Endkonzentration von OpuAA
K_{DL} :	Dissoziationskonstante der OpuAA/TNP-ATP Komplexe
N :	Zahl von Liganden

2.7.1.2 Kompetitive Bindungsstudien

Die Bindungsaffinität von Adenosinnukleotiden wurde in Konkurrenzexperimenten mit OpuAA/TNP-ATP Komplexen bestimmt. Durch Zugabe von ATP bzw. ADP wurde TNP-ATP aus der Bindungstasche des OpuAA verdrängt und die resultierende Abnahme der TNP-Fluoreszenz zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten genutzt.

OpuAA wurde auf 2 - 4 μM in Puffer verdünnt und für 5 min bei 20 ± 2 °C mit 10 μM TNP-ATP inkubiert. Anschließend wurde schrittweise ATP oder ADP von einer 1 mM, 10 mM, 100 mM oder 500 mM Stammlösung (pH 6,8), bei einer maximalen Verdünnung von weniger als 5 % (v/v), bis zu einer Endkonzentration von 50 mM zugegeben. Die Fluoreszenz wurde wie in Kapitel 2.7.1.1 beschrieben ausgelesen. Identische Experimente wurden in Abwesenheit von OpuAA durchgeführt. Fluoreszenzdaten in Gegenwart und Abwesenheit von OpuAA wurden subtrahiert und gemäß Gleichung 11 analysiert. Die Herleitung der

Gleichung erfolgt im Appendix. Die angegebenen K_D -Werte wurden aus mindestens zwei unabhängigen Titrationsexperimenten gemittelt.

$$\frac{F_{PLN, AXP \neq 0}}{F_{PLN, AXP = 0}} = \frac{A + AXP_0 \cdot \frac{K_{DL}}{K_{DAXP}} \sqrt{A^2 + 4 \cdot N \cdot P_0 \cdot L_0}}{A \sqrt{A^2 + 4 \cdot N \cdot P_0 \cdot L_0}}$$

Gleichung 11

$$A = (K_{DL} + L_0 + N \cdot P_0)$$

$$\frac{F_{PLN, AXP \neq 0}}{F_{PLN, AXP = 0}}$$

normalisierte Fluoreszenz bei verschiedenen AXP_0 (X=T, D) L_0, P_0 :

Gesamtkonzentration von TNP-ATP oder OpuAA

 K_{DL} :

Dissoziationskonstante der OpuAA/TNP-ATP Komplexe

 K_{DAXP} :

Dissoziationskonstante der OpuAA/AXP Komplexe

N:

Zahl von Liganden

2.7.2 Zeitlicher Verlauf der TNP-ADP Fluoreszenz

Die Fluoreszenzintensität von TNP-Nukleotiden ist von der molekularen Umgebung der Bindungstasche im Protein abhängig. Dies ermöglichte die zeitabhängige Detektion von konformellen Änderungen der Nukleotid-Bindetasche des OpuAA bei Bindung von TNP-ADP.

Der Testpuffer setzte sich aus 10 mM NaP_i , pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA und 10 μ M TNP-ADP zusammen und wurde je nach experimenteller Bedingung mit 5 mM $MgCl_2$ versetzt. Zum angegebenen Zeitpunkt wurde OpuAA auf 3 μ M Monomer bzw. 1,5 μ M Dimer in Testpuffer verdünnt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 409 nm und einer Schlitzweite von 4 nm bei einer Emissionswellenlänge von 540 nm für einen Zeitraum von 200 min in Abständen von 10 s aufgezeichnet. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines zirkulierenden Wasserbades bei 20 ± 2 °C konstant gehalten. Der zeitabhängige Anstieg der Fluoreszenz wurde gemäß Gleichung 12 analysiert.

$$F_{total} = k_1 + k_2 \cdot (1 - e^{-\frac{t}{\tau}})$$

Gleichung 12

 F_{total} :

Fluoreszenzintensität bei 540 nm

 k_1, k_2 :

Parameter

 τ :

Halbwertszeit

t:

Zeit nach Zugabe von OpuAA

2.7.3 Bindungsstudien durch Messung der intrinsischen Trp-Fluoreszenz

Die in Proteinen enthaltenen Tryptophane können prinzipiell als Reporter zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten von Protein/Ligand Komplexen verwendet werden. Dabei kann die Änderung der Fluoreszenzintensität, als Maß für den Anteil des Proteins im gebundenen Zustand, ausgelesen werden, wenn sich bei Ligandenbindung die Lebensdauer des angeregten Zustandes verändert. Alternativ kann eine Verschiebung des Emissionsmaximums, bei Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit des beobachteten Tryptophans zur Bestimmung der Bindungsaffinität genutzt werden. Letztere Methode bietet den Vorteil, dass alle anderen Prozesse, die die Fluoreszenzintensität beeinflussen wie z.B. Stosskollision oder Absorption des Liganden keinen Einfluss haben. Im ersten Fall müssen diese Prozesse berücksichtigt werden.

2.7.3.1 Bindungsaffinitäten von kompatiblen Soluten an OpuAC

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten von Glycin-Betain oder Prolin-Betain an OpuAC wurde eine Verschiebung der maximalen Emissionswellenlänge der im OpuAC enthaltenen Tryptophane bei Ligandenbindung ausgenutzt.

Rekombinantes OpuAC wurde auf 250 nM in Testpuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,3) verdünnt und Glycin-Betain oder Prolin-Betain aus einer 0,5 mM, 5 mM oder 50 mM Stammlösung bei einer maximalen Verdünnung von weniger als 2 % (v/v) zugegeben. Nach einer 5 min Inkubation wurden die Proben in einem Fluoreszenzspektrometer bei einer konstanten Temperatur von 22 ± 1 °C ausgelesen. Hierzu wurden Emissionsspektren von 305 nm - 450 nm bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Schlitzweite von 5 nm aufgezeichnet. Identische Experimente in Abwesenheit von OpuAC wurden durchgeführt und Spektren in Gegenwart und Abwesenheit von OpuAC subtrahiert. Die Lage des Emissionsmaximums (E_{\max}) bei gegebener Ligandenkonzentration wurde mit Hilfe des Programms DataMax bestimmt, gemäß Gleichung 13 a normalisiert und abschließend zur Bestimmung des K_D -Wertes der OpuAC/Ligand Komplexe gemäß Gleichung 13 b analysiert.

$$\frac{PL}{P_0} = \frac{L_0}{L_0 + K_D} \quad \text{Gleichung 13 a}$$

$$\frac{PL}{P_0} = \frac{L_0}{L_0 + K_D}, \text{ für } P_0 \ll L_0 \quad \text{Gleichung 13 b}$$

E_{\max} : Emissionsmaximum bei L_0 , $L_0 = 0$ oder bei Substratsättigung
 L_0 , P_0 , PL : Konzentration von Ligand, OpuAC oder OpuAC/Ligand Komplexen
 K_D : Dissoziationskonstante der OpuAC/Ligand Komplexe

2.7.3.2 Bindungsaffinität von Nukleotiden an OpuAA F19W

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten von Nukleotiden an rekombinantes OpuAA F19W wurde die Erniedrigung der Fluoreszenzintensität des im OpuAA enthaltenen Tryptophan 19 bei der Ligandenbindung ausgenutzt.

Dabei wurde OpuAA F19W auf 2 μ M in sterilfiltriertem Testpuffer (10 mM NaP_i, pH7,5, 0,1 mM EDTA), der zuvor auf eine gewünschte NaCl Konzentration eingestellt wurde, verdünnt. Nukleotide wurden aus einer 50 mM oder 100 mM Stammlösung, pH 6,8, bei einer maximalen Verdünnung von weniger als 5 % (v/v), schrittweise zugegeben und die Probe gemischt. Emissionsspektren der Probe von 320 nm bis 380 nm, bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Schlitzweite von 5 nm, wurden in Abwesenheit von Ligand und für jede weitere Nukleotidkonzentration mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers aufgezeichnet und die Fluoreszenz am Emissionsmaximum bestimmt. Alle Messungen erfolgten bei 20 \pm 1 °C. Die Fluoreszenz in Anwesenheit von Nukleotid (f) wurde auf die Fluoreszenz in Abwesenheit von Nukleotid (f₀) normalisiert. Um Absorption- und Kollisionsprozesse der Nukleotide, die zu einer Erniedrigung der Fluoreszenz führen, zu berücksichtigen, wurde die normalisierte Fluoreszenz gemäß Gleichung 13 linear korrigiert.

$$F_{AXP} = \frac{f}{f_0} \square [AXP] \cdot m_2, \quad X = T, D; \quad F_{AMP} = \frac{f}{f_0} \square [AMP] \cdot m_1 \quad \text{Gleichung 13}$$

f, f₀: Fluoreszenz am E_{max} in An- oder Abwesenheit von Nukleotid
 F: korrigierte, normalisierte Fluoreszenz
 m₁, m₂: lineare Steigung (Kapitel 3.5.2)

Um unspezifische Wechselwirkungen der Nukleotide mit OpuAA zu berücksichtigen, wurde die korrigierte, normalisierte Fluoreszenz in Gegenwart von AMP von derjenigen in Gegenwart von ADP oder ATP subtrahiert (Gleichung 14). \square F-Werte wurden mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes angepasst und der Sättigungswert (\square F_{min}) bestimmt. Der K_D-Wert von OpuAA F19W/ATP oder /ADP Komplexen wurde mit Hilfe von Gleichung 15 bestimmt.

$$\square F = 1 + F_{AXP} \square F_{AMP} \quad \text{Gleichung 14}$$

$$\frac{\square F \square \square F_{\min}}{1 \square \square F_{\min}} = \frac{P_{\text{frei}}}{P_0} = 1 \square \frac{[AXP]}{[AXP] + K_D}, \quad \text{für } P_0 \ll [AXP] \quad \text{Gleichung 15}$$

F_{AXP}, F_{AMP}: siehe Gleichung 13
 \square F_{min}: Sättigungswert
 P_{frei}, P₀: Konzentration von freiem oder gesamtem OpuAA F19W
 [AXP]: Gesamtkonzentration von AXP, X= T, D
 K_D: Dissoziationskonstante von OpuAA F19W/AXP Komplexen, X= T, D

2.7.4 FRET-Untersuchungen

Die strahlungslose Übertragung von Energie von einem Donor-Fluorophor auf einen Akzeptor-Fluorophor kann durch Förster Resonanz Energietransfer (FRET) geschehen (Förster, 1948). Eine notwendige Voraussetzung für eine solche Energieübertragung ist eine geeignete räumliche Distanz der Fluorophore, die in einem Bereich von etwa 20 – 200 % des individuellen R_0 -Wertes liegt. Die Transfereffizienz (E_T) ist gemäß Gleichung 16 b ein Maß für die Distanz (R) der Fluorophore.

FRET-Untersuchungen von Fluorophor-markierten OpuAA Proben erfolgten statisch oder zeitaufgelöst. Alle Messungen wurden an einem Fluoreszenzspektrometer bei 20 ± 1 °C und bei Schlitzweiten von 5 nm durchgeführt. Für statische FRET-Untersuchungen wurde bei der Anregungswellenlänge des Donor-Fluorophors Oregon Green® bei 492 nm ein Emissionsspektrum der Proben von 500 - 650 nm aufgezeichnet. Für zeitaufgelöste FRET-Untersuchungen wie dem ADP/Mg²⁺ induzierten Zerfall des OpuAA Dimers wurde bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm die Donor-Fluoreszenz an ihrem Maximum bei 519 nm in Zeitintervallen von 5 s über einen Zeitraum von 60 min gemessen. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz wurde gemäß einer Kinetik erster Ordnung angepasst (Gleichung 16 a). Angepasste Parameter waren dabei: 1.) die Fluoreszenzintensität vor Zugabe von ADP/Mg²⁺ bei $t = 0$ ($F_{t=0}$). 2.) Der gesamte Anstieg der Fluoreszenzintensität (ΔF) bei einem vollständigen Zerfall und $t = \infty$. Diese Werte wurden zur Berechnung des zeitlichen Verlaufs der Transfereffizienz gemäß Gleichung 16 b verwendet. Für $F_{t=0}$ konnte eine Transfer-effizienz für den ursprünglichen, d.h. Nukleotid-freien Zustand extrapoliert und gemäß Gleichung 16 b mit Hilfe des Förster-Abstandes (R_0) (Lakowicz, 1999) eine Distanz des Donor/Akzeptor Paares in diesem Zustand berechnet werden.

$$F_t = F_{t=0} + \Delta F \cdot (1 - e^{-t/\tau}) \quad \text{Gleichung 16 a}$$

$$E_T(t) = 1 - \frac{F_t}{F_{t=0} + \Delta F} = 1 - \frac{F_t}{F_{t=\infty}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R(t)^6} \quad \text{Gleichung 16 b}$$

F_t :	Fluoreszenz bei 519 nm
t :	Zeit nach Zugabe von ADP/Mg ²⁺
τ :	Halbwertszeiten des Zerfalls
$F_{t=0}, \Delta F$:	Amplituden des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenz
$E_T(t)$:	zeitlicher Verlauf der Transfereffizienz
R_0 :	Förster-Abstand
R :	zeitlicher Verlauf der Distanz des Donor/Akzeptor Paares

2.8 Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse

2.8.1 Proteinkristallisation

Proteine können aus einer übersättigten, labilen Lösung durch Überwindung der Keimbildungsbarriere mit Hilfe von Fällungsreagenzien kristallisiert werden (Drenth, 1999). Dabei wird das Protein durch Konzentration von der stabilen Phase in die labile Phase überführt, in der sich mit Hilfe von Fällungsreagenzien Proteinkristallkeime bilden. Dies führt zu einem Absenken der Proteinkonzentration und überführt die Kristallkeime in die metastabile Phase, in der weitere Keimbildung unterbleibt, aber bereits bestehende mikroskopische Kristalle zu makroskopischen Kristallen wachsen. Für die Kristallisation von OpuAC wurde das *hanging-drop* Verfahren angewendet. Dabei wurde Proteinlösung mit Fällungslösung auf einem Deckglas gemischt und der Tropfen unter Luftabschluss über einem Reservoir von Fällungslösung inkubiert. Durch Dampfdiffusion findet dabei eine Konzentrationsanpassung zwischen der im Tropfen und im Reservoir befindlichen Fällungslösung statt. Bei geeigneter Wahl der Bedingungen kann dies zur Bildung von Proteinkristallen führen (Abb. 2.2).

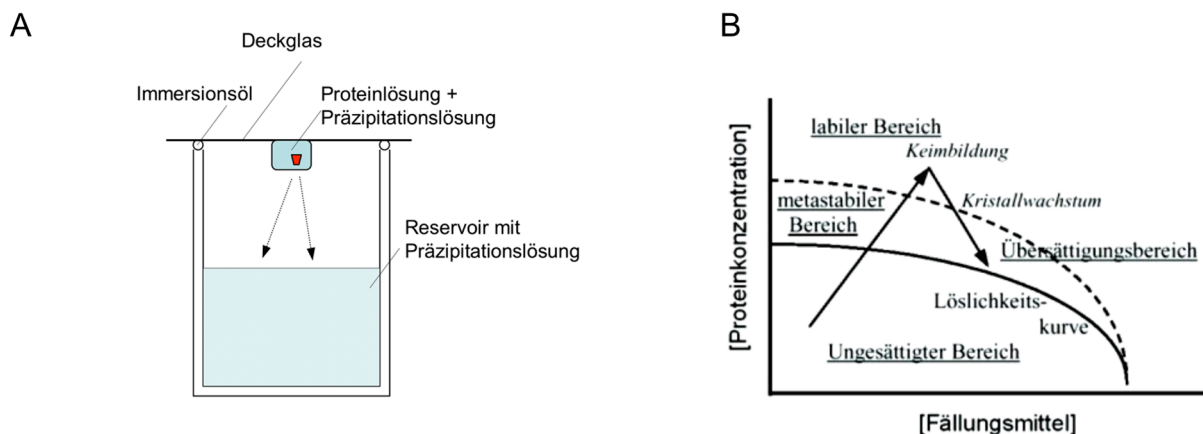


Abb. 2.2: **A:** Schematische Darstellung der Proteinkristallisation nach dem „hanging-drop“ Verfahren. Pfeile symbolisieren den durch Dampfdiffusion vermittelten Austausch von Wasser zwischen dem Proteintropfen und dem Reservoir. **B:** Phasendiagramm der Kristallisation von Proteinen aus übersättigten Lösungen.

Für die Kristallisation von OpuAC wurden die aus einer GPC erhaltenen Fraktionen von monomerem OpuAC auf 5 - 10 mg/mL in 10 mM Tris/HCl, pH 7,3 konzentriert. Anschließend wurde das Protein mit 1 mM Glycin-Betain bzw. 3 mM Prolin-Betain (100 mM Stammlösung in Wasser) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Proteinlösung, Fällungslösung und eventuell weitere Zusätze wurde auf einem Deckglas bei RT gemischt. 1 mL der Fällungslösung wurde in eine Vertiefung einer 24 well plate gegeben und dessen oberer Rand mit Immersionsöl benetzt. Das Deckglas wurde in inverser Orientierung vorsichtig auf den oberen Rand der Platte

gelegt, so dass sich der Proteintropfen über dem Reservoir befand. Die Kristallisationsansätze wurden bei 4 °C oder Raumtemperatur aufbewahrt und alle 48 h mit Hilfe eines Lichtmikroskops auf Kristallbildung untersucht. Die unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen sind in Kapitel 3.6.2 detailliert beschrieben.

Sämtliche Kristalle wurden mit Hilfe einer Nylon-Schleufe in *cryo* Puffer (150 mM Tris/HCl, pH 8,25, 200 mM NH₄OAc, 20 % (v/v) Polyethylenglykol 4000, 20 % (v/v) Ethylenglykol) überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Dewar Gefäß aufbewahrt. Proteinkristalle wurden an der BW6-Beamline des Desy, Hamburg vermessen und die Reflexe mit einem CCD Detektor (MarResearch, Norderstedt) aufgezeichnet.

2.8.2 Phasenbestimmung durch mehrfache anormale Dispersion

Die Proteinstruktur kann nicht *ab initio* aus den Beugungsreflexen eines nativen Proteinkristalls berechnet werden. Die hierfür notwendige Phaseninformation der gebeugten Welle ist verloren, da die Intensität eines Reflexes dem Quadrat seines Strukturfaktors F entspricht und somit nur dessen Betrag berechnet werden kann. Die Elektronendichte des Proteins kann daher nicht direkt berechnet werden (Drenth, 1999).

Das Phasenproblem kann z.B. durch mehrfache anormale Dispersion (engl. *multi-wavelength anomalous diffraction* (MAD)) gelöst werden, wenn anormale Streuzentren in das Protein eingeführt werden (Hendrickson *et al.*, 1988; Murthy *et al.*, 1988). Anormale Beugung wird durch Absorption der eingestrahlten Röntgenwelle von Atomen, gemäß dem Resonanzprinzip zweier Oszillatoren verursacht. Im Gegensatz dazu tritt in der normalen Röntgenbeugung keine Absorption auf. Der Effekt der anormalen Beugung verstärkt sich mit der Zahl der Elektronen in der Elektronenhülle der anormalen Streuzentren. So kann z.B. durch Substitution von Methionin durch SeMet im Protein unter geeigneten Bedingungen ein ausreichendes anormales Signal zur Lösung des Phasenproblems beobachtet werden.

In MAD Experimenten wird die Intensitätsdifferenz von symmetrieverwandten Friedel-Paaren, die nur bei anormaler Beugung existiert, zur Lösung des Phasenproblems ausgenutzt (Ungültigkeit des Friedel-Gesetzes). Jedes anormal streuende Atom hat einen atomaren Streufaktor f der sich aus drei Beiträgen zusammensetzt: 1.) Einen real-anormalen Teil $\Re f$ mit einem maximalen Betrag an der sog. *inflektion*-Wellenlänge (λ_{infl}). 2.) Einen imaginär-anormalen Teil $\Im f$ mit einem maximalen Betrag am Absorptionsmaximum von Se (λ_{max}). 3.) Einen nicht-anormalen Teil f_0 . Bei einer *remote*-Wellenlänge (λ_{rem}) jenseits von λ_{max} ist das anormale Signal zu vernachlässigen und es gilt wieder das Friedel-Gesetz. Optimale Intensitätsdifferenzen zwischen Friedels Paaren werden an λ_{max} erhalten. Optimale

Intensitätsdifferenzen gleicher hkl Reflexe werden zwischen λ_{infl} und λ_{rem} erhalten. Die Anormale Beugung zeigt damit eine starke Abhängigkeit von der Wellenlänge. Für MAD-Experimente erfordert dies eine exakte Einstellung der Wellenlänge, wie es nur an Teilchenbeschleunigern möglich ist. Zu Beginn des MAD Experimentes wird ein EXAFS (*extended X-ray absorption fine structure*)-Spektrum aufgenommen, um λ_{max} experimentell zu bestimmen, und λ_{infl} aus den spektroskopischen Daten gemäß der Kramers-Kronig Gleichung zu berechnen (Hendrickson *et al.*, 1988). Die Abbildung 2.3 zeigt den Verlauf der realen f' und imaginären f'' Komponente der anomalen Streuung an der K-Kante des Selens als eine Funktion der Wellenlänge.

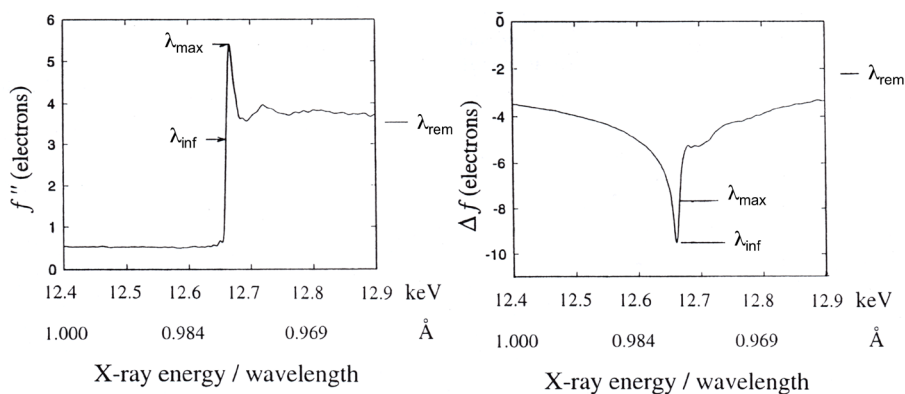


Abb. 2.3: Verlauf der realen f' und imaginären f'' Komponente der anomalen Streuung an der K-Kante des Selens als eine Funktion der Wellenlänge. Aus: (Drenth, 1999)

Die algebraische Formulierung der anomalen Beugung basiert auf einer von Karle (Karle, 1989) entwickelten Theorie und wurde von Hendrickson und Mitarbeitern weiter entwickelt (Hendrickson *et al.*, 1988). Prinzip hiervon ist eine Trennung des Strukturfaktors F in einen Anteil der nicht-anormal beugenden Atome (F_B), einen nicht-anormalen Anteil der Se Atome (F_A) mit Streufaktor f_0 und einen anomalen Anteil der Se Atome (\underline{a}) mit den Streufaktoren f' und f'' . Der komplette nicht-anormale Part des Strukturfaktors (F_{BA}) setzt sich aus der Summe von F_A und F_B , zusammen. Andererseits setzt sich der gesamte Strukturfaktor F aus anomalem und nicht-anomalem Teil zusammen ($F = F_{BA} + \underline{a}$). Diese Zusammenhänge können in einem Strukturfaktor-Vektordiagramm sehr anschaulich verdeutlicht werden (Drenth, 1999) und ergeben eine algebraische Lösung für $|F|^2$ gemäß Gleichung 17.

$$|F|^2 = |F_{BA}|^2 + p|F_A|^2 + |F_{BA}| \cdot |F_A| \cdot [q \cdot \cos(\varphi_{BA} - \varphi_A) + r \cdot \sin(\varphi_{BA} - \varphi_A)]$$

$$p = \frac{(f')^2 + (f'')^2}{f_0^2}, \quad q = 2 \cdot \frac{f'}{f_0}, \quad r = 2 \cdot \frac{f''}{f_0}$$

Gleichung 17

$|F|^2$ -Werte werden experimentell durch Messung eines Reflexes bestimmt. p , q und r sind Funktionen von φ und können aus dem atomaren Extinktionskoeffizient berechnet werden. Unbekannten Größen dieser Gleichung sind: $|F_{BA}|$, $|F_A|$ und $\varphi_{BA} - \varphi_A$ (φ_A : Phase von F_A , φ_{BA} :

Phase von F_{BA}). Alle drei Größen sind unabhängig von λ und für Friedel-Paare gleich, mit Ausnahme des Vorzeichens von $\varphi_{BA}-\varphi_A$. Ein Datensatz, der bei λ_{max} aufgenommen wurde, ergibt daher zwei Gleichungen, und bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen ist Gleichung 17 lösbar. Um die Elektronendichte der Einheitszelle zu berechnen, wird jedoch φ_{BA} benötigt. Dazu wird aus den $|F_A|^2$ -Werten mit Hilfe einer Patterson-Synthese die Lage der Se Atome in der Einheitszelle berechnet. Eine Patterson-Karte gibt den Abstand aller Se Atome zum Koordinatenursprung der Einheitszelle wieder, und für eine begrenzte Zahl von Se Atomen im Protein kann hieraus deren Position berechnet werden. Dies ermöglicht die Berechnung der Phase φ_A und damit letztendlich die Phase φ_{BA} . Damit können sämtlichen Struktur-faktoren F_{BA} Phasen zugeordnet werden und die Elektronendichte der Einheitszelle berechnet werden.

2.9 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Die Analyse von Messdaten zur Anpassung von Variablen erfolgte mit Hilfe des Programms KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA, USA). Emissionsmaxima wurden mit Hilfe des Programms DataMax (Jobin Yvon-Spex Instruments, Edison, NJ, USA) bestimmt. Physikalisch-chemische Parameter von Proteinen wurden mit Hilfe des Programms ProtParam des Servers (us.expasy.org) berechnet. Vergleiche der Aminosäuresequenz von Proteinen erfolgten mit dem Programm ClustAlW des Servers www.ebi.ac.uk. Für Identitätsvergleiche wurden die Aminosäuresequenzen mit Einträgen aus der pubmed Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed) mit Hilfe des Programms BLAST (Altschul *et al.*, 1997) des Servers (us.expasy.org) verglichen. Proteinmodelle wurden mit Hilfe der angegebenen Matrize durch das Programmpaket der Swiss Modell Repository (us.expasy.org) berechnet (Schwede *et al.*, 2003). Strukturbilder wurden mit Hilfe des Programms PYMOL (<http://pymol.sourceforge.net/>) angefertigt.

Daten aus Beugungsexperimenten wurden mit DENZO und SCALEPACK (Otwinowski, 1997) prozessiert. Mit Hilfe der Programme SHELXD (Sheldrick *et al.*, 1993) und SOLVE bzw. RESOLVE (Terwilliger & Berendzen, 1999) und wurden die Se-Atome aus MAD Experimenten lokalisiert und eine erste Elektronendichte berechnet. Die Berechnung der Elektronendichte durch *molecular replacement* erfolgte mit Hilfe des Programms AMoRe (Navaza, 1994). Das Programm O (Jones *et al.*, 1991) wurde zum Bauen eines Modells benutzt. Die Programme CNS (Brünger *et al.*, 1998) und Refmac5 (Murshudov *et al.*, 1997) des CCP4 Programmpaketes (<http://www.ccp4.ac.uk/main.html>) wurden zum nachfolgenden Verfeinern des Modells verwendet. Die Qualität des Modells wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Molekularbiologische Ergebnisse

Das Nukleotid-Bindeprotein, OpuAA, und das Transmembranprotein, OpuAB, des osmoreaktiven Transporters OpuA aus *B. subtilis*, sollten im Rahmen dieser Arbeit heterolog in *E. coli* produziert und bis zur Homogenität gereinigt werden. Dazu wurden zunächst Expressionsplasmide konstruiert, die für OpuAA bzw. OpuAB in Fusion mit Affinitätspeptiden kodierten. Die Affinitätspeptide sollten dabei einerseits eine spezifische Detektion der rekombinanten Proteine und andererseits ihre effiziente Reinigung durch eine Affinitätschromatographie gewährleisten. Der Einfluss der Affinitätspeptide auf die Aktivität oder Kristallisation von OpuAA bzw. OpuAB sollte jedoch neutral sein. Im Einklang mit diesen Überlegungen wurden OpuAA bzw. OpuAB an ihrem Amino-Terminus oder ihrem Carboxy-Terminus mit dem Histidin-*tag* oder dem Strep-*tag* (Schmidt & Skerra, 1993) fusioniert.

Um die richtige Faltung der heterolog produzierten Proteine zu gewährleisten und damit ihre Funktionalität sicherzustellen, wurden Expressionsplasmide getestet, die sich durch unterschiedliche Rate der Genexpression auszeichneten (Baneyx, 1999). Dies sollte zu einer Anreicherung des löslichen OpuAA im Zytosol bzw. eine Inkorporation des OpuAB in den bakteriellen Membranen führen. Damit sollte ein Optimum an Ausbeute einerseits und Funktionalität andererseits erreicht werden.

3.1.1 Konstruktion von Expressionsplasmiden zur bakteriellen Produktion von OpuAA und OpuAB mit Affinitätspeptiden

Ausgangspunkt für die Konstruktion von Expressionsplasmiden für die bakterielle Produktion von OpuAA war das Plasmid pBAD33-GFPuv (Abb. 3.1.1 A), das als bakteriellen Selektionsmarker das für die Chloramphenicol-Acetyltransferase kodierende Strukturgen *Cm* trug. pBAD33 (Guzman *et al.*, 1995) zeichnete sich durch seinen bakteriellen *araBAD* Promotor/Operator (p^{lo}) aus, der eine ökonomische und regulierbare Alternative zum Laktose p^{lo} darstellte. Der *araBAD* p^{lo} wurde durch das Genprodukt des *araC* Gens, das unter seiner eigenen Transkriptionskontrolle stand, reguliert. Eine Induktion des *araBAD* p^{lo} erfolgte in einer reversiblen und dosis-abhängigen Weise durch L(+)-Arabinose. Die Replikation des Vektors in einer Kopienzahl von 1 - 5 Plasmiden pro Zelle wurde durch den p15 *origin of replication (ori)* vermittelt. Damit zeichnete sich pBAD33 durch die Möglichkeit einer in Abhängigkeit von der Induktorkonzentration linearen Steigerungsrate der Genexpression über einen weiten Bereich aus und eignete sich für eine kontrollierte bakterielle Protein-

produktion. Dieses Kriterium wurde vor allem bedeutsam, wenn sich die intrazelluläre Konzentration des rekombinanten OpuAA oder OpuAB signifikant auf dessen Aggregationsverhalten oder die Bildung von Einschlusskörpern auswirken würde.

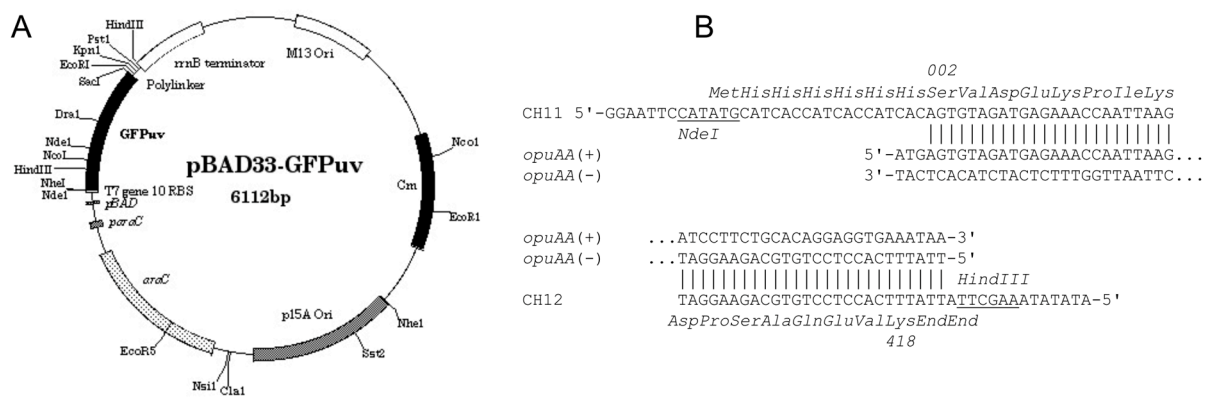


Abb. 3.1.1: Konstruktion des Expressionsplasmid pBAD33/His₆-OpuAA. **A:** Das Plasmid pBAD33-GFPuv mit Strukturgenen und Regulationselementen. Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind an der Außenseite des Kreises angegeben. **B:** Sequenzvergleich des opuAA Gens mit den Primern CH11 und CH12, die zur Amplifizierung des opuAA Gens in Fusion mit einem für den N-terminalen His₆-tag kodierenden DNA Bereich, verwendet wurden. Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind unterlegt, senkrechte Striche symbolisieren Basenkomplementarität mit dem (+) oder (-) Strang des opuAA Gens. Die kodierte Aminosäuresequenz ist in kursiver Schrift angegeben.

Zur Konstruktion des Expressionsplasmids pBAD33/His₆-OpuAA wurde das opuAA Gen von *B. subtilis* unter Verwendung des opuA⁺ Plasmids pBKB1 (Kempf & Bremer, 1995) als Templat mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die für die PCR verwendeten Oligodesoxynukleotide CH11 und CH12 waren zum 5'- bzw. 3'-Ende des opuAA Gens komplementär. Sie führten am 5'-Ende des opuAA Gens eine Erweiterung ein, die für das Hexahistidin-tag kodierte und eine NdeI Restriktionsschnittstelle sowie an seinem 3'-Ende eine HindIII Restriktionsschnittstelle enthielt (Abb. 3.1.1 B). Das PCR-Produkt und der Vektor pBAD33-GFPuv wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI und HindIII hydrolysiert, und die DNA Fragmente in einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das PCR Produkt und das Vektorfragment pBAD33 wurden isoliert und ligiert. Das erhaltene Plasmid pBAD33/His₆-OpuAA (Tabelle 3) wurde im Bereich des opuAA Gens sequenziert und war frei von Mutationen.

In ähnlicher Weise wurden weitere Expressionsplasmide konstruiert, die für OpuAA oder OpuAB in amino- oder carboxyterminaler Fusion mit Affinitätspeptiden kodierten (Tabelle 3).

5'-Primer	3'-Primer	p/o-System	Expressionsplasmid
CH7	CH8	araBAD	pBAD33/OpuAA-His ₆
CH11	CH12	araBAD	pBAD33/His ₆ -OpuAA
CH9	CH10	araBAD	pBAD33/OpuAB-Strep
CH9	CH10	T7/lac	pET21a/OpuAB-Strep
CH9	CH46	T7/lac	pET21a/OpuAB-His ₈
CH21	CH22	T7/lac	pET21a/His ₆ -OpuAB

Tabelle 3: Primerkombinationen zur Amplifizierung des *opuAA* bzw. *opuAB* Gens in Fusion mit Affinitätspeptiden. Die resultierenden PCR Produkte wurden in pBAD33 mit *araBAD*^{p/o} oder pET21a mit T7^{p/o} ligiert und entsprechende Plasmide zur bakteriellen Produktion von OpuAA oder OpuAB erhalten. Die gewählte Nomenklatur der Plasmide gibt die Fusion des Affinitätspeptid am N- oder C-Terminus des Proteins wieder (His= Histidin-tag, Strep= Strep-tag).

Als Alternative zu dem durch *araBAD*^{p/o} regulierte Expressionssystem des pBAD33 wurde der pET21a(+)-Expressionsvektor, dessen Genexpression unter Kontrolle des T7/lac^{p/o} stand, verwendet. Dieses von Studier *et al.* (Studier & Moffatt, 1986) entwickelte System, das eines der stärksten bekannten bakteriellen ^{p/o}-Systeme darstellt, wurde durch das Genprodukt des *lacI* Gens reprimiert und in Anwesenheit von IPTG in einer Dosis-unabhängigen Weise induziert. Die Genexpression erforderte dabei die Anwesenheit der T7-Phagen Polymerase, die beispielsweise im *E. coli* Stamm BL21(DE3) chromosomal kodiert ist. Die Verwendung des pET Systems zur Produktion von löslichen Proteinen kann aufgrund der massiven Expressionsrate zu signifikanter Bildung von Einschlusskörpern führen (Baneyx, 1999). Andererseits wurde für die Produktion von funktionellen Membranproteinen ein von Walker und Mitarbeitern (Miroux & Walker, 1996) modifizierter BL21(DE3) Stamm entwickelt, der für dieses Expressionssystem optimiert war. Diese Strategie versprach auch für OpuAB hohe Ausbeuten an funktionalem, heterolog produzierten Protein.

Die gemeinsame bakterielle Produktion von OpuAA und OpuAB erforderte, sofern die für sie kodierenden Gene nicht in einem dicistronischem Operon angeordnet waren, Expressionsplasmide die eine unterschiedliche Antibiotikaresistenz vermittelten. Damit sollte ein Verlust der Plasmide während der Kultivierung der Zellen vermieden werden. Auch im Einklang mit diesen Überlegungen war es sinnvoll das *opuAB* Gen mit Hilfe des pET21a(+) Plasmids zu exprimieren, da dieses eine bakterielle Resistenz gegen Ampicillin vermittelte und mit dem pBAD33 System, das eine Resistenz gegen Chloramphenicol gab, kompatibel war.

Für die Konstruktion von Expressionsplasmiden auf Grundlage des pET21a(+)-Systems wurde das *opuAB* Gen unter Verwendung des *opuA*⁺ Plasmids pKBK1 (Kempf & Bremer, 1995) als Templat mittels *PCR* amplifiziert. Durch die gewählten Oligodesoxynukleotid Paare wurden DNA Sequenzen eingeführt, die für Affinitätspeptide kodierten und am 5'-Ende eine *NdeI* bzw. am 3'-Ende eine *HindIII* Restriktionsschnittstelle erzeugten. Diese Klonierungsstrategie bot den Vorteil, dass sowohl das Start-Methionin, als auch das Stop-Kodon durch die Primer kodiert waren und somit nach Ligierung des *PCR*-Produktes in die multiple Klonierungsstelle des Plasmids keine zusätzlichen Aminosäurekodons in das Gen eingeführt wurden.

3.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese des *opuAA* Gens

Für einige *in vitro* Untersuchungen an OpuAA wie beispielsweise der Cystein-spezifischen Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen der Einführung eines Tryptophanrestes als Reporter zur Nukleotidbindung oder der Deletion einer potentiellen ribosomalen Bindestelle war es notwendig, ortsspezifisch Basen auszutauschen. Dafür wurde im *opuAA* Gen mit Hilfe einer zweistufigen *PCR* eine gerichtete Mutagenese durchgeführt.

A

```

NdeI
CH7      5'-GGAATTCATATGAGTGTAGATGAGAAACCAATTA
          |||
opuAA (+) 5'-ATGAGTGTAGATGAGAAACCAATTA.....CTGAAAGCAACCGGATCAACCGTTGGGGTTAAT-3'
opuAA (-) 3'-TACTCACATCTACTCTTTGGTTAAT.....GACTTTCGTTGGCCTAGTTGGCAACCCCAATTA-5'
          |||
CH28      GACTTTCGTTGGCCTACATGGCAACCCCAATTA-5'
          |||
          MetSerValAspGluLysProIleLys.....LeuLysAlaThrGlySerThrValGlyValAsn
          001                                     Cys
          045

```

B

```

CH29      5'-CTGAAAGCAACCGGATGTACCGTTGGGGTTAAT
          |||
opuAA (+) 5'-CTGAAAGCAACCGGATCAACCGTTGGGGTTAAT.....CAAGATCCTTTCGACAGGAGGTGAAA-3'
opuAA (-) 3'-GACTTTCGTTGGCCTAGTTGGCAACCCCAATTA.....GTTCTAGGAAGACGTCTCCACTTT-5'
          |||
CH8      GTTCTAGGAAGACGTCTCCACTTTGTAGTGGTAGTGGTAGTGATTATTCGAAATATATA-5'
          |||
          LeuLysAlaThrGlySerThrValGlyValAsn.....GlnAspProSerAlaGlnGluValLysHisHisHisHisHisHisHisEndEnd
          Cys
          045                                     418

```

Abb. 3.1.2: Sequenzvergleich des *opuAA* Gens mit Primern, die zur Amplifizierung des *opuAA* Gens, kodierend für den Austausch Serin 45 nach Cystein und als C-terminale Fusion mit dem His₆-tag, verwendet wurden. Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind unterlegt, senkrechte Striche symbolisieren Basenkomplementarität mit dem (+) oder (-) Strang des *opuAA* Gens. Die kodierte Aminosäuresequenz ist in kursiver Schrift angegeben. Sequenzvergleich von *opuAA* mit CH7/CH28 zur Amplifizierung des 5'-Fragments (A) und mit CH29/CH8 zur Amplifizierung des 3'-Fragments (B).

Für die Konstruktion des Expressionsplasmids pBAD33/OpuAA-His₆ S45C wurde zunächst ein 5'-und ein 3'-Fragment des *opuAA* Gens mit Hilfe eines flankierenden Primers und eines Mutationsprimers amplifiziert. Die flankierenden Primer CH7 und CH8, die zu dem

5'- bzw. 3'-Ende des *opuAA* Gens komplementär waren, enthielten Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme *NdeI* bzw. *HindIII* und kodierten darüber hinaus für das Affinitätspeptid. Die Mutationsprimer CH28 und CH29 wurden so konstruiert, dass die auszutauschenden Basen von einer zum (+) bzw. (-) Strang des *opuAA* Gen komplementären Sequenz aus jeweils 15 Basen flankiert war (Abb. 3.1.2). Das 5'- und 3'-Fragment, das in einem Bereich von 33 Basen überlappte, diente nun als Matrize für die zweite, komplementierende *PCR*, die nur unter Verwendung der flankierenden Primer durchgeführt wurde. Das erhaltene *PCR* Produkt wurde nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *HindIII* mit dem Vektorfragment pBAD33 ligiert. Das resultierende Expressionsplasmid pBAD33/OpuAA-His₆ S45C wurde im Bereich des *opuAA* Gens sequenziert und zeigte außer den gewünschten Basenaustauschen keine weiteren Mutationen. In ähnlicher Weise wurden weitere Expressionsplasmide konstruiert und analysiert, die für OpuAA Mutanten kodierten (Tabelle 4).

flankierender 5'-Primer	Mutationsprimer für (-) Strang	Expressionsplasmid mit Austausch	flankierender 3'-Primer	Mutationsprimer für (+) Strang
CH7	CH29	pBAD33/ OpuAA-His ₆ S45C	CH8	CH28
CH7	CH31	pBAD33/ OpuAA-His ₆ S171C	CH8	CH30
CH7	CH41	pBAD33/ OpuAA-His ₆ G161C	CH8	CH40
CH7	CH48	pBAD33/ OpuAA-His ₆ F19W	CH8	CH47
CH7	CH45	pBAD33/ OpuAA-His ₆ E195Q	CH8	CH44
CH7	CH14	pBAD33/ OpuAA-His ₁₀ bp G75A	CH16	CH15
CH17	CH14	pBAD33/ His ₁₀ -OpuAA bp G75A	CH12	CH15
CH7	CH25	pBAD33/ OpuAA-His ₁₀ M29V	CH16	CH26

Tabelle 4: Primerkombinationen zur ortsgerichteten Mutagenese des *opuAA* Gens. **Zwei linke Spalten:** Flankierender und Mutationsprimer zur Amplifizierung des 5'-Fragments. **Mittlere Spalte:** Nach einer komplementierenden *PCR* unter Verwendung des 5'- und 3'-Fragments wurde das resultierende *PCR* Produkt in einen pBAD33 Vektor ligiert und Plasmide mit den entsprechenden Austausch erhalten (bp: Basenpaar). Die gewählte Nomenklatur der Plasmide gibt die Fusion des Affinitätspeptids am N- oder C-Terminus des Proteins wieder (His= Histidin-tag). **Zwei rechte Spalten:** Flankierender und Mutationsprimer zur Amplifizierung des 3'-Fragments.

3.2 Produktion und Isolierung der Komponenten des OpuA-Transporters

Sämtliche isolierte Komponenten von OpuA aus *B. subtilis*, das Nukleotid-Bindeprotein OpuAA, das Transmembranprotein OpuAB und das Substrat-Bindeprotein OpuAC, sowie der Proteinkomplex, bestehend aus OpuAA und OpuAB (OpuAA/AB) sollten heterolog in *E. coli* produziert und bis zur Homogenität isoliert werden. Die Nutzung von *E. coli* als Wirt zur Proteinproduktion bot den Vorteil einer großen Auswahl genetisch gut charakterisierter Stämme und einer einfachen Kultivierung.

3.2.1 Bakterielle Produktion und Isolierung des rekombinanten OpuAA

Zur bakteriellen Produktion des rekombinanten OpuAA wurden *E. coli* DH5 α Zellen mit den Expressionsplasmiden pBAD33/OpuAA-His₆ oder pBAD33/His₆-OpuAA transformiert (Tabelle 3). Dieser *E. coli* Stamm wurde bereits erfolgreich für die bakterielle Produktion der NBD des Haemolysin B (HlyB) ABC-Transporters verwendet (Benabdelhak *et al.*, 2004). Die Kultivierung der Zellen erfolgte im 1 L Maßstab in LB/Cam-Medium unter Schütteln bei einer Temperatur von 25 °C. Bei einer OD₅₅₀= 0,5 erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 0,01 % (w/v) L(+)-Arabinose. Nach einer Induktionsdauer von 3 h erreichte die optische Dichte einen Plateauwert, und die Zellen wurden geerntet. Eine Erhöhung der Induktorkonzentration oder der Temperatur resultierte in der massiven Bildung von Einschlusskörpern. Ein solcher Effekt wurde auch für die HlyB-NBD beobachtet (Benabdelhak *et al.*, 2004).

Die Zellen wurden in LI Puffer resuspendiert, auf 1 mg/mL Lysozym eingestellt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der zytosolische Proteinextrakt mit Hilfe einer Ultraschall-Behandlung freigesetzt und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 100.000 g entfernt. Die Reinigung des rekombinanten His₆-OpuAA oder OpuAA-His₆ erfolgte anschließend mittels IMAC. Dazu wurde der lösliche Überstand der Zentrifugation auf eine Zn²⁺/IDA-Säule mit einem Bettvolumen von 5 mL aufgetragen. Nach Auswaschen der nicht-gebundenen Proteine erfolgte die kompetitive Elution des an das Säulenmaterials gebundenen OpuAA mittels eines linearen Gradienten von 10 – 300 mM Imidazol pH 8,0 in 15 Säulenvolumina. Die Elutionsfraktionen wurden zu 5 mL gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Beide rekombinanten OpuAA Konstrukte eluierten von der Zn²⁺/IDA-Säule bei einer Imidazolkonzentration von 120 mM. Dies deutete auf eine schwache Bindungswechsel-

wirkung des Hexahistidin-tags mit der Säulenmatrix hin. In der SDS-PAGE zeigten beide OpuAA Konstrukte als Konsequenz signifikante Kontaminationen mit *E. coli* Proteinen, die bei einer geringfügig niedrigeren Imidazolkonzentration ko-eluierten. Darüber hinaus wiesen die Elutionsfraktionen des OpuAA-His₆, jedoch nicht die des His₆-OpuAA, in der SDS-PAGE zwei signifikante Proteinbanden a und b auf (Abb. 3.2.1 A und B).

Da die Reinheit des rekombinanten OpuAA für *in vitro* Untersuchungen noch ungenügend war, wurden OpuAA enthaltende Elutionsfraktionen gegen LI Puffer dialysiert und einer zweiten IMAC unterzogen, die unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde. Die Analyse dieser Elutionsfraktionen zeigte eine Erhöhung der Reinheit des rekombinanten OpuAA auf ungefähr 80 %. Im Fall des OpuAA-His₆ wiesen die Elutionsfraktionen jedoch weiterhin zwei signifikante Proteinspezies a und b auf (Abb. 3.2.1 B). Es gelang somit nicht, unter diesen Bedingungen ein homogenes Produkt zu erhalten.

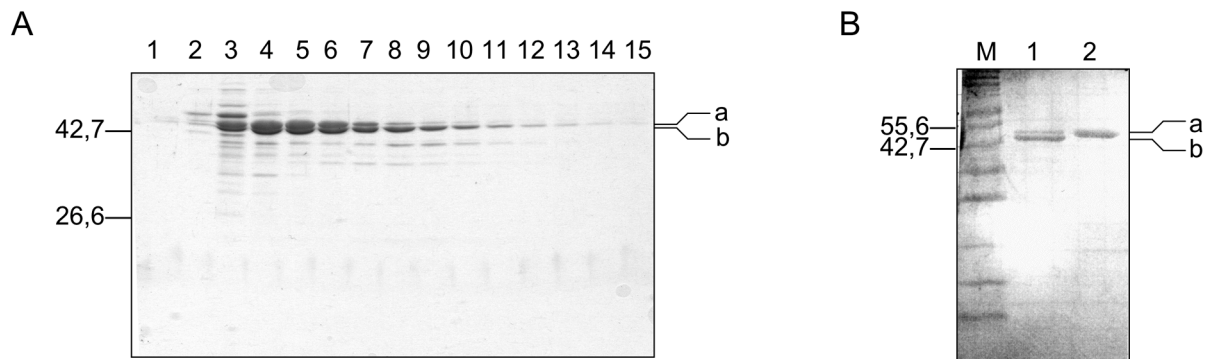


Abb. 3.2.1: Analyse von OpuAA durch 15 %ige SDS-PAGE (CBB Färbung, Markerproteine in kDa, Pfeile kennzeichnen Fragment a und b des OpuAA). **A:** OpuAA-His₆ wurde aus der zytosolischen Proteinfraction von *E. coli* DH5 α pBAD33/OpuAA-His₆ mittels IMAC isoliert. IMAC-Fractionen (1-15) zu 5 mL wurden während eines linearen Imidazolgradienten von 10 bis 300 mM gesammelt und entsprechen einer nominellen Zunahme der Imidazolkonzentration um jeweils 20 mM. **B:** OpuAA-His₆ (1) oder His₆-OpuAA (2) wurde aus den vereinigten IMAC-Fractionen mittels Re-IMAC isoliert.

Zur Identifikation der in der SDS-PAGE detektierten Banden wurde eine Massenbestimmung der Probe mittels MALDI durchgeführt. Dabei wurden zwei Spezies mit Massen von a) 47,2 kDa und b) 44,5 kDa nachgewiesen. Die erste Proteinspezies wurde mit intaktem OpuAA-His₆ (berechneten Masse von 47,3 kDa) assoziiert. Die zweite Spezies war ein N-terminales Fragment des OpuAA, da es vornehmlich in Präparationen von OpuAA, in C-terminaler Fusion mit dem His₆-tag, nachweisbar war. Eine Sequenzbestimmung auf Grund dieser Daten zeigte, dass Fragment 2 eine Deletion der ersten 28 Aminosäuren aufwies und Methionin29 als alternativer Amino-Terminus generiert wurde. Ein Sequenzvergleich des *opuAA* Gens im Bereich des für Methionin29 kodierenden Kodons mit der Konsensus-

sequenz der bakteriellen ribosomalen Bindestelle (RBS) (KS: AAGGAGGT) zeigte eine plausible Homologie (Abb. 3.2.2 A).

Damit eröffneten sich zwei Hypothesen, auf die eine Fragmentierung des OpuAA-His₆ zurückzuführen wäre: 1. Fragment b wird als alternatives Translationsprodukt des *opuAA* Gens generiert. 2. Fragment b wird durch Proteolyse von endogenen *E. coli* Proteasen erzeugt.

Zur Überprüfung der ersten Hypothese, der Proteinbiosynthese eines alternativen Translationsproduktes, wurde die Tatsache ausgenutzt, dass eine kodierende m-RNA sowohl eine ribosomale Bindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz), als auch ein ATG Start-Kodon enthalten muss. Es wurden daher Expressionsplasmide konstruiert, in denen entweder die potentielle Shine-Dalgarno-Sequenz durch den neutralen Basenaustausch Guanin75 gegen Adenin zerstört war oder in dem das potentielle, alternative Start-Methionin 29 durch Valin ersetzt war. In beiden Fällen wäre damit die Produktion eines alternativen Translationsproduktes inhibiert. Für eine optimierte Reinigung wurden beide Konstrukte C-terminal mit dem Dekahistidin-*tag* (His₁₀-*tag*) fusioniert (Tabelle 4).

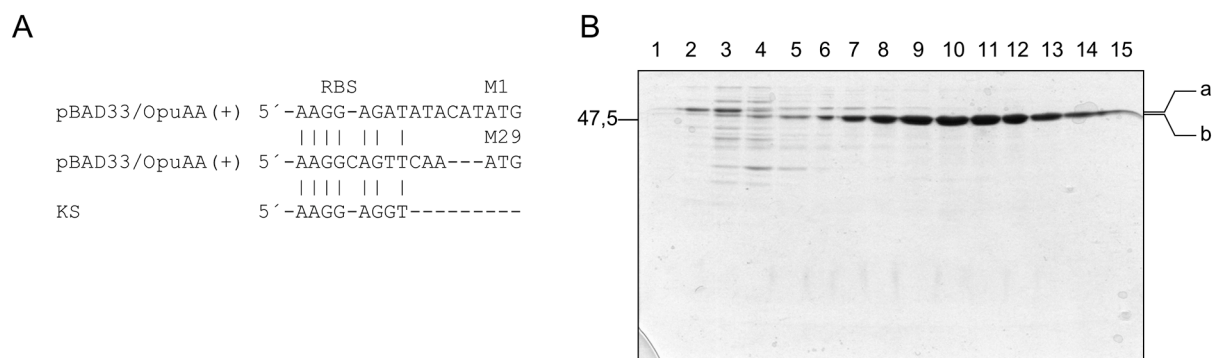


Abb. 3.2.2: A: Sequenzvergleich der Ribosomen-Bindestelle des pBAD33 Plasmids (obere Spur) mit der bakteriellen Konsensussequenz (KS) und einer potentiellen internen RBS im *opuAA* Gen (mittlere Spur) stromaufwärts des Met-Kodons29. **B:** Analyse von OpuAA-His₁₀ M29V durch 15 %ige SDS-PAGE (CBB Färbung, Markerprotein in kDa, Pfeile kennzeichnen Fragment a und b des OpuAA). OpuAA-His₁₀ M29V wurde aus der zytosolischen Proteinfraction von *E. coli* DH5 α pBAD33/ OpuAA-His₁₀ M29V mittels IMAC isoliert. IMAC-Fractionen (1-15) zu 5 mL wurden während eines linearen Imidazolgradienten von 10 bis 300 mM gesammelt und entsprechen einer nominellen Zunahme der Imidazolkonzentration um jeweils 20 mM.

E. coli DH5 α Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionsplasmiden pBAD33/OpuAA-His₁₀ G75A oder pBAD33/OpuAA-His₁₀ M29V (Tabelle 4) transformiert. Anzucht und Induktion der Zellen, sowie die Reinigung des rekombinanten OpuAA erfolgte in der bereits beschriebenen Weise. Die Analyse der durch IMAC erhaltenen Elutionsfraktionen durch

SDS-PAGE zeigte, dass durch Fusion des OpuAA mit dem His₁₀-tag eine optimierte Trennung des OpuAA von *E. coli* eigenen Proteinen erreicht wurde. Diese Konstrukte eluierten im Vergleich zu OpuAA-His₆ bei einer Imidazolkonzentration von mehr als 200 mM von der Zn²⁺/IDA-Säule. Dieser Effekt war auf eine bessere Zugänglichkeit des His₁₀-tag zum Säulenmaterial, aber auch auf eine erhöhte Zahl von Bindungsstellen zurückzuführen, die einen Rückbindungseffekt bewirkten. Dennoch wurde für beide Konstrukte in den Elutionsfraktionen sowohl intaktes OpuAA, als auch das Fragment b detektiert (Abb. 3.2.2 B).

Für die Überprüfung der zweiten Hypothese, einer Degradation des OpuAA durch bakterielle Proteasen, kam die Verwendung eines partiell Proteasen-defizienten *E. coli* Stammes in Betracht. Im Einklang mit dieser Überlegung wurde zur Produktion von OpuAA der *E. coli* Stamm BL21(DE3) genutzt, der gegenüber den Proteasen *lon* und *ompT* defizient war (Studier & Moffatt, 1986; Baneyx & Georgiou, 1990).

Darüber hinaus wurde der Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die Homogenität von OpuAA überprüft. Hierfür kam zunächst der Cystein-Proteaseninhibitor N-Ethylmaleinimid (NEM) in Frage, der freie Cysteine durch Alkylierung irreversibel modifiziert (Dick *et al.*, 1992), andererseits jedoch aufgrund fehlender Cysteine im OpuAA keinen Einfluss auf dessen Aktivität nehmen sollte. Die Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) Zellen, die mit dem Expressionsplasmid pBAD33/OpuAA-His₆ oder pBAD33/His₆-OpuAA (Tabelle 3) transformiert waren erfolgte in der bereits beschriebenen Weise. Während der Zellyse wurde der zytosolischen Proteinfraction 1 mM NEM zugesetzt.

Für die Reinigung des rekombinanten OpuAA-His₆ oder His₆-OpuAA mittels IMAC wurde eine HiTrap-Chelating® (Zn²⁺/IDA)-Säule mit einem Bettvolumen (BV) von 5 ml verwendet. Für eine optimierte Trennung des OpuAA von *E. coli* Proteinen wurden diese zunächst bei einer konstanten Imidazolkonzentration von 60 mM pH 8,0 in 6 Säulenvolumina eluiert. Die Elution des an die Säulenmatrix gebundenen OpuAA erfolgte dann durch einen linearen Imidazol-gradienten von 60 mM bis 300 mM pH 8,0 in 12 Säulenvolumina. OpuAA-His₆ oder His₆-OpuAA eluierte bei einer Imidazolkonzentration von 150 mM (Abb. 3.2.3 A).

Die Analyse der Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE zeigte, dass sowohl OpuAA-His₆, als auch His₆-OpuAA als homogenes Produkt erhalten wurden (Abb. 3.2.3 B und C). Die im Fall von OpuAA-His₆ zuvor beobachtete Fragmentierung konnte unter den gewählten Bedingungen unterdrückt werden. Damit war klar gezeigt, dass die Fragmentierung des OpuAA durch *E. coli* Proteasen hervorgerufen wurde, da unter Verwendung eines *lon* und *ompT* defizienten *E. coli* Stammes einerseits und der Behandlung der zytosolischen Proteinfraction mit NEM andererseits eine Fragmentierung des OpuAA verhindert wurde. Die Hypothese eines alternativen Translationsproduktes konnte somit eindeutig ausgeschlossen werden.

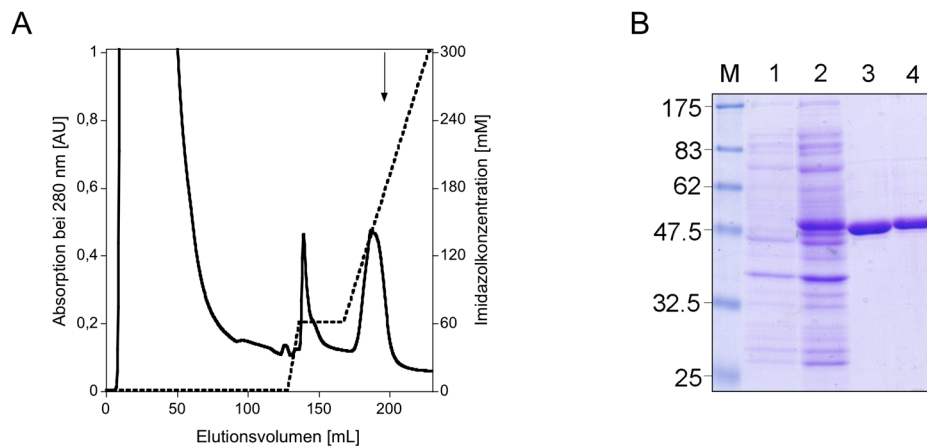


Abb. 3.2.3: Isolierung von OpuAA-His₆ und His₆-OpuAA **A:** Elutionschromatogramm einer Isolierung von OpuAA-His₆ aus der zytosolischen Proteinfraction von *E. coli* BL21(DE3) pBAD33/OpuAA-His₆ mittels IMAC. Absorption bei 280 nm (durchgezogene Linie) und Imidazolkonzentration (gestrichelte Linie). Der Pfeil markiert die Elution von OpuAA **B:** Analyse von OpuAA durch 12 %ige SDS-PAGE (CBB Färbung, Markerproteine in kDa). Gesamtprotein von *E. coli* BL21(DE3) pBAD33/OpuAA-His₆ vor Induktion (1), 3 h nach Induktion mit 0,01 % L(+)-Arabinose (2), vereinigte IMAC-Elutionsfraktionen von His₆-OpuAA (3) oder OpuAA-His₆ (4).

Damit wurden Bedingungen etabliert, die es ermöglichten, OpuAA-His₆ oder His₆-OpuAA mit 15 mg/L *E. coli* Zellkultur sowohl in ausreichender Ausbeute, als auch in ausreichender Reinheit zu erhalten, und es somit gestatteten *in vitro* Untersuchungen und Kristallisationsexperimente mit OpuAA durchzuführen.

3.2.2 Bakterielle Produktion und Reinigung von OpuAB

Das Transmembranprotein OpuAB sollte heterolog in *E. coli* produziert und aus dessen Membranfraction durch Affinitätschromatographie (AC) isoliert werden. Dies erforderte zunächst die Etablierung von Bedingungen für die Kultivierung der mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformierten *E. coli* Stämmen, unter denen OpuAB sowohl in ausreichender Ausbeute, als auch funktional in die bakterielle Membran integriert war. Anschließend mussten Parameter gefunden werden, die eine Solubilisierung von OpuAB und dessen Reinigung gewährleisten.

Zunächst wurde die bakterielle Produktion von OpuAB im analytischen Maßstab, d.h. unter Verwendung von 100 mL Kulturen, getestet. Dabei wurden Plasmide des pBAD33 und pET21a(+)-Expressionssystems verwendet, die für OpuAB in C-terminaler Fusion mit dem Strep-tag kodierten. Dies ermöglichte eine spezifische Detektion des OpuAB in der Gesamtzell- oder Membranproteinfraction mittels Streptavidin-AP im *Western Blot*.

In initialen Experimenten wurde *E. coli* DH5α mit dem Expressionsplasmid pBAD33/OpuAB-Strep bzw. *E. coli* BL21(DE3) mit dem Expressionsplasmid pET21a(+)/OpuAB-Strep

transformiert (Tabelle 3). Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und bei einer $OD_{550} = 0,6$ wurde die Genexpression durch Zugabe von 0,1 % (w/v) L(+)-Arabinose bzw. 1 mM IPTG für 3 h induziert. In der Analyse der Gesamtzellproteinfraktion durch *Western Blotting* wurde eine Proteinbande, die einer elektrophoretischen Mobilität von OpuAB entsprach und in Abwesenheit des Induktors nicht detektiert wurde, angefärbt. Dies wies auf die Produktion von OpuAB in beiden Kulturen hin. Daraufhin wurde die Membranfraktion der Kulturen isoliert, und Membranproteine mit Hilfe der nichtionischen Detergenzien n-Decyl- β -D-Maltosid (DM) und Triton X-100, sowie mit dem zwitterionischen Detergenz CHAPS solubilisiert. Durch Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde die lösliche Fraktion von unlöslichen Bestandteilen abgetrennt. In der Analyse der Fraktionen durch *Western Blotting* konnte OpuAB jedoch ausschließlich in den unlöslichen Bestandteilen nachgewiesen werden. Die Fraktionen an löslichen und damit solubilierten Proteinen enthielten dagegen kein OpuAB.

Es ergaben sich daraus zwei Konsequenzen: Einerseits war es plausibel, dass OpuAB in den Membranen vorlag, jedoch durch die verwendeten Detergenzien nicht solubilisiert werden konnte. Andererseits bestand die Möglichkeit, dass OpuAB als aggregierte Einschlusskörper produziert wurde. Sollte diese Hypothese wahr sein, mussten Bedingungen gefunden werden, die eine Produktion des OpuAB als Einschlusskörper verhinderte und seine Inkorporation in die bakteriellen Membranen unterstützte. Diesbezüglich kamen einerseits die Induktionsdauer und die Temperatur bzw. andererseits der Einsatz eines alternativen *E. coli* Stammes, der auf die Produktion funktionaler Membranproteine optimiert war, in Frage.

Eine erniedrigte Temperatur wie z.B. 25 °C oder 30 °C zur Kultivierung von *E. coli* Stämmen bewirkt eine Verlangsamung zellulärer Prozesse wie z.B. der Translation oder der Sekretion von Proteinen und unterstützt damit eine funktionale Faltung von rekombinanten Proteinen (Baneyx, 1999). Von Walker und Mitarbeitern wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) auf die Produktion der Untereinheiten b und c der bakteriellen Fo-ATPase optimiert (Miroux & Walker, 1996). Daraus resultierten die modifizierten Stämme BL21(DE3)/C41 und BL21(DE3)/C43, die eine ungewöhnliche Ausbildung intrazellulärer Membranstapel aufwiesen. Diese Stämme wurden beispielsweise erfolgreich für eine Überproduktion des ABC-Transporters YvcC aus *B. subtilis* verwendet (Steinfels *et al.*, 2002) und waren damit auch potentiell für eine Inkorporation von OpuAB in Membranen geeignet.

Im Einklang mit diesen Überlegungen wurden die *E. coli* Stämme BL21(DE3)/C41 und C43 mit dem Expressionsplasmid pBA33/OpuAB-Strep transformiert und bei 30 °C kultiviert. Die Induktion erfolgte mit 0,01 % (w/v) L(+)-Arabinose. Vor der Induktion und anschließend alle 30 min, für einen Zeitraum von 3 h, wurden Proben entnommen und das Gesamtzellprotein präpariert. Die Analyse dieser Proben durch *Western Blotting* zeigte zunächst

eine Akkumulation des OpuAB in der Zelle, die bei 90 min ein Optimum hatte. Jedoch nahm anschließend die Menge an OpuAB wiederum signifikant ab (Abb. 3.2.4). Dies deutete auf eine Degradation hin. Als Konsequenz wurde für alle weiteren Expressionsexperimente die Induktionsdauer auf 90 min beschränkt.

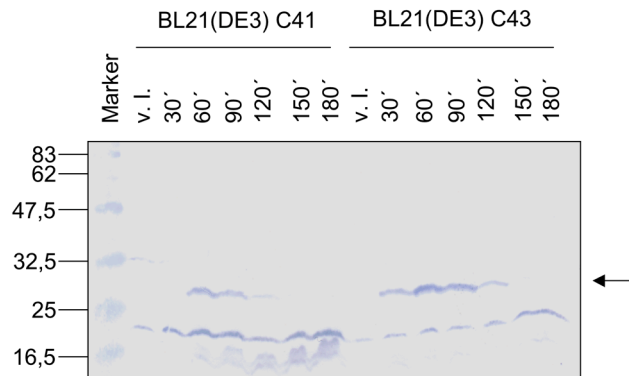


Abb. 3.2.4: Einfluss der Induktionsdauer auf die Produktion von OpuAB. 1 mL Proben von *E. coli* BL21(DE3)/C41 oder C43 pBAD33/OpuAB-Strep wurden vor Induktion (v.l.) und nachfolgend alle 30 min entnommen und das Gesamtzellprotein isoliert. Die Analyse von OpuAB-Strep (durch den Pfeil markiert) erfolgte im Western Blot (15 %ige SDS-PAGE, BCIP/NBT Färbung, Markerproteine in kDa) durch Nachweis des Strep-tags mittels Streptavidin-AP.

Die Membranfraktion, die aus der Probe 90 min post-Induktion entstammte, wurde präpariert und die Solubilisationsfähigkeit des OpuAB durch Zugabe unterschiedlicher Detergenzien in einer Endkonzentration, die der 5-10 fachen kritischen Mizellenkonzentration (cmc) entsprach, untersucht (le Maire *et al.*, 2000). Dabei wurden nicht-ionische Detergenzien wie Triton X-100 Triton X-114, DM, n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM), n-Octyl- β -D-Glukopyranosid (OG) oder C₁₂E₈, zwitterionische Detergenzien wie Lauryl-Dimethylamin-Oxid (LDAO), Zwittergent 3-12 oder CHAPS, und anionische Detergenzien wie Taurocholat, verwendet. Als ein Maß für die Gesamtmenge an OpuAB wurde auch eine Solubilisierung mit dem denaturierenden Detergenz SDS durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde der lösliche Überstand auf seinen Gehalt an solubiliertem OpuAB mittels *Western Blotting* untersucht. Dabei wurde OpuAB in allen Proben detektiert. Mit Ausnahme von OG und Taurocholat wiesen alle Detergenzien eine ähnliche Solubilisierungseffizienz für OpuAB auf (Abb. 3.2.5 A). Dieses Ergebnis zeigte, dass OpuAB in die bakteriellen Membranen inkorporiert war, da mit Hilfe milder Detergenzien wie z.B. DDM eine Solubilisierung gelang. Auch für eine Expression des OpuAB im pET21a(+)-System mit BL21(DE3)/C41 bei 30 °C und einer Induktorkonzentration von 1 mM konnte OpuAB mit 2 % (w/v) DDM erfolgreich solubilisiert werden (Abb. 3.2.5 B).

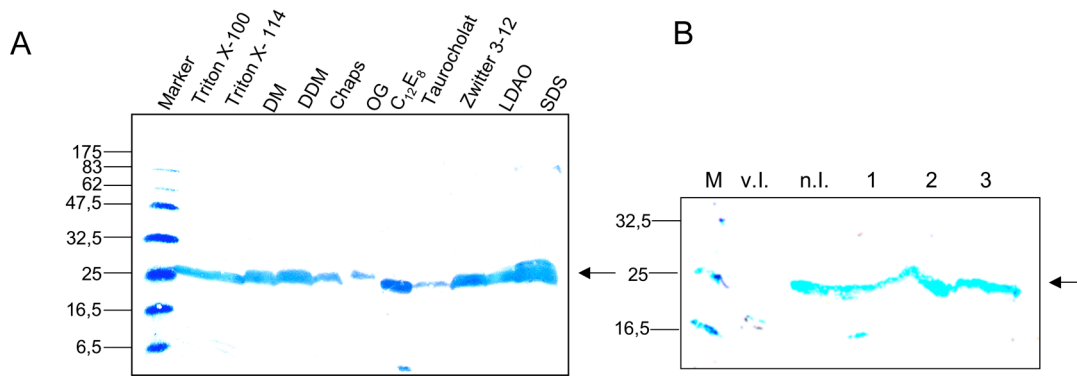


Abb. 3.2.5: Einfluss unterschiedlicher Detergenzien auf die Solubilisierungseffizienz von OpuAB. Die Analyse von OpuAB-Strep (durch den Pfeil markiert) erfolgte im Western Blot (15 %ige SDS-PAGE, BCIP/NBT Färbung, Markerproteine in kDa) durch Nachweis des Strep-tags mittels Streptavidin-AP. **A:** Die Membranfraktion von *E. coli* BL21(DE3)/C43 pBAD33/OpuAB-Strep wurde mit Detergenzien (5-10 fache cmc) versetzt und die lösliche Fraktion nach Zentrifugation isoliert. **B:** 1 mL Proben von *E. coli* BL21(DE3) C43 pET21a(+)/OpuAB-Strep wurden vor Induktion (v.l.) und 1,5 h nach Induktion mit 1 mM IPTG (n.l.) entnommen und das Gesamtzellprotein isoliert. Die Membranproteinfraktion der induzierten Kultur wurde vor (1 und 2), sowie nach Solubilisierung mit 2 % (w/v) DDM und Zentrifugation (3) analysiert.

Damit waren Bedingungen etabliert, die eine Produktion und Reinigung von OpuAB im präparativen Maßstab ermöglichten. Dazu wurde eine *E. coli* BL21(DE3)/C41 pBAD33/OpuAB-Strep Kultur in 1 L LB/Cam-Medium bei einer Temperatur von 30 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₅₅₀ = 0,6 erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase die Induktion durch Zugabe von 0,01 % (w/v) L(+)-Arabinose. Im Einklang mit vorherigen Experimenten wurden die Zellen nach einer Induktionsdauer von 90 min geerntet, in PBS Puffer resuspendiert, auf 1 mg/mL Lysozym eingestellt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Ultraschall-Behandlung aufgebrochen. Die bakteriellen Membranen wurden durch Zentrifugation bei 100.000 g sedimentiert und nachfolgend in SA Puffer, der zusätzlich 10 % (v/v) Glycerin enthielt, schonend resuspendiert. Die Solubilisierung der Membranproteine erfolgte unter Zusatz von 2 % (w/v) DDM für 1 h bei 4 °C. Die Reinigung des rekombinanten OpuAB-Strep erfolgte anschließend mittels Streptavidin-AC. Dazu wurde der lösliche Überstand, der nach einer weiteren Zentrifugation bei 100.000 g gewonnen wurde, auf eine Strep-Tactin[®]-Säule mit einem Bettvolumen von 2 mL aufgetragen. Nach Auswaschen der nicht-gebundenen Proteine erfolgte die kompetitive Elution des an das Säulenmaterials gebundenen OpuAB durch Zugabe von 2,5 mM D-Desthiobiotin. Die Elutionsfraktionen wurden zu 2 mL gesammelt und durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.2.6 A).

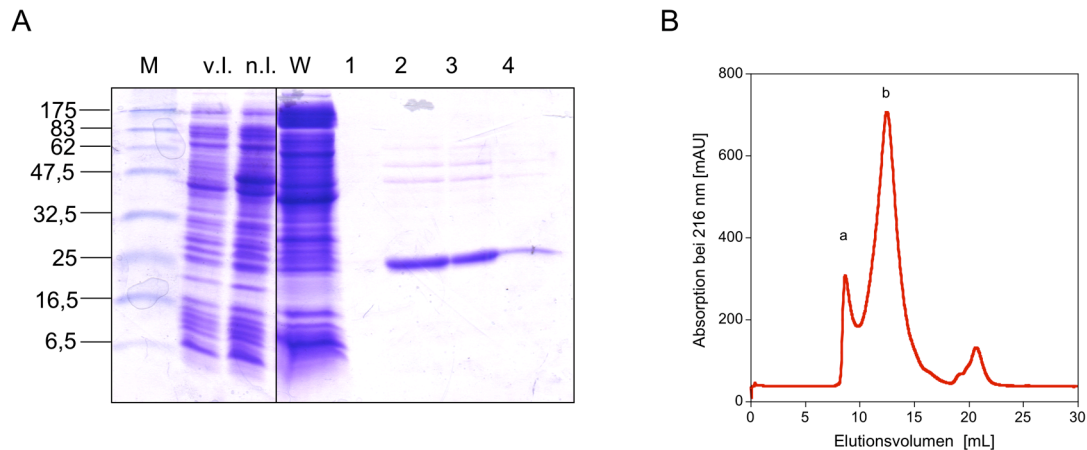


Abb. 3.2.6: Isolierung und Analyse von OpuAB. **A:** Analyse von OpuAB-Strep (durch den Pfeil markiert) durch 15 %ige SDS-PAGE (CBB Färbung, Markerproteine in kDa). OpuAB-Strep wurde aus der Membranproteinfraction von *E. coli* BL21(DE3)/C41 pBAD33/OpuAB-Strep (vor Induktion (v.l.), 3 h nach Induktion mit 0,01 % L(+)-Arabinose (n.l.)) mittels Streptavidin-AC isoliert. Fraktionen zu 2 mL wurden während des Durchlaufs (D) und der Zugabe von 2,5 mM D-Desthiobiotin (1-4) gesammelt. **B:** Elutionschromatogramm einer Isolierung von OpuAB-Strep aus den vereinigten Elutionsfraktionen der Streptavidin-AC mittels GPC (Superdex 200, BV: 24 mL). a und b markieren OpuAB enthaltende Peaks.

Dabei zeigte sich, dass OpuAB-Strep mit einer geschätzten Reinheit von mehr als 90 % und einer Ausbeute von 0,5 - 1 mg/L *E. coli* Kultur erhalten wurde. Der Oligomerisierungszustand des erhaltenen OpuAB-Strep wurde anschließend durch analytische GPC untersucht. Dazu wurden die Elutionsfraktionen vereinigt und auf eine Superdex 200 HR 10/30 aufgetragen. Im Chromatogramm wurden zwei Peaks a und b detektiert (Abb. 3.2.6 B). Aggregiertes OpuAB (Peak a) eluierte am Ausschlussvolumen der Säule während Peak b wahrscheinlich dimerem OpuAB entspricht. Das apparente Molekulargewicht dieses Peaks (ca. 150 kDa) entspricht ungefähr der Summe aus dem Molekulargewicht eines OpuAB Dimers (ca. 60 kDa) und einer Detergenzmizelle (ca. 70 kDa) (Bhairi, 1979).

Zur bakteriellen Produktion von OpuAB in N-terminaler Fusion mit dem Hexahistidin-*tag* bzw. in C-terminaler Fusion mit dem Oktahistidin-*tag* wurde das pET21a(+) Expressionssystem genutzt. Dazu wurde der *E. coli* BL21(DE3)/C41-Stamm mit den Plasmiden pET21a(+)/His₆-OpuAB bzw. pET21a(+)/OpuAB-His₈ transformiert (Tabelle 3). Die Kultivierung der Zellen erfolgte im 1 L Maßstab in LB/Amp-Medium unter Schütteln bei einer Temperatur von 30 °C. Bei einer OD₅₅₀ = 0,6 erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase die Induktion durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach einer Induktionsphase von 90 min wurden die Zellen geerntet und die Membranfraktion wie bereits im Fall des OpuAB-Strep beschrieben präpariert. Die bakteriellen Membranen wurden anschließend ohne Detergenz

in LI Puffer mit 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und Membranproteine in 2 % (w/v) DDM für 1 h bei 4 °C solubilisiert. His₆-OpuAB bzw. OpuAB-His₈ wurde durch IMAC gereinigt. Hierzu wurde der nach einer Zentrifugation bei 100.000 g gewonnene lösliche Überstand auf eine HiTrap-Chelating® (Zn²⁺/IDA)-Säule mit einem Bettvolumen von 1 mL aufgetragen. Nach Auswaschen der nicht-gebundenen Proteine erfolgte die kompetitive Elution des an das Säulenmaterials gebundenen OpuAB mittels eines linearen Gradienten von 10 - 300 mM Imidazol pH 8,0 in 15 Säulenvolumina und weitere Zugabe von 300 mM Imidazol. Die Elutionsfraktionen wurden zu 1 mL gesammelt und SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.2.7 A).

Dabei zeigte sich, dass OpuAB bei hohen Imidazolkonzentrationen eluierte (His₆-OpuAB: ca. 200 mM; OpuAB-His₈: 300 mM). Ausbeute und Reinheit waren mit den Präparationen von OpuAB-Strep vergleichbar (0,5 – 1 mg/L *E. coli* Kultur). Auch in der analytischen GPC zeigten beide mit dem Histidin-*tag* fusionierten OpuAB Konstrukte ein mit OpuAB-Strep vergleichbares Elutionsverhalten (Abbildung nicht gezeigt).

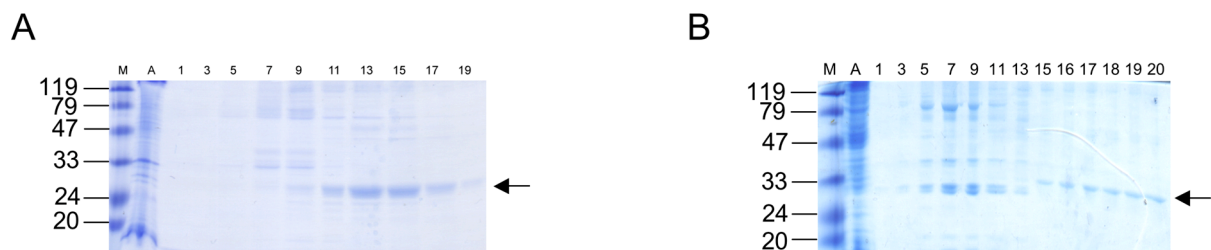


Abb. 3.2.7: Analyse von His₆-OpuAB und OpuAB-His₈ (durch den Pfeil markiert) durch 15 %ige SDS-PAGE (CBB Färbung, Markerproteine in kDa). **A:** His₆-OpuAB wurde aus der Membranproteinfraktion von *E. coli* BL21(DE3)/C41 pET21a(+)/His₆-OpuAB mittels IMAC isoliert. **B:** OpuAB-His₈ wurde aus der Membranproteinfraktion von *E. coli* BL21(DE3)/C41 pET21a(+)/OpuAB-His₈ isoliert. **A und B:** Die IMAC-Fraktionen (1-15) zu 1 mL wurden während eines linearen Imidazolgradienten von 10-300 mM gesammelt und entsprechen einer nominellen Zunahme der Imidazolkonzentration um jeweils 20 mM. Weitere Elutionsfraktionen (16-20) zu 1 mL wurden bei 300 mM Imidazol gesammelt.

3.2.3 Bakterielle Produktion und Reinigung von OpuAC

Für die bakterielle Produktion von OpuAC fand in dieser Arbeit das von Kempf *et al.* beschriebene Expressionsplasmid pBKB76 Verwendung, das für OpuAC mit einer Deletion des Signalpeptids und Cys21 kodierte (Kempf *et al.*, 1997). Dieses Lipid-freie Konstrukt war in N-terminale Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP) und einer Sequenz, die von Faktor Xa erkannt wurde (Abb. 3.6.1 B). Dies ermöglichte eine effiziente Reinigung des

rekombinanten Proteins durch Amylose-AC und Freisetzung von OpuAC aus dem Fusionsprotein durch eine Faktor-Xa-Proteolyse.

Die mit pBKB76 transformierten *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden in Glukose-Minimalmedium unter iso-osmotischen Bedingungen kultiviert. Dabei wurde bewusst auf die Verwendung von Vollmedium, das geringe Spuren an kompatiblen Soluten enthält, verzichtet, um Aufnahme dieser Substanzen aus dem Medium und Bindung eines heterogenen Ligandgemisches an das rekombinante OpuAC zu vermeiden. Die heterologe Proteinexpression erfolgte bei 30 °C durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach dreistündiger Induktionsphase wurden die *E. coli* Zellen geerntet und die zytosolische Proteinfraction isoliert. Daraus wurde das rekombinante Fusionsprotein mittels Amylose-AC gereinigt. Analyse der Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE zeigte, dass sowohl das intakte Fusionsprotein (MBP-Xa-OpuAC), als auch signifikante Mengen an MBP isoliert wurden. Dies impliziert eine bereits während der Induktionsphase durch zelluläre Proteasen katalysierte Proteolyse des Fusionsproteins im Bereich der Faktor Xa Erkennungssequenz. Dieser Bereich im Fusionsprotein liegt vermutlich ungefaltet vor oder ist für Proteasen frei zugänglich, was ein bereits hinreichendes Kriterium einiger *E. coli* Proteasen für die Proteolyse ist (Smith *et al.*, 1999).

Anschließend wurde OpuAC durch eine Faktor-Xa-Proteolyse aus dem Fusionsprotein freigesetzt. Die Menge an Fusionsprotein wurde anhand eines CBB gefärbten Gels abgeschätzt. Der Reaktionsansatz wurde auf 2 mM CaCl₂ und 2 % (w/w), bezogen auf das Fusionsprotein, Faktor Xa eingestellt und für 16 h bei 4 °C inkubiert. Die Analyse der Proteolyse durch SDS-PAGE ergab dabei eine nahezu quantitative Freisetzung von OpuAC aus dem Fusionsprotein.

Die Isolierung von OpuAC aus dem Reaktionsansatz erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie (AAC). Dazu wurde der Reaktionsansatz dreimalig gegen Chromatographiepuffer (25 mM Tris/HCl, 25 mM NaCl, pH 8,3) dialysiert und auf eine HiTrap Q[®] Säule aufgetragen. Unter den gewählten pH Bedingungen wies OpuAC eine positive Nettoladung auf. Im Einklang mit dieser Überlegung zeigte OpuAC keine Wechselwirkung mit der Säulenmatrix und wurde im Durchlauf erhalten. Im Gegensatz dazu banden MBP und Faktor Xa an die Säulenmatrix und wurden durch einen linearen NaCl Gradienten (25 - 1 M NaCl in 25 mL 25 mM Tris/HCl, pH 8,3) von der Säule eluiert. Die Fraktionen des Durchlaufs wurden mittels SDS-PAGE auf ihren Gehalt und dessen Reinheit an OpuAC analysiert. Dabei zeigte sich, dass OpuAC von MBP und Faktor Xa abgetrennt wurde.

Abschließend wurde OpuAC einer Gelpermeationschromatographie (GPC) unterzogen, um Proteinaggregate von löslichem OpuAC abzutrennen. Dafür wurden die in der AAC erhaltenen Fraktionen auf ein geeignetes Volumen, bei einer maximalen Protein-

konzentration von 10 mg/mL, konzentriert und auf eine Superdex 200 Säule aufgetragen, die zuvor mit 10 mM Tris/HCl pH 7,3 äquilibriert war. Ein symmetrischer Peak bei einer apparenten Masse von 28 kDa wurde detektiert, der monomeren OpuAC (berechnete Masse: 30,3 kDa) entsprach (Abb. 3.2.8 A). Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE zeigte eine geschätzte Reinheit von über 99 % (Abb. 3.2.8 B) mit einer Ausbeute von 10 mg/L *E. coli* Kultur. Zur Lagerung wurde OpuAC bei 4°C aufbewahrt und zeigte unter diesen Bedingungen auch nach mehreren Wochen nur marginale Bildung von Aggregaten.

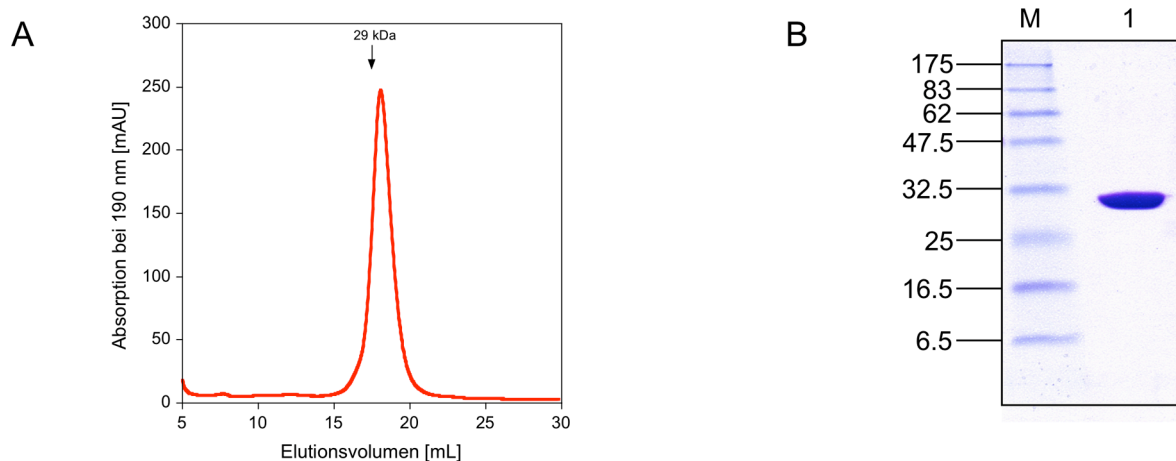


Abb. 3.2.8: Analyse des durch AAC isolierten rekombinanten OpuAC. **A:** GPC an einer Superdex 200 HR Säule, BV: 24 mL. Das Elutionsvolumen eines Markerproteins mit 29 kDa ist durch den Pfeil gekennzeichnet. **B:** 15 % SDS-PAGE (CBB Färbung). M: Markerproteine in kDa, 1: OpuAC.

Für nachfolgende Röntgenbeugungsexperimente wurde ein Seleno-Methionin (SeMet) substituiertes OpuAC benötigt, um mit Hilfe eines MAD Experimentes das Phasenproblem zu lösen (Kapitel 2.8.2). Hierzu wurde während der bakteriellen Expression von OpuAC vor der Induktionsphase die bakterielle Methionin Biosynthese durch die Zugabe der Aminosäuren Lysin, Phenylalanin, Threonin, Isoleucin, Leucin und Valin inhibiert (Doublet, 1997), und schließlich durch Zugabe von SeMet ein stöchiometrischen Einbau in OpuAC erreicht. Die Proteinreinigung erfolgte wie bereits beschrieben. Die Reinheit von SeMet substituierten OpuAC entsprach jener der nativen Form, jedoch mit einer geringeren Ausbeute (0,5 mg/L *E. coli* Kultur). Die Stöchiometrie der SeMet Substitution wurde mittels Massenspektrometrie analysiert und ergab eine Substitution aller 10 im OpuAC befindlichen Methionine durch SeMet. Die ermöglichte die Verwendung des Proteins für MAD Experimente (Kapitel 3.6).

3.2.4 Bakterielle Produktion und Reinigung von OpuAA/AB

Nachdem die bakterielle Produktion und Reinigung der isolierten Komponenten OpuAA und OpuAB des OpuA-Transporters etabliert waren, wurde die gemeinsame Produktion und Reinigung dieser Komponenten untersucht. Vorrangiges Ziel dabei war die Etablierung von

Bedingungen, die eine Isolierung des OpuAA/AB Komplex ermöglichten. *In vivo* bilden OpuAA und OpuAB vermutlich einen permanenten, tetrameren Komplex, der aus einem Dimer der Einzelkomponenten (OpuAA)₂ und (OpuAB)₂ besteht (Kapitel 1.3).

Hierfür kamen zwei Strategien in Frage: Einerseits war es möglich, beide Strukturgene in einem dicistronischen Operon zu organisieren. Diese Strategie wäre identisch mit der Situation *in vivo*, in der sämtliche für den OpuA-Transporter kodierenden Gene im *opua*⁺ Operon organisiert sind (Kempf & Bremer, 1995). Als zweite Strategie kam eine Ko-Expression der Gene in Frage, wobei das *opuAA* und *opuAB* Gen auf unterschiedlichen Expressionsplasmiden kodiert war. Diese Strategie bot den Vorteil, dass bereits bestehende Expressionsplasmide für die separate Produktion von OpuAA oder OpuAB genutzt werden konnten. Im Hinblick auf den bereits bestehenden Satz von Expressionsplasmiden von OpuAA, der diverse Affinitätsanhängsel an C- oder N-Terminus, funktionale und Cystein-Mutanten umfasste, wurde daher die zweite Strategie bevorzugt.

Eine Grundvoraussetzung für diese Strategie war eine unterschiedliche Antibiotikaresistenz, die von den beiden Expressionsplasmiden vermittelt wurde. Damit konnten beide Plasmide gemeinsam und dauerhaft von den Bakterien beherbergt werden. Hierfür kam im Fall des OpuAA, der pBAD33 Expressionsvektor zum Einsatz, der eine Chloramphenicol-resistenz vermittelte und im Fall des OpuAB der pET21a(+) Vektor, der den Bakterien eine Resistenz gegen Ampicillin gab. Zunächst wurden *E. coli* BL21(DE3)/C41 Zellen mit dem entsprechenden pET21a(+)-Vektor transformiert und nach Überführung dieser Zellen in eine transformationskompetente Form eine nachfolgende Transformation der Zellen mit dem entsprechenden pBAD33 Vektor durchgeführt.

In einer ersten Reihe von Experimenten wurden hierfür *E. coli* BL21(DE3)/C41-Zellen mit den Expressionsplasmiden pBAD33/OpuAA-His₆ und pET21a(+)/OpuAB-Strep transformiert. Die Kultivierung der Zellen im 1 L Maßstab erfolgte unter Bedingungen, die bereits für eine erfolgreiche Produktion von OpuAB etabliert wurden, d.h. bei 30 °C und einer Induktionsphase von 90 min. Dem Medium wurde dabei Chloramphenicol und Ampicillin zugegeben. Bei einer optischen Dichte von 0,6 - 0,7 wurden die Genexpression in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von 0,01 % (w/v) L(+)-Arabinose und 1 mM IPTG induziert. Nach einer Induktionsphase von 90 min wurden die Zellen geerntet. Die bakteriellen Membranen wurden wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben isoliert, wurden dann jedoch in K Puffer (50 mM KPi, pH 8,0, 200 mM KCl, 20 % (v/v) Glycerin) gewaschen und resuspendiert. Diese Bedingungen wurden bereits erfolgreich für die Isolierung des OpuA-Transporters aus *L. lactis* angewendet (van der Heide & Poolman, 2000) und sollten auch in diesem Fall eine Stabilisierung des Proteinkomplexes bewirken. In Vorexperimenten wurde ersichtlich, dass eine Erniedrigung der Glycerin Konzentration eine signifikante Destabilisierung des

OpuAA/AB Komplex zur Folge hatte und eine schwache Wechselwirkung dieser Komponenten impliziert.

Die Membranproteine wurden mit 2 % (w/v) DDM (oder alternativ 2 % (v/v) Triton X-100, siehe Kapitel 3.4) für 1 h bei 4 °C solubilisiert. Der OpuAA/AB Komplex wurde mit Hilfe eines Hexahistidin-*tags*, der sich am C-Terminus des OpuAA befand, durch IMAC isoliert. Dafür wurde das Solubilisat einer Zentrifugation bei 100.000 g unterzogen, um unlösliche Bestandteile abzutrennen, und der lösliche Überstand auf eine Zn²⁺/IDA-Säule mit einem Bettvolumen von 1 mL aufgetragen. Nach Auswaschen der nicht-gebundenen Proteine erfolgte die kompetitive Elution des an das Säulenmaterials gebundenen OpuAA/AB mittels eines linearen Gradienten von 10-300 mM Imidazol pH 8,0 in 15 Säulenvolumina (Abb. 3.2.9 A). Elutionsfraktionen wurden zu 1 mL gesammelt und durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.2.9 B).

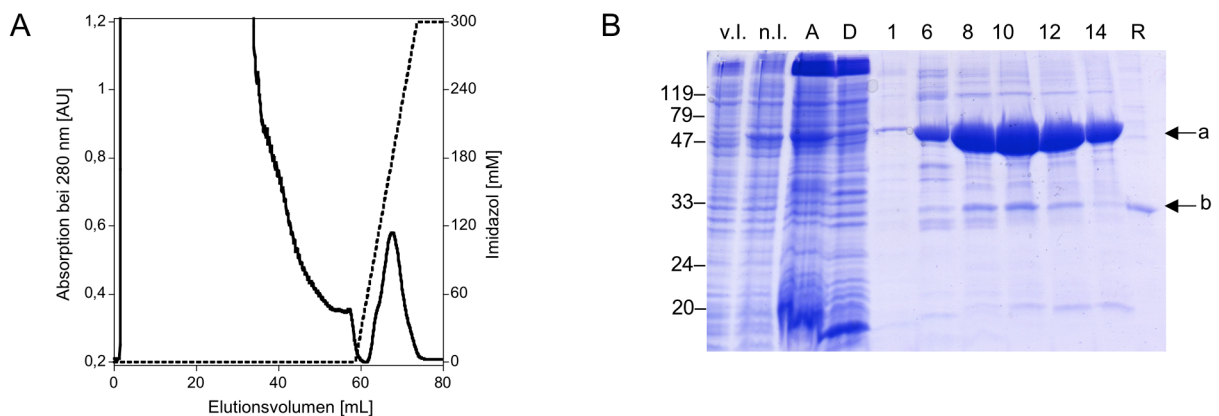


Abb. 3.2.9: Isolierung von OpuAA/AB aus der Membranproteinfraction von *E. coli* BL21(DE3)/C41 pBAD33/OpuAA-His₆ pET21a(+)/OpuAB-Strep mittels IMAC. **A:** Elutionschromatogramm der IMAC mit Absorption bei 280 nm (durchgezogene Linie) und Imidazolkonzentration (gestrichelte Linie). **B:** Analyse von OpuAA/AB durch 15 %ige SDS-PAGE (CBB Färbung, Markerproteine in kDa, Pfeile markieren OpuAA (a) und OpuAB (b)). Gesamtprotein von *E. coli* BL21(DE3)/C41 pBAD33/OpuAA-His₆ pET21a(+)/OpuAB-Strep vor Induktion (v.l.) und 1,5 h nach Induktion mit 0,01 % L(+)-Arabinose und 1 mM IPTG (n.l.), Säulenauftrag (A), Durchlauf (D), OpuAB Referenz (R). IMAC-Fractionen (1-15) zu 1 mL wurden während eines linearen Imidazolgradienten von 10-300 mM gesammelt und entsprechen einer nominellen Zunahme der Imidazolkonzentration um jeweils 20 mM (siehe A).

Dabei zeigte sich, dass in der durchgeführten IMAC sowohl OpuAA (Bande a), als auch OpuAB (Bande b) ko-eluierten. Die Identität von OpuAB wurde durch Nachweis des Strep-*tag* in einem *Western Blot* demonstriert (Abbildung nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigte Bande b eine ähnliche elektrophoretische Mobilität, wie gereinigtes OpuAB-His₆, das als Referenz mitgeführt wurde.

OpuAA und OpuAB eluieren nicht in einem stöchiometrischen Verhältnis, da OpuAA in etwa 10-fachem Überschuss zu OpuAB vorlag. Dies implizierte eine Assoziation des OpuAA mit der Membranfraktion von *E. coli*, da nur diese Fraktion für die Isolierung des Komplexes verwendet wurde. Dabei könnte OpuAA an die Membran entweder peripher assoziiert sein oder sogar integral assoziiert sein. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Expression und Reinigung des Maltose Transporters aus *T. litoralis* oder *E. coli* (Reich-Slotky *et al.*, 2000; Greller *et al.*, 2001) sowie für den Ribose-Transporter aus *E. coli* (J. Zaitseva, persönliche Mitteilung) erhalten. Um den OpuAA/AB Komplex in einem stöchiometrischen Verhältnis zu erhalten, wurden die Elutionsfraktionen einer Streptavidin-AC unterzogen. Dabei sollte OpuAA/AB mit Hilfe des Strep-tags am C-Terminus des OpuAB an die Säulenmatrix binden, während überschüssiges OpuAA die Säule passiert. Der Komplex wurde jedoch ausschließlich im Durchlauf detektiert. Somit fand keine Bindungswechselwirkung des Strep-tags mit der Säulenmatrix statt, und es ist anzunehmen, dass der Strep-tag aufgrund der Interaktion von OpuAB und OpuAA nicht zugänglich war. Die Einführung einer Poly-Glycin/Serin Verbindung zwischen dem C-Terminus von OpuAB und dem Strep-tag könnte zur Lösung dieses Problems dienen.

Alternativ wurden die Elutionsfraktionen einer präparativen GPC unterzogen, um den tetrameren Komplex des OpuAA/AB von monomerem oder dimerem OpuAA (Kapitel 3.3) aufgrund der Massendifferenz zu trennen. Dazu wurden die IMAC Elutionsfraktionen auf eine Superdex 200 HR aufgetragen, die zuvor mit K Puffer und 0,01 % (v/v) Triton X-100 äquilibriert wurde und Elutionsfraktionen zu 2 mL gesammelt (Abb. 3.2.10).

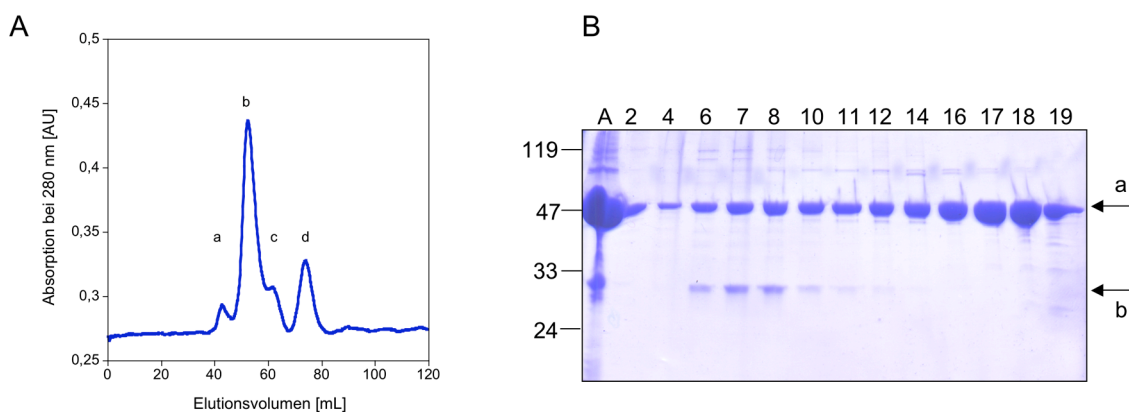


Abb. 3.2.10 Isolierung von OpuAA/AB aus den vereinigten IMAC-Fraktionen mittels GPC. **A:** Chromatogramm der GPC (Superdex 200, BV: 150 mL). a-d markieren Protein peaks. **B:** Analyse von OpuAA/AB durch 15%ige SDS-PAGE (CBB Färbung, Markerproteine in kDa, Pfeile markieren OpuAA (a) und OpuAB (b). Säulenauftrag (A) und Fraktionen (2-19) zu 2 mL, die während der GPC ab einem Elutionsvolumen von 40 mL gesammelt wurden.

Das Chromatogramm wies vier Peaks (a-d) auf, die in der SDS-PAGE isoliertem OpuAA oder dem OpuAA/AB Komplex zugeordnet werden konnten (Abb. 3.2.10). Das isolierte OpuAA eluierte am Ausschlussvolumen der Säule (Peak a, Fraktionen 2-4), in dimerer Form (Peak c, Fraktionen 10-12) und in monomerer Form (Peak d, Fraktionen 14-19). Der potentielle OpuAA/AB Komplex hingegen eluierte im Vergleich zu dimerem OpuAA bei niedrigeren Elutionsvolumina (Peak b, Fraktionen 6-8), die einer apparenten Masse von etwa 300 kDa entsprachen. Aus der Bandenintensität in der SDS-PAGE wurde abgeschätzt, dass OpuAA und OpuAB hier in nahezu stöchiometrischem Verhältnis vorlagen. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass in der Tat ein OpuAA/AB Komplex gebildet war, der durch GPC isoliert werden konnte. Andererseits könnte OpuAB auch zufällig mit der hochmolekularen Spezies von OpuAA ko-eluiieren. Eine Klärung dieses Sachverhaltes könnte durch eine zweite GPC oder eine Ionenaustauschchromatographie erfolgen. Fraktionen, die den potentiellen OpuAA/AB Komplex enthielten wurden auf ATPase Aktivität untersucht (Kapitel 3.4).

3.3 Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad von OpuAA

Nachdem Bedingungen etabliert waren, die es ermöglichten, rekombinantes OpuAA in genügender Reinheit und als einheitliches Produkt zu isolieren, wurde dessen Oligomerisierungsgrad untersucht. Erkenntnisse über den funktionalen Oligomerisierungsgrad von OpuAA und von Parametern, die eine potentielle Umwandlung und Stabilisierung der oligomeren Spezies beeinflussen, waren für das Verständnis des Nukleotid-Bindeproteins OpuAA von zentraler Bedeutung. Damit trugen sie einerseits zum Verständnis der Funktionalität bei, nicht zuletzt im Hinblick darauf, dass für andere NBDs eine funktionale Kopplung von Oligomerisierung und funktionalem Zustand im ATP-Hydrolysezyklus strukturell und biochemisch gezeigt werden konnte (Moody *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Verdon *et al.*, 2003,b). In diesem Zusammenhang gibt Tabelle 2 eine Übersicht über veröffentlichte Kristallstrukturen von NBDs mit Liganden und Oligomerisierungsgrad. Durch diese Experimente sollte desweiteren die Grundlagen für eine erfolgreiche Kristallisation des Proteins, und damit ein Verständnis seiner Struktur, gelegt werden.

Untersuchungen zum Oligomerisierungsverhalten des rekombinanten OpuAA erfolgten mittels GPC im präparativen oder analytischen Maßstab. Dafür wurde OpuAA durch Konzentration auf ein für die GPC geeignetes Volumen eingengt, wobei Konzentrationen von 10 mg/mL nicht überschritten wurden, und auf eine Gelpermeationssäule gegeben, die zuvor mit HS Puffer äquilibriert wurde.

3.3.1 Einfluss von Salz auf die Monomer-Dimer Umwandlung

Die aus der IMAC erhaltenen Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe einer GPC auf ihren Oligomerisierungsgrad und potentielle Aggregation untersucht. Das Chromatogramm wies dabei neben dem Proteinpeak am Ausschlussvolumen der Säule (d), der durch Proteinaggregate verursacht wurde, und einem hochmolekularen Peak c (> 250 kDa) zwei dominante Proteinpeaks a und b auf (Abb. 3.3.1 A). Ein Vergleich des Elutionsvolumens von Markerproteinen zeigte, dass diese Proteinpeaks, mit apparenten Massen von 150 kDa (b) und 65 kDa (a), mit dimerem (berechnete Masse: 94,6 kDa) und monomerem (berechnete Masse: 47,3 kDa) OpuAA korrespondierten (Abb. 3.3.1 B). Elutionsfraktionen, die das OpuAA Monomer und Dimer enthielten, wurden vereinigt und die NaCl Konzentration auf 150 mM eingestellt. Die Analyse des Oligomerisierungsgrads von OpuAA mit einer Konzentration von 2,5 μ M oder 10 μ M mittels GPC zeigte dabei ein unterschiedliches Monomer-Dimer Peakverhältnis (Abb. 3.3.1 B). Dabei nahm mit steigender Proteinkonzentration der Anteil von monomerem OpuAA (Peak a) ab, während der Anteil an dimerem OpuAA (Peak b) zunahm. Dies implizierte eine dynamische Monomer-Dimer Umwandlung.

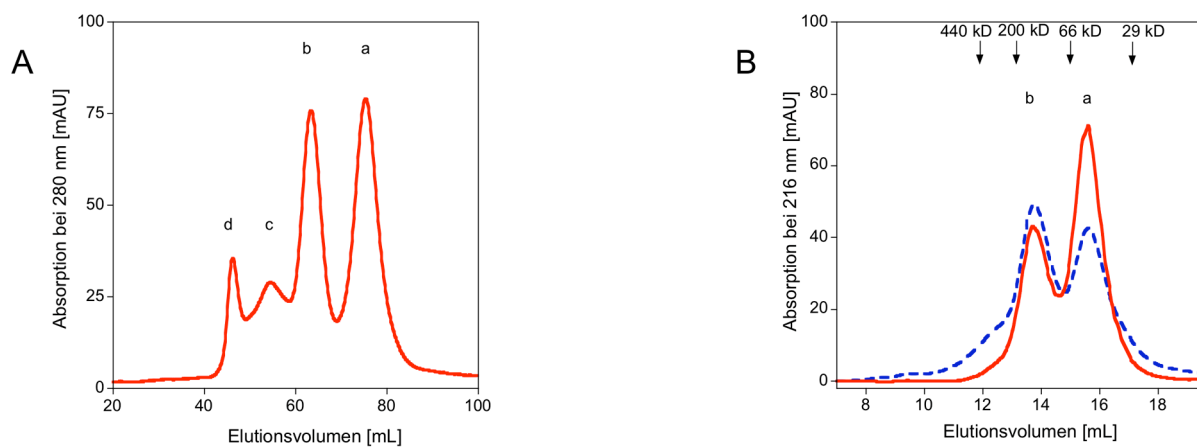


Abb. 3.3.1: Analyse von OpuAA mittels GPC. **A:** Elutionschromatogramm einer Isolierung von OpuAA aus den vereinigten IMAC-Fractionen mittels GPC (Superdex 200, BV: 150 mL). a-d markieren Proteinpeaks **B:** Proteinpeaks a und b (siehe A) wurden vereinigt und bei 2,5 μ M (durchgezogene Linie) oder 10 μ M (gestrichelte Linie) mittels GPC (Superdex 200, BV: 24 mL) analysiert. Pfeile markieren das Elutionsvolumen von Markerproteinen mit den angegebenen Massen.

Die Existenz eines NBD Dimers im Nukleotid-freien Zustand war für isolierte NBDs von ABC-Transportern untypisch. Für die isolierten NBDs MJ0796, MJ1267 (Moody *et al.*, 2002), Mdl1p (Janas *et al.*, 2003) und GlcV (Verdon *et al.*, 2003,b) wurde der Oligomerisierungsgrad im Nukleotid-freien Zustand mittels GPC analysiert, und in diesen Experimenten wurde ausnahmslos ein Monomer detektiert. Andererseits konnte für MalK aus *E. coli* biochemisch (Kennedy & Traxler, 1999) und strukturell (Chen *et al.*, 2003) die Bildung eines NBD Dimers

demonstriert werden. Hier wurde eine Wechselwirkung der Monomere durch eine zusätzliche C-terminale regulatorische Domäne (RD) vermittelt. Eine solche RD kann aufgrund von Sequenzvergleichen auch für OpuAA postuliert werden. Andererseits wurde eine solche Wechselwirkung in der Struktur von GlcV im Nukleotid-freien Zustand nicht ersichtlich, obwohl GlcV eine RD enthält (Verdon *et al.*, 2003,a). Lediglich für HisP, dass keine RD besitzt, wurde ein marginaler Anteil NBD Dimer in der GPC detektiert und ein schnelles Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer postuliert (Nikaido *et al.*, 1997).

Der zeitliche Verlauf des Monomer-Dimer Gleichgewichts wurde auch für OpuAA untersucht. Hierzu wurde eine konzentrierte OpuAA Probe mit einer Konzentration von 23 μM , die im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen einen hohen Dimer Anteil enthielt, in LS Puffer (150 mM NaCl) verdünnt und nach verschiedenen Inkubationszeiten das Monomer-Dimer Verhältnis der Probe mittels GPC untersucht. Der Anteil an Dimer wurde mit Hilfe der Gleichung 1 durch Absorptionsmessung am Peakmaximum von Monomer oder Dimer berechnet.

Dabei zeigte OpuAA eine dynamische Umwandlung beider oligomeren Spezies während des experimentellen Zeitrahmens. Zu frühen Zeitpunkten (0-12 Stunden) zerfiel das Dimer monoexponentiell in das Monomer und mit zunehmender Konzentration des Monomers wurde die Re-Assoziation zum Dimer dominanter (Abb. 3.3.2 A). Nach ungefähr 4 Tagen war der Gleichgewichtswert des Monomer-Dimer Verhältnisses erreicht. Dies wies auf eine bimolekulare Gleichgewichtsreaktion hin, und aufgrund dieses kinetischen Modells konnten die Daten nur mit Hilfe der Gleichung 3a erfolgreich angepasst werden. Dabei wurde eine apparente Dissoziationskonstante von $5 \pm 3 \mu\text{M}$ berechnet. Dieser Wert war in Übereinstimmung mit dem in Kapitel 3.3.2 berechneten Wert. Diese Analyse zeigte, dass der Dimer Zerfall von OpuAA im Vergleich zu HisP signifikant langsamer war. Im Fall von HisP lag zerfiel das Dimer im Bereich weniger Minuten (Nikaido *et al.*, 1997), während für OpuAA erst nach mehreren Tagen der Gleichgewichtswert erreicht war. Dies könnte die Konsequenz einer Interaktion der RD darstellen.

Für die separate Analyse beider oligomeren Spezies von OpuAA, mussten jedoch Bedingungen gefunden werden, die die dynamische Monomer-Dimer Umwandlung verlangsamten. In diesem Zusammenhang bestand die Hypothese, dass die Monomer-Dimer Umwandlung mit der Aktivität von OpuAA korreliert war. *In vivo* befindet sich OpuAA an der intrazellulären Seite der Zytoplasmamembran und wird unter hyperosmotischen Bedingungen aktiviert. Unter diesen Bedingungen erhöht sich andererseits durch Einstrom von K^+ (Whatmore & Reed, 1990) und/oder einer Abnahme des Zellvolumens (Woldringh, 1994) die zytosolische Ionenstärke bzw. Osmolarität. Auch für den rekonstituierten OpuA Transporter aus *L. lactis* konnte *in vitro* eine Steigerung des Glycin-Betain Imports durch Erhöhung der intravesikulären Ionenstärke gezeigt werden (van der Heide *et al.*, 2001). Es

erschien daher plausibel, dass die Ionenstärke auch *in vitro* einen Einfluss auf die Monomer-Dimer Umwandlung des isolierten OpuAA haben könnte.

In der Tat hatte die Ionenstärke einen signifikanten Einfluss auf die Monomer-Dimer Umwandlung von OpuAA. In HS Puffer (1 M NaCl) zerfiel das OpuAA Dimer um mehrere Größenordnungen langsamer als in LS Puffer (Abb. 3.3.2 A). Der Zerfall zeigte einen monoexponentiellen Verlauf, bei dem der Gleichgewichtswert selbst im experimentellen Zeitraum von einer Woche nicht erreicht wurde. Im Einklang mit diesen Beobachtungen ergab eine Anpassung der Daten mit Hilfe der Gleichung 3b eine Halbwertszeit für die Umwandlung von $\square = 16 \pm 0,5$ Tagen. In Analogie zum dimeren OpuAA wurde das Monomer bei 1 M NaCl mit einer ähnlichen Halbwertszeit für die Umwandlung stabilisiert. Diese Beobachtungen implizierten, dass die Assoziations- und Dissoziations-Rate des Monomer-Dimer Gleichgewichtes unter Bedingungen hoher Ionenstärke signifikant verlangsamt wurden. Als Konsequenz der Hochsalz-induzierten Stabilisierung der oligomeren Spezies des OpuAA konnten das Monomer und das Dimer durch mehrere sequenzielle GPC Schritte in HS Puffer getrennt isoliert werden. Dafür wurde jede oligomere Spezies des OpuAA nach einem GPC Schritt separat vereinigt, konzentriert und erneut einer GPC unterzogen. So wurde nach typischerweise drei sequenziellen GPC Schritten, die in identischer Weise durchgeführt wurden, das OpuAA Monomer oder Dimer mit einer Reinheit von mehr als 95 % (bezogen auf die oligomere Spezies) erhalten (Abb. 3.3.2 B) und war in HS Puffer für mehrere Tage stabil. Diese Methode erlaubte eine getrennte Analyse von monomerem oder dimerem OpuAA.

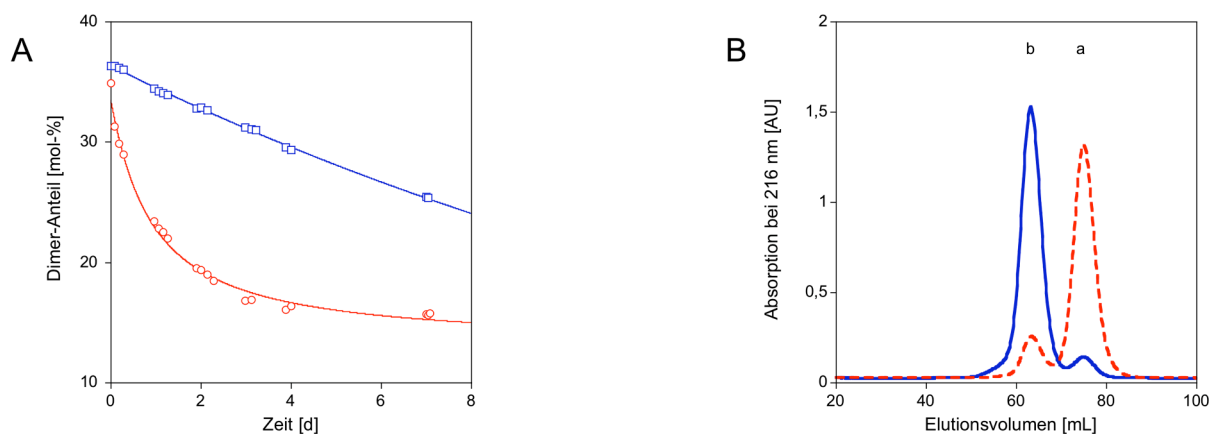


Abb. 3.3.2: Analyse der Monomer-Dimer Umwandlung von OpuAA **A:** Dimeres OpuAA wurde in LS Puffer (○) oder HS Puffer (□) verdünnt und der Anteil an Dimer nach verschiedenen Inkubationszeiten mittels GPC bestimmt. Die Analyse des Zerfalls des Dimers erfolgte mit Hilfe der Gleichungen 3a und 3b. **B:** Elutionschromatogramm einer Isolierung von Monomer (a) oder Dimer (b) des OpuAA aus ihrem Gemisch mittels GPC (Superdex 200, BV: 150 mL). Durch mehrere sequenzielle GPC Schritte in HS Puffer wurden die oligomeren Spezies des OpuAA quantitativ getrennt.

Außerdem stellte sich die Frage, ob Ionenstärke oder Osmolarität die Monomer-Dimer Umwandlung beeinflussten. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurde eine konzentrierte OpuAA Probe in Gegenwart verschiedener Salze verdünnt, für 2 Tage bei 4 °C inkubiert und anschließend dessen Monomer-Dimer Verhältnis analysiert. Im Einklang mit der essentiellen Rolle von K⁺ Ionen in der bakteriellen Abwehr von hyperosmotischem Stress, wurde dabei zwischen NaCl und KCl differenziert. Um den möglichen Einfluss des Substrates des OpuA-Transporters zu evaluieren, wurde Glycin-Betain ebenfalls getestet. Da Glycin-Betain unter physiologischen pH Bedingungen keine Nettoladung aufweist, trägt es zur Osmolarität, jedoch nicht zur Ionenstärke bei. Diese Reihe von Experimenten zeigte, dass mit steigender Salzkonzentration ein Anstieg des Zeitraums zur Äquilibrierung des Monomer-Dimer Verhältnisses assoziiert war. Interessanterweise wurde bei 0,4 M NaCl oder KCl ein Minimum beobachtet. Im Gegensatz zu NaCl oder KCl hatte das kompatible Solut in dem untersuchten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Rate des Dimer-Zerfalls. Diese Beobachtungen implizierten einen signifikanten Einfluss der Ionenstärke, jedoch nicht der Osmolarität, auf die Monomer-Dimer Umwandlung. Es lag daher die Vermutung nahe, dass bei Assoziation und Dissoziations-Prozessen von OpuAA elektrostatische Effekte eine potentielle Rolle spielen.

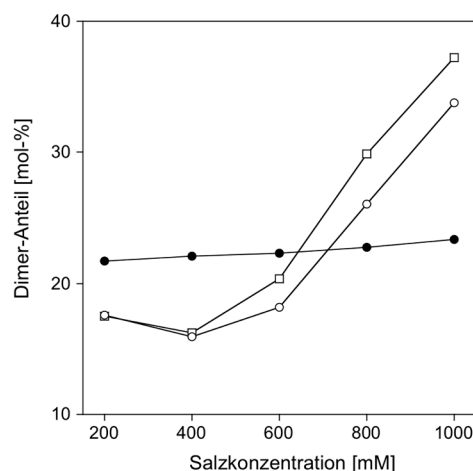


Abb. 3.3.3: Einfluss von Ionenstärke und Osmolarität auf die Monomer-Dimer Umwandlung von OpuAA. Dimeres OpuAA wurde in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an NaCl (□), KCl (○) oder GB (●) verdünnt, für 2 d inkubiert und der Anteil an Dimer anschließend mittels GPC analysiert.

3.3.2 Einfluss von Nukleotiden auf die Monomer-Dimer Umwandlung

Die Hydrolyse von ATP, die bei ABC-Transportern die Substrattranslokation über biologische Membran energetisiert, wird von den Nukleotid-Bindeproteinen katalysiert. Dabei durchlaufen sie im Hydrolysezyklus verschiedene Zustände: 1.) die Bindung von ATP, 2.) die Hydrolyse von ATP, 3.) der Freisetzung von ADP und anorganischem Phosphat um in einen

4.) Nukleotid-freien Zustand einzutreten. Mg^{2+} dient den Nukleotid-Bindeproteinen dabei als Ko-Faktor. Für einige NBDs konnte bereits ein funktionales Wechselspiel zwischen katalytischem Zustand und Oligomerisierungsgrad gezeigt werden (Moody *et al.*, 2002; Janas *et al.*, 2003). Im Hinblick auf den hohen Grad an Konservierung zwischen NBDs lag die Vermutung nahe, dass auch ihre Funktionsweise in der Umwandlung der chemischen Energie des ATP konserviert war. Diese Hypothese wurde im Fall des OpuAA durch Zugabe von Nukleotiden die eine Nachahmung der katalytischen Zustände ermöglichte und anschließende Bestimmung des Oligomerisierungsgrades getestet.

Dazu wurde 4 μM OpuAA bei 150 mM NaCl in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 mM Mg^{2+} mit 10 mM Nukleotiden versetzt und bis zum Erreichen des Gleichgewichtwertes (Kapitel 3.3.1) der Monomer-Dimer Umwandlung für 4 Tage bei 4 °C inkubiert. Im Nukleotid-freien Zustand wurden 17 ± 2 Mol-% dimeres OpuAA in Gegenwart oder Abwesenheit von $MgCl_2$ detektiert. Ein ähnlicher Wert (14 ± 2 Mol-%) ergab sich nach Zugabe von AMP-PNP, einem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga. Dies implizierte eine ähnliche Affinität von AMP-PNP zu monomeren und dimeren OpuAA. Die Inkubation von AMP-PNP in Gegenwart von $MgCl_2$ reduzierte jedoch den Dimer Anteil um etwa 40 %. In Gegenwart von ADP oder ADP/Mg^{2+} nahm der Anteil an dimeren OpuAA auf $3 \pm 0,5$ Mol-%, bzw. $1 \pm 0,2$ Mol-% ab. Damit war monomeres OpuAA unter posthydrolytischen Bedingungen die dominante oligomere Spezies. Ein nur marginaler Anteil des Dimers wurde detektiert ($1 \pm 0,2$ Mol-%), wenn ATP/Mg^{2+} zu OpuAA gegeben wurde. Da dieser Wert jenem in Gegenwart von ADP/Mg^{2+} , jedoch nicht in Gegenwart von $AMP-PNP/Mg^{2+}$ entsprach, implizierte dies eine komplette Hydrolyse des ATP zu ADP während der Inkubationszeit und repräsentierte demnach posthydrolytische Bedingungen.

Um das Monomer-Dimer (M-D) Gleichgewicht des OpuAA in seinen unterschiedlichen katalytischen Zuständen zu quantifizieren, wurden individuelle Dissoziationskonstanten bestimmt. Dafür wurden verschiedenen Konzentrationen an OpuAA unter Sättigungsbedingungen mit 10 mM $AMP-PNP/Mg^{2+}$, ADP/Mg^{2+} oder ATP und im Nukleotid-freien Zustand inkubiert und das M-D Verhältnis bestimmt. Dabei zeigte OpuAA einen von der Proteinkonzentration abhängigen Wechsel des M-D Verhältnisses. Eine Anpassung der Daten gemäß Gleichung 2 ergab einen K_D -Wert von 6 ± 1 μM des M-D Gleichgewichtes für den Nukleotid-freien Zustand. In Gegenwart von ATP oder $AMP-PNP/Mg^{2+}$ erhöhte sich der K_D -Wert des M/D Gleichgewichtes auf 27 ± 2 μM bzw. 49 ± 4 μM . In Gegenwart von ADP/Mg^{2+} wurde der K_D -Wert zu 472 ± 160 μM bestimmt. Dieser angepasste K_D -Wert war somit um mehr als eine Größenordnung höher, als der experimentelle Konzentrationsbereich von OpuAA und daher sehr fehlerbehaftet. Im Einklang mit dem Fehler von etwa 30 % war es sinnvoller einen minimalen Wert für den Bereich anzugeben, in dem der reale K_D -Wert liegt; dieser minimale Wert liegt bei etwa 300 μM .

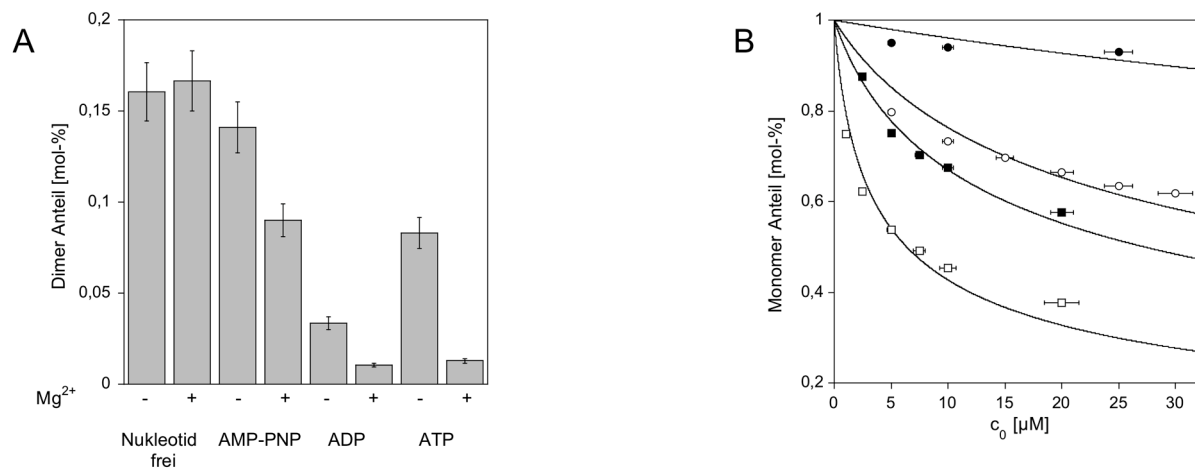


Abb. 3.3.4: Einfluss von Nucleotiden auf die Monomer-Dimer Umwandlung des OpuAA. **A:** 4 μM OpuAA wurde in LS Puffer mit 10 mM Nucleotid in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 mM MgCl_2 für 4 d bei 4°C inkubiert. Der Anteil an Dimer wurde mittels GPC analysiert. **B:** Verschiedene Konzentrationen von OpuAA (c_0) wurden ohne Nucleotid (\square), mit 10 mM AMP-PNP/ Mg^{2+} (\circ), 10 mM ATP (\blacksquare) oder 10 mM ADP/ Mg^{2+} (\bullet) für 4 d bei 4 °C inkubiert. Der Monomer-Anteil wurde mittels GPC analysiert, gegen c_0 aufgetragen und Dissoziationskonstanten gemäß Gleichung 2 berechnet.

3.4 Analyse der ATPase Aktivität des OpuAA

In der Literatur wurde für einige isolierte Nucleotid-Bindeproteine (NBD) von bakteriellen ABC-Transportern wie beispielsweise HisP (Nikaido *et al.*, 1997), MalK (Morbach *et al.*, 1993; Greller *et al.*, 1999), HlyB(NBD) (Benabdelhak *et al.*, 2004) oder MJ0796 (Moody *et al.*, 2002) eine basale ATPase Aktivität beschrieben. Trotz der Tatsache, dass die Substrat-stimulierte ATPase Aktivität eines assembliertem ABC-Transporters, d.h. in Gegenwart seiner kognativen Transmembrandomäne (TMD) und des Substrat-Bindeproteins (SBP), in einem rekonstituierten System höher ist als dessen basale ATPase Aktivität (Davidson & Nikaido, 1990), tragen diese Daten maßgeblich zum Verständnis der Funktion und Regulation der NBDs bei. Aus dieser Motivation heraus wurde im Rahmen dieser Arbeit einerseits die basale ATPase Aktivität des isolierten OpuAA in Abhängigkeit seines oligomeren Zustandes und der Salzkonzentration untersucht, und andererseits ein Einfluss seiner kognativen TMD, OpuAB, und des SBP, OpuAC, auf dessen ATPase Aktivität analysiert.

Für diese Experimente wurde ein Enzym-gekoppelter ATPase Test der Pyruvat Kinase (PK) und Laktat Dehydrogenase (LDH) verwendet (Senior *et al.*, 1998). Dabei wurde verbrauchtes ATP mit Hilfe der PK und LDH durch die Oxidation von NADH zu NAD^+ in einem stöchiometrischen Verhältnis regeneriert. Die zeitliche Abnahme der NADH Konzentration, die ein direktes Maß für verbrauchtes ATP darstellte, wurde spektroskopisch durch Messung

der Absorption bei 340 nm detektiert (Abb. 3.4.1 A). Eine Kalibrierung des Tests ergab einen molaren Extinktionskoeffizienten von 2590 M^{-1} , in dem die Schichtdicke einberechnet war, und die direkte Berechnung von Reaktionsgeschwindigkeiten aufgrund der gemessenen Absorptionsabnahme bei 340 nm erlaubte (Abb. 3.4.1 B). Im Gegensatz zu anderen Methoden zur Bestimmung von verbrauchtem ATP wie z.B. der Molybdat Methode (Lane & Watmough, 1984) zum Nachweis anorganischen Phosphates bot dieser Enzym-gekoppelte Test den Vorteil, dass er mit Phosphat-Puffern kompatibel war und eine Produkthemmung der ATPase Aktivität durch eine Akkumulation von ADP ausschloss. Dies war von Vorteil, da OpuAA im Vergleich zu ATP eine höhere Affinität zu ADP aufwies (Kapitel 3.5), und ADP damit ein Inhibitor der ATPase Aktivität war.

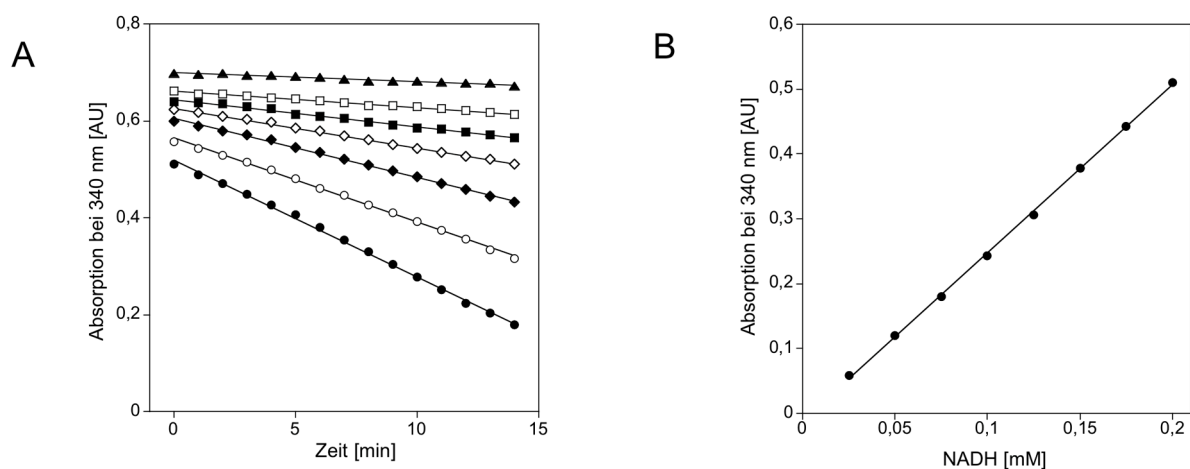


Abb. 3.4.1: PK/LDH gekoppelter Test zum Nachweis der ATPase Aktivität des OpuAA. **A:** Zeitlicher Verlauf der NADH Konzentration. OpuAA wurde mit unterschiedlichen ATP Konzentrationen versetzt. Gebildetes ADP wurde mit Hilfe der PK/LDH bei gleichzeitiger Oxidation von NADH zu NAD^+ regeneriert. Die Abnahme der NADH Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bei 340 nm in 1 min Zeit-Intervallen verfolgt. Die linearen Steigungen wurden mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten (siehe B) in eine Reaktionsgeschwindigkeit umgerechnet. **B:** Kalibrierung des Tests. Messung der Absorption bei 340 nm von unterschiedlichen NADH Konzentrationen im Test-System (96 well Platte, 200 μL Volumen). Die Steigung ergab einen Test-spezifischen Extinktionskoeffizienten von 2590 M^{-1} .

3.4.1 Basale ATPase Aktivität von OpuAA

Zunächst wurde die basale ATPase Aktivität des OpuAA Monomers und Dimers untersucht. Dazu wurden beide oligomeren Spezies, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, isoliert. Die ATPase Aktivität in Gegenwart verschiedener ATP Konzentrationen und 1 M NaCl oder 1 M KCl wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert und mit Hilfe einer Michaelis-Menten Kinetik analysiert (Abb. 3.4.2 A). Das OpuAA Monomer zeigte eine basale ATPase Aktivität mit einem K_M -Wert von $0,45 \pm 0,06 \text{ mM}$ und einer Wechselzahl (k_2) von $2,3 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ bei 1 M NaCl (Tabelle 5). Diese Werte waren mit jenen anderer isolierter NBDs vergleichbar

(Nikaido *et al.*, 1997; Greller *et al.*, 1999). In Gegenwart von 1 M KCl nahm sowohl der K_M -Wert, als auch die Wechselzahl des OpuAA Monomers zu ($K_M = 5,4 \pm 0,6$ mM, $k_2 = 15,5 \pm 1,1$ min⁻¹). Die katalytische Effizienz des monomeren OpuAA bei 1 M NaCl oder KCl veränderte sich jedoch nicht signifikant (Tabelle 5). In Hinblick auf die wichtige Rolle von K^+ Ionen in der ersten Adaptionreaktion von Bakterien bei hyperosmolarem Stress (Whatmore & Reed, 1990), könnten diese beobachteten Veränderungen einen Mechanismus repräsentieren, der die ATPase Aktivität des OpuAA durch ein Wechselspiel zwischen K_M -Wert und k_2 moduliert. Bei 1 M KCl ist der K_M -Wert des Monomers im Bereich der zytosolischen ATP Konzentration. Dies bedeutet, dass etwa 50 % des OpuAA im ATP gebundenen Zustand ist und eine Erhöhung der ATP Konzentration eine direkte Steigerung der ATPase Aktivität bewirkt.

Als eine Kontrolle wurde eine OpuAA Mutante analysiert, dessen Glutamat 195 gegen Glutamin substituiert war (Tabelle 4). Glutamat 195 befindet sich direkt C-terminal vom Walker B Motiv von OpuAA und ist phylogenetisch für viele NBDs konserviert (Moody *et al.*, 2002). Dieses Glutamat ist an der Koordinierung eines potentiell hydrolytischen Wasser Moleküls beteiligt und wurde aufgrund dessen als katalytische Base bezeichnet (Smith *et al.*, 2002). Hunt und Mitarbeiter entwickelten erstmals die Strategie einer EQ Substitution in der NBD MJ0796 und zeigten, dass eine solche Substitution eine Inaktivierung der ATPase Aktivität zur Folge hatte (Moody *et al.*, 2002). Nachfolgend konnte auch für andere NBDs mit dieser Substitution eine Inaktivierung oder signifikante Reduzierung der ATPase Aktivität demonstriert werden (Janas *et al.*, 2003; Verdon *et al.*, 2003,b). Im Fall der OpuAA Mutante E195Q wurde im Vergleich zum nativen OpuAA eine 20 fach niedrigere Wechselzahl bestimmt ($k_2 = 0,16 \pm 0,01$ min⁻¹) (Tabelle 5). Interessanterweise erniedrigte sich gleichzeitig der K_M -Wert auf 30 ± 5 µM, wodurch die katalytische Effizienz konstant blieb. Diese Daten zeigten eine Beteiligung von Glutamat 195 an der Hydrolyse von ATP.

Oligomere Spezies	Salz	K_M [mM]	Wechselzahl [min ⁻¹]	katalytische Effizienz [M ⁻¹ min ⁻¹]
Monomer	1 M KCl	$5,4 \pm 0,6$	$15,5 \pm 1,1$	2.900
Monomer	1 M NaCl	$0,45 \pm 0,06$	$2,3 \pm 0,1$	5.100
Monomer E195Q	1 M NaCl	$0,03 \pm 0,005$	$0,16 \pm 0,01$	5.300
Dimer	1 M NaCl	$1,3 \pm 0,5$	$0,24 \pm 0,04$	190
Monomer/Dimer	0,15 M NaCl	$0,25 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,01$	1.000

Tabelle 5: Michaelis-Menten Parameter von OpuAA unter verschiedenen Salzbedingungen bei 22 °C.

Im Vergleich zum Monomer zeigte dimeres OpuAA eine 10 fach reduzierte basale ATPase Aktivität in 1 M NaCl ($k_2 = 0,24 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$) (Tabelle 5). Dieses Ergebnis war überraschend, da das NBD Dimer in anderen Studien als die ATPase aktive oligomere Spezies beschrieben wurde (Nikaido *et al.*, 1997; Moody *et al.*, 2002; Janas *et al.*, 2003). Verschieden Hypothesen, die dieses Ergebnis erklärten, kamen in Betracht: Einerseits könnte für die ATPase Aktivität des OpuAA eine dynamische Monomer-Dimer Umwandlung essentiell sein, die unter Hochsalzbedingungen nicht gegeben war (Kapitel 3.3). Andererseits könnte das Dimer zur ATP Hydrolyse ein Signal seiner kognativen TMD, OpuAB, benötigen, das im isolierten Zustand fehlte. Alternativ könnte unter Hochsalzbedingungen die Bindung und/oder Entlassung von Nukleotiden verhindert werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Bindung von Nukleotiden an das Dimer analysiert (Kapitel 3.5).

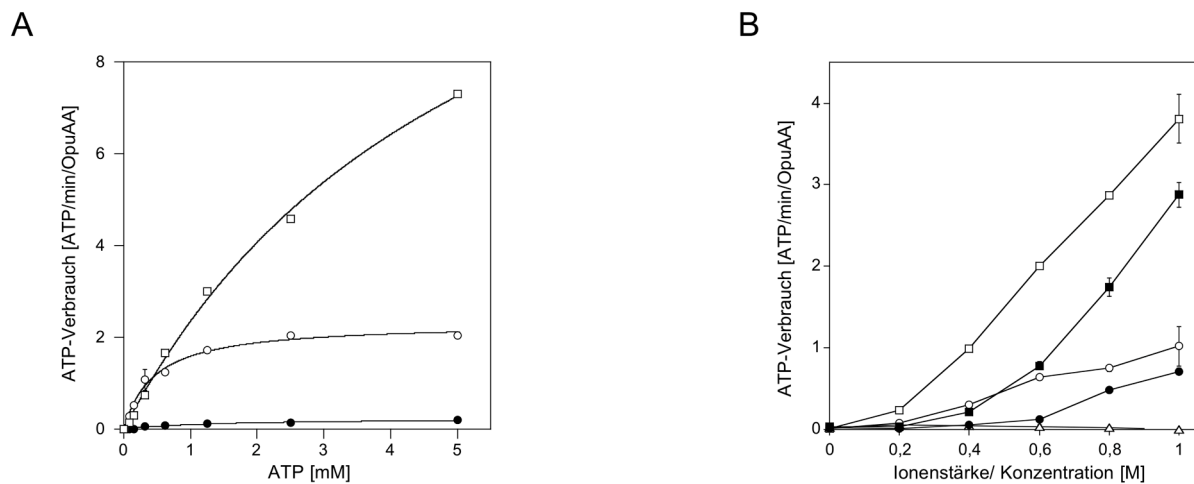


Abb. 3.4.2: ATPase Aktivität von OpuAA. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden gemäß Gleichung 5 berechnet. **A:** Der ATP Verbrauch von monomerem oder dimerem OpuAA bei verschiedenen ATP Konzentrationen wurde gemäß Gleichung 6 analysiert (Monomer, 1 M NaCl (○); Dimer, 1 M NaCl (●); Monomer, 1 M KCl (□)). **B:** Einfluss von Salzen auf die ATPase Aktivität von OpuAA M/D bei 5 mM ATP/Mg²⁺. KCl (□), KP_i (■), NaCl (○), NaP_i (●) oder Glycin-Betain (△) wurde in der angegebenen Ionenstärke (Konzentration für Glycin-Betain) analysiert.

Eine Abnahme der NaCl Konzentration bewirkte eine Erniedrigung der basalen ATPase Aktivität von OpuAA (Tabelle 5). In einem nachfolgenden Satz an Experimenten wurde dieser Einfluss für verschiedene Salze und bei unterschiedlicher Ionenstärke genauer analysiert. Als eine generelle Beobachtung, wurde die basale ATPase Aktivität, in Gegenwart von 5 mM ATP/Mg²⁺, mit steigender Salzkonzentration in einer linearen Weise stimuliert (Abb. 3.4.2 B). Das kompatible Solut Glycin-Betain, das keine Nettoladung aufweist, zeigte jedoch keinen detektierbaren Effekt. Interessanterweise hatte die Kationenart (Na⁺ oder K⁺) einen stärkeren Einfluss auf die Stimulation der basalen ATPase Aktivität, als die Anionenart (Cl⁻ oder P_i⁻). Diese Daten zeigten, dass OpuAA spezifisch durch Ionenstärke und nicht generell durch eine veränderte Aktivität von Wasser aktiviert wurde.

Die hohe Homologie des osmoreaktiven Transporters OpuA aus *L. lactis* (van der Heide & Poolman, 2000) zu OpuA aus *B. subtilis* implizierte einen hohen Grad an konservierter Funktionalität. Für das rekonstituierte OpuA aus *L. lactis* stimulierte die intravesikuläre Ionenstärke, insbesondere jedoch P_i^- Salze und saure Phospholipide, dessen ATPase Aktivität (van der Heide *et al.*, 2001). Poolman und Mitarbeiter entwickelten aufgrund dieser Daten ein Modell, in dem die Ionenstärke die Lipid-Protein Interaktion beeinflusste und zu einer Aktivierung des Transporters führte. Bei der isolierten NBD des OpuA-Transporters aus *B. subtilis*, OpuAA, wurde im Gegensatz dazu eine Stimulation der basalen ATPase Aktivität insbesondere durch K^+ Salz und in Abwesenheit einer Membran beobachtet. Dabei erhöhte K^+ signifikant die Wechselzahl und den K_M -Wert. Dies führte zu der Hypothese einer potentiellen K^+ Bindestelle im OpuAA, die unter hyperosmolaren Stress aktiviert werden könnte. Ein solcher K^+ Sensor wurde beispielsweise im osmoreaktiven Transporter BetP (Rubenhagen *et al.*, 2001) oder der Signal Kinase KdpD (Jung *et al.*, 2000) aus *E. coli* identifiziert.

3.4.2 Stimulierte ATPase Aktivität von OpuAA

In vivo ist OpuAA potentiell an seine kognitive TMD, OpuAB, gebunden. Für eine regulierte Substrattranslokation über die Zytoplasmamembran ist eine Kommunikation zwischen OpuAA und OpuAB erforderlich. Damit wird sichergestellt, dass ATP ausschließlich für den Transportprozess hydrolysiert wird. Dies eröffnet die Hypothese, dass die Interaktion von OpuAA und OpuAB einen Einfluss auf Konformationsänderungen von OpuAA während ATP-Hydrolyse hat und diese dadurch eventuell stimuliert wird. Im Einklang mit diesen Überlegungen wurde der Einfluss von OpuAB, OpuAC oder Glycin-Betain auf die ATPase Aktivität von OpuAA analysiert. Für diese Untersuchungen lag OpuAB in Detergenz-solubiliertem Zustand vor. Über die ATPase Aktivität von ABC-Transportern in Detergenz-solubiliertem Zustand gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Liu *et al.* (Liu & Ames, 1997,b) und Davidson *et al.* (Davidson *et al.*, 1996) konnten für die Histidin-Permease bzw. den Maltose-Transporter in diesem Zustand keine Aktivität messen, während es Shuman und Mitarbeitern (Reich-Slotky *et al.*, 2000) gelang für den Maltose-Transporter eine solche ATPase Aktivität nachzuweisen. Erste Experimente zeigten, dass OpuAA durch DDM inhibiert wurde. Die Isolierung von OpuAB wurde daher mit Hilfe des Detergenz Triton X-100 (0,1 % (v/v)) durchgeführt, das mit OpuAA kompatibel war. Auch für die HlyB NBD wurde ein ähnlicher Einfluss des Detergenz beobachtet: Während die Detergenzien CHAPS und OG die ATPase Aktivität inhibierten, verhielt sich das Detergenz Triton X-100 neutral (Koronakis *et al.*, 1993).

Für die folgenden Experimente wurden die isolierten Komponenten in geeigneten Kombinationen bei 5 mM ATP/Mg²⁺ auf ihre ATPase Aktivität analysiert (His₆-OpuAA: 0,5 µM, OpuAC: 4 µM, His₆-OpuAB: 1 µM und GB: 1 mM). Die Anwesenheit aller drei Komponenten des OpuA-Transporters bewirkte eine, im Vergleich zur Summe des ATP Verbrauchs der isolierten Komponenten, 2 fache Stimulation der ATPase Aktivität von OpuAA (Abb. 3.4.4 A). Dies impliziert nicht nur eine Funktionalität des rekombinant produzierten OpuAB, sondern eine Wechselwirkung sämtlicher Komponenten. Die Anwesenheit von Glycin-Betain, d.h. eine Komplexierung von OpuAC mit Glycin-Betain, hatte dabei keinen Einfluss. Überraschenderweise zeigte die Probe mit isoliertem OpuAB einen detektierbaren ATP Verbrauch, der dem des isolierten OpuAA entsprach. Es lag die Vermutung nahe, dass bei dieser Isolierung von OpuAB eine unbekannte ATPase mitgeführt wurde, da bei anderen Präparationen von OpuAB (Abb. 3.4.4. B) ein solcher Effekt weniger stark ausgeprägt war. Alternativ könnte OpuAB eine geringe intrinsische ATPase Aktivität wie z.B. durch ein *cluster* von basischen Aminosäuren besitzen. Die TMD des Ribose-Transporters zeigte einen ähnlichen Effekt (J. Zaitseva, persönliche Mitteilung). Durch geeignete Kombination der Komponenten sollte nun die Frage adressiert werden, aufgrund der Wechselwirkung welcher Komponenten eine Stimulation resultierte. Nur im Fall einer gemeinsamen Anwesenheit von OpuAA und OpuAB konnte eine Stimulation nachgewiesen werden (Abb. 3.4.4 A). In diesen Experimenten hatte OpuAC in Gegenwart oder Abwesenheit von Glycin-Betain keinen Einfluss. Eine solche Neutralität des SBPs wurde beispielsweise für das Maltose Transportsystem (MalFGK₂) aus *T. litoralis* im Detergenz-solubilisierten Zustand berichtet und der Einfluss des Detergenz als eine mögliche Ursache postuliert (Greller *et al.*, 2001). In diesen Experimenten zeigte das intakte MalFGK₂ eine ähnliche ATPase Aktivität wie das isolierte MalK.

In einem zweiten Satz an Experimenten wurden diese Kombinationen für die isolierten oligomeren Spezies des OpuAA analysiert oder der intakte OpuA Transporter (Kapitel 3.2.4) untersucht. Im Fall des OpuAA Monomers wurden ähnliche Ergebnisse, wie in Abb. 3.4.4 A gezeigt, erhalten. Die gemeinsame Anwesenheit des OpuAA Monomers und des OpuAB Dimers (Kapitel 3.2.2) bewirkte eine Stimulation der ATPase Aktivität (Abb. 3.4.4 B). Dies implizierte zunächst eine Interaktion von OpuAA und OpuAB. Einer weiterführenden Argumentationslinie zufolge, könnte diese Interaktion, die potentiell stöchiometrisch erfolgt, zu einer Dimerisierung von OpuAA führen und eine Aktivierung der NBD bewirken. Das isolierte dimere OpuAA zeigte im Gegensatz dazu in Anwesenheit oder Abwesenheit von OpuAB ähnliche ATPase Aktivität. Die gemeinsame Anwesenheit von OpuAB und OpuAC bewirkte jedoch eine 5-10 fache Erhöhung der ATPase Aktivität, die durch Zugabe von 1 mM Glycin-Betain um ca. 50 % abnahm. Dies deutet auf eine Aktivierung des dimeren OpuAA hin, wenn alle drei Komponenten des Transporters anwesend waren. Für die Histidin-

Permease (HisQMP₂) wurde ein negativer Einfluss des Ligand-beladenen SBPs auf die ATPase Aktivität berichtet, wenn HisP besondere Mutationen in der Signaldomäne aufwies die nur schwach mit der TMD assoziiert waren (Liu *et al.*, 1999,b). Im Einklang damit zeigte OpuAA ebenfalls eine schwache Wechselwirkung mit seiner putativen TMD, OpuAB. Dies wurde explizit bei der Ko-Reinigung von OpuAA und OpuAB beobachtet, wobei eine Erniedrigung der Glycerin Konzentration auf weniger als 20 % (v/v) eine Dissoziation von OpuAA bewirkte. Für den intakten OpuA-Transporter, der gemäß des in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Verfahren isoliert wurde, war die ATPase Aktivität geringer, als im Fall der isolierten Komponenten (Abb. 3.4.4 B). Hier bewirkte jedoch die Gegenwart von Glycin-Betain eine geringe Stimulation. Für HisQMP₂ (Liu *et al.*, 1999,b) oder MalFGK₂ (Davidson *et al.*, 1996) konnten dagegen im rekonstituierten System eine deutliche Steigerung der ATPase Aktivität in Gegenwart des Ligand-beladenen SBPs gezeigt werden. In diesen Experimenten hatte jedoch das SBP eine 10 fach höhere Konzentration.

Diese Ergebnisse demonstrierten eine differenzierte Aktivierung der ATPase Aktivität von OpuAA im Detergenz-solubilisierten System und implizieren einen Einfluss des Detergenz auf die Assoziation der NBD und der TMD.

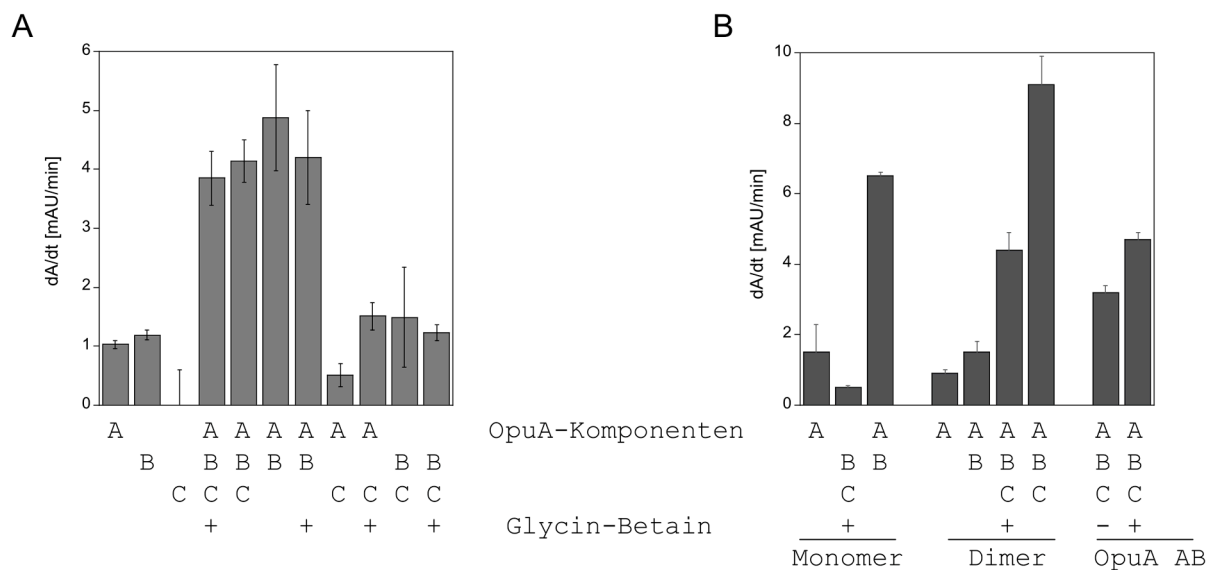


Abb. 3.4.4: ATPase Aktivität von OpuA in Detergenz-solubiliertem Zustand. **A** und **B:** Die Komponenten des OpuA-Transporters OpuAA (A), OpuAB (B) und OpuAC (C) wurden in isoliert oder in geeigneten Kombinationen in Gegenwart oder Abwesenheit von Glycin-Betain bei 5 mM ATP/Mg²⁺ auf ATPase Aktivität untersucht.

3.5 Affinität und Stöchiometrie von OpuAA/Nukleotid Komplexen

In Kapitel 3.3.2 wurde der Einfluss von Nukleotiden auf das Monomer-Dimer Gleichgewicht von OpuAA untersucht. Dabei zeigte sich eine Nukleotid-abhängige Änderung der K_D -Werte des Monomer-Dimer Gleichgewichtes. Dies implizierte ein funktionales Wechselspiel zwischen Oligomerisierungsgrad und katalytischem Zustand des OpuAA. Als Konsequenz sollten die oligomeren Spezies gegenüber Nukleotiden individuelle Affinitäten aufweisen. Um das Verständnis der Effekte von Nukleotiden auf die individuellen oligomeren Spezies des OpuAA zu erweitern, wurden Affinität und Stöchiometrie der Monomer/Nukleotid und Dimer/Nukleotid Komplexe des OpuAA untersucht. Darüber hinaus war es interessant zu erfahren, inwieweit konformelle Änderungen und/oder kinetische Prozesse dazu beitragen. Diese Fragestellungen wurden durch zwei unterschiedliche Strategien adressiert:

In der ersten Strategie wurde der Ligand unter Verwendung des fluoreszierenden ATP-Derivates TNP-ATP als Reporter einer Bindungswechselwirkung zwischen OpuAA und Nukleotid verwendet. Dabei wurde die Fluoreszenz der TNP-Gruppe, die bei Bindung des Nukleotids an OpuAA eine Steigerung der Intensität erfuhr, genutzt, um die Stöchiometrie und die Affinität von OpuAA/TNP-ATP Komplexen zu bestimmen. Anschließend wurde das TNP-ATP im Komplex mit OpuAA durch schrittweise Zugabe von nicht-markiertem Nukleotid kompetitiert. Durch Annahme eines dynamischen Gleichgewichtes zwischen OpuAA und TNP-ATP einerseits und OpuAA und unmarkiertem Nukleotid andererseits wurde eine Gleichung entwickelt, die eine Berechnung individueller K_D -Werte für OpuAA/ATP oder OpuAA/ADP Komplexe aus den Kompetitionsdaten ermöglichte.

In einer zweiten, alternativen Strategie wurde ein Reporter zur Detektion der Bindungswechselwirkung zwischen OpuAA und Nukleotid in das OpuAA eingeführt. Dabei wurde die phylogenetisch konservierte aromatische Aminosäure Phe 19 (siehe Kapitel 1.2.1), die basierend auf strukturellen Daten von anderen NBDs (Hung *et al.*, 1998; Schmitt *et al.*, 2003) wahrscheinlich durch π - π -Interaktion mit der Puringruppe von Adeninnukleotiden wechselwirkt, durch Tryptophan substituiert. Im Gegensatz zu OpuAA besitzt MalK an dieser Position ein intrinsisches Tryptophan, und die Kristallstruktur von MalK zeigt eine Beteiligung des Trp an der Interaktion mit ATP (Chen *et al.*, 2003). Eine solche Nukleotid-sensitive Tryptophan-Mutante der NBD MJ0796 wurde bereits von Smith *et al.* (Smith *et al.*, 2002) genutzt, um den K_D -Wert des NBD/ATP Komplexes zu bestimmen. Für OpuAA sollte daher die Bindungswechselwirkung mit Nukleotiden durch die Trp-Substitution nur marginal beeinflusst werden; die intrinsische Fluoreszenz des Tryptophan, die bei Bindung von Nukleotiden an OpuAA eine Erniedrigung seiner Intensität erfuhr, konnte jedoch zur direkten Bestimmung der Dissoziationskonstanten von OpuAA/Nukleotid Komplexen genutzt werden.

3.5.1 Untersuchungen mit TNP-Nukleotiden

3.5.1.1 Fluoreszenztitration des OpuAA mit TNP-ATP

Die NaCl Konzentration und die An- und Abwesenheit von $MgCl_2$ hatten, wie in Kapitel 3.3.1 und 3.4.1 gezeigt wurde, einen signifikanten Einfluss auf die Monomer-Dimer Umwandlung des OpuAA einerseits und auf die ATPase Aktivität andererseits. Im Einklang mit diesen Überlegungen wurde die Bindung von TNP-ATP an OpuAA bei niedrigen oder hohen NaCl Konzentrationen (0,15 bzw. 1 M NaCl) in Gegenwart oder Abwesenheit von $MgCl_2$ analysiert.

Bei Bindung von TNP-Nukleotiden an OpuAA wurde typischerweise eine 15 nm Blauverschiebung des Emissionsmaximums von 550 nm auf 535 nm und einen zusätzlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet. Der absolute Betrag des Anstiegs hing von der spezifischen Proteinumgebung in der Nukleotid-Bindetasche des OpuAA ab und wurde durch den Fluoreszenzerhöhungsfaktor (ρ) quantifiziert. Der ρ -Wert, der als das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei unendlich hoher Proteinkonzentration, mit allem TNP-Nukleotid gebunden, und in Abwesenheit von Protein, mit allem TNP-Nukleotid ungebunden, definiert ist, wurde in einem separaten Experiment für TNP-ATP oder TNP-ADP/ Mg^{2+} bestimmt. Dazu wurde bei einer konstanten TNP-ATP oder TNP-ADP/ Mg^{2+} Konzentration von 4 μM die Fluoreszenzintensität mit steigender OpuAA Konzentration gemessen (Abb. 3.5.1 A) und die Daten mit Gleichung 7 a angepasst. Ein ρ -Wert für TNP-ATP von $5,7 \pm 0,3$ in LS Puffer und von $3,0 \pm 0,2$ in HS Puffer mit 5 mM $MgCl_2$ wurde berechnet. Für TNP-ADP wurde ein ρ -Wert von 40 ± 2 in LS Puffer mit 5 mM $MgCl_2$ bestimmt.

Die Fluoreszenzintensität von TNP-ATP in Puffer in Abwesenheit von OpuAA war niedrig und nahm mit steigender TNP-ATP Konzentration zunächst linear zu. Bei TNP-ATP Konzentrationen von mehr als 6 μM traten in zunehmendem Maße innere Filtereffekte auf, die eine Erniedrigung der Fluoreszenzintensität bewirkten. Um diesen Effekten Rechnung zu tragen, wurden die spezifischen Fluoreszenzkonstanten Q_1 und Q_2 bestimmt. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität bei einer schrittweisen Zugabe von TNP-ATP unter den gegebenen Pufferbedingungen gemessen und mit Hilfe der Gleichung 8 angepasst (Abb. 3.5.1 B). Q_1 und Q_2 wurden in LS Puffer zu $7403 \pm 85 \mu M^{-1}$ und $-207 \pm 8 \mu M^{-2}$ bestimmt. In Gegenwart von HS Puffer mit 5 mM $MgCl_2$ wurden Q_1 und Q_2 zu $6429 \pm 51 \mu M^{-1}$ und $-148 \pm 4 \mu M^{-2}$ bestimmt. Die Gegenwart von Mg^{2+} hatte dabei keinen Einfluss auf Q_1 und Q_2 .

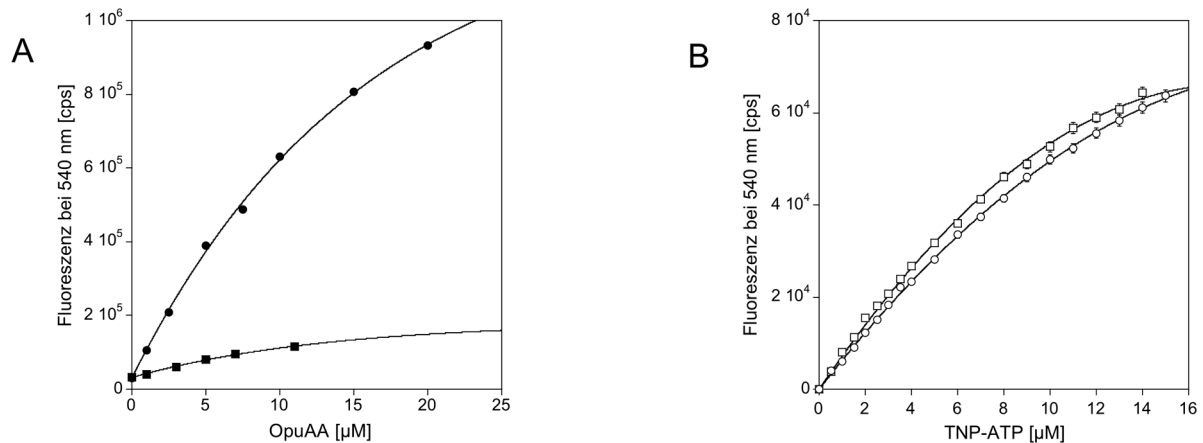


Abb. 3.5.1. A: Bestimmung des \square -Wertes für die Wechselwirkung von TNP-Nukleotiden mit OpuAA. Die Fluoreszenzintensität von 4 μM TNP-Nukleotiden (TNP-ATP in LS Puffer (■), TNP-ADP LS Puffer mit 5 mM MgCl_2 (●)) wurde in Abwesenheit oder steigenden Konzentrationen an OpuAA gemessen und gemäß Gleichung 7 a angepasst. Der individuelle \square -Wert wurde gemäß Gleichung 7 b berechnet. **B:** Bestimmung der Fluoreszenzkonstanten Q_1 und Q_2 für TNP-ATP in unterschiedlichen Testpuffern. LS Puffer (□) und HS Puffer mit 5 mM MgCl_2 (○).

Die unabhängige Bestimmung des \square -Wertes, sowie der Fluoreszenzkonstanten Q_1 und Q_2 bot den Vorteil einer Reduzierung der Anpassungsparameter in der eigentlichen Fluoreszenztitration. Damit verblieben als Anpassungsparameter lediglich die Dissoziationskonstante (K_D) der OpuAA/TNP-ATP Komplexe und die Zahl der Liganden (N).

Für die Fluoreszenztitration des OpuAA mit TNP-ATP wurden die oligomeren Spezies, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, präpariert und in B Puffer mit der entsprechenden NaCl Konzentration verdünnt. Im direkten Anschluss daran wurde OpuAA durch schrittweise Zugabe von TNP-ATP titriert und nach einer Äquilibrierungsphase von 30 s die Fluoreszenz in einem Emissionsspektrum von 510 nm bis 560 nm aufgezeichnet. Im Vergleich zur TNP-ATP Fluoreszenz in Abwesenheit von OpuAA stieg die Fluoreszenz in Gegenwart von OpuAA um den mehrfachen Wert an. Dies deutete auf die Bildung von OpuAA/TNP-ATP Komplexen hin. Die Fluoreszenzintensitäten bei 540 nm wurden mit Hilfe von Gleichung 9 direkt angepasst oder in einer alternativen Auftragung nach Scatchard gemäß Gleichung 10 ausgewertet (Abb. 3.5.2 A und B). Bei einer niedrigen NaCl Konzentration (150 mM) und in Abwesenheit von Mg^{2+} wiesen das OpuAA Monomer und Dimer ähnliche K_D -Werte (Monomer: $9,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$; Dimer: $5,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$) auf (Tabelle 6). Die Stöchiometrie der gebundenen Liganden war in Übereinstimmung mit dem Oligomerisierungsgrad des OpuAA (Monomer: $0,95 \pm 0,01$; Dimer: $1,91 \pm 0,01$) (Tabelle 6). Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl monomeres, als auch dimeres OpuAA unter den Pufferbedingungen TNP-ATP gebunden hatten und einen funktionalen Zustand repräsentierten.

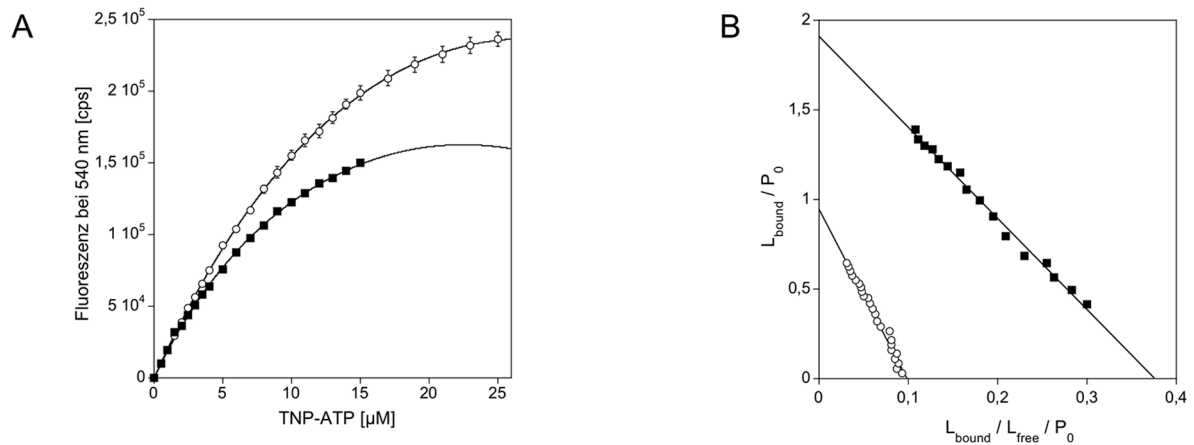


Abb. 3.5.2: Gleichgewichtsbindung von OpuAA mit TNP-ATP. **A:** TNP-ATP wurde schrittweise zu 6,2 μM Monomer (○) oder 1,5 μM Dimer (■) des OpuAA in LS Puffer gegeben und die Fluoreszenz bei 540 nm gemessen. Die Daten wurden mit Hilfe von Gleichung 9 analysiert. **B:** Die Daten aus A wurden mit Hilfe von Gleichung 10 in einer Auftragung nach Scatchard analysiert.

oligomere Spezies	NaCl [M]	MgCl ₂	K _D [μM]	Ligandenzahl
Monomer	0,15	-	9,5 ± 0,1	0,95 ± 0,01
Dimer	0,15	-	5,1 ± 0,1	1,91 ± 0,01
Monomer	0,15	+	7,8 ± 0,5	0,96 ± 0,03
Dimer	0,15	+	34 ± 0,5	2,1 ± 0,3
Monomer	1	+	6,8 ± 0,7	1,01 ± 0,05
Dimer	1	+	22 ± 4	2,1 ± 0,2

Tabelle 6: K_D-Werte und Stöchiometrien von monomeren oder dimeren OpuAA/TNP-ATP Komplexen in Puffer B mit der entsprechenden NaCl und MgCl₂ Konzentration bei 20 ± 1°C.

Die Zugabe von 5 mM Mg²⁺ änderte den K_D-Wert und die Ligandenzahl von monomeren OpuAA/TNP-ATP Komplexen nicht signifikant (K_D: 7,8 ± 0,5 μM; N: 0,96 ± 0,03) (Tabelle 6). Für dimeres OpuAA nahm jedoch bei einer Ligandenzahl von 2,1 ± 0,3 der K_D-Wert auf 34 ± 5 μM zu und deutete auf eine Destabilisierung des dimeren OpuAA/TNP-ATP Komplexes hin. Die Wechselwirkung von monomeren und dimeren OpuAA mit TNP-ATP in HS Puffer mit 5 mM Mg²⁺ zeigte ein ähnliches Verhalten (Tabelle 6).

3.5.1.2 Konkurrenzexperimente von OpuAA/TNP-ATP Komplexen

Konkurrenzexperimente von OpuAA/TNP-ATP Komplexen mit unmarkierten Nukleotiden (ATP oder ADP) wurden durchgeführt, um die Spezifität der Bindungswechselwirkung zu demonstrieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Grundlage eines Modells von zwei

unabhängigen Gleichgewichten zwischen OpuAA und TNP-ATP einerseits und OpuAA und unmarkierten Nukleotiden andererseits eine Gleichung formuliert, die eine Berechnung der Dissoziationskonstanten von OpuAA/ATP oder OpuAA/ADP Komplexen ermöglichte (Kapitel 2.7.1, Gleichung 11 und Appendix).

Für diese Experimente wurden nicht-markierte Nukleotide schrittweise zu vorgeformten OpuAA/TNP-ATP Komplexen zugegeben und die jeweilige Fluoreszenz bei 540 nm nach einer Äquilibrierungsphase von 30 s aufgezeichnet. Für die erste Reihe von Experimenten wurde LS Puffer als Testpuffer verwendet. Die Fluoreszenz bei 540 nm von vorgeformten monomeren oder dimeren OpuAA/TNP-ATP Komplexen nahm mit steigenden ATP Konzentrationen ab (Abb. 3.5.3 A). Dies deutete auf eine Verdrängung des TNP-ATP durch ATP in der Nukleotid-Bindetasche des OpuAA hin. Identische Experimente wurden in Abwesenheit von OpuAA durchgeführt und zur Hintergrund-Subtraktion (Gleichung VIII, Appendix) genutzt. Die Fluoreszenzdaten wurden anschließend auf die Fluoreszenz in Abwesenheit von ATP normalisiert und gemäß Gleichung 11, mit Hilfe des K_D -Wertes von OpuAA/TNP-ATP Komplexen und der eingesetzten Konzentration von OpuAA bzw. TNP-ATP, die Dissoziationskonstante von OpuAA/ATP Komplexen berechnet. Die K_D -Werte von monomeren OpuAA/ATP Komplexen wurde zu $2,8 \pm 0,3$ mM und von dimeren OpuAA/ATP Komplexen zu $3,5 \pm 0,5$ mM bestimmt (Tabelle 7). Diese Werte zeigten, dass die Bindung von TNP-ATP zu OpuAA spezifisch war. Die Affinität von OpuAA zu ATP war jedoch im Vergleich zu TNP-ATP um den Faktor 10^3 niedriger und implizierte einen signifikanten Einfluss der TNP-Gruppe auf die Affinität der Nukleotide zu OpuAA. Ähnliche Beobachtungen wurden für eine Bindungswechselwirkung von TNP-Nukleotiden mit der Na^+/K^+ -ATPase (Thoenges *et al.*, 1999) oder der Histidin Kinase CheA aus *E. coli* (Stewart *et al.*, 1998) berichtet und unterstreichen die Bedeutung der durchgeführten Kompetitions-experimente. Die K_D -Werte von OpuAA/ATP oder OpuAA/ADP Komplexen in Gegenwart von Mg^{2+} sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Anwesenheit von Mg^{2+} erhöhte die Affinität von ATP zu OpuAA. Während für den Monomer der K_D -Wert um das 6 fache abnahm, wurde der K_D -Wert von dimerem OpuAA/ATP Komplexen lediglich um den Faktor 2 erniedrigt. Dies deutet auf einen unterschiedlichen molekularen Aufbau der Nukleotid-Bindetasche im Monomer oder Dimer des OpuAA hin.

Die zweite Reihe von Experimenten wurde unter Hochsalzbedingungen (1 M NaCl) und in Gegenwart von 5 mM MgCl_2 durchgeführt. Dabei wurde für monomeres OpuAA ein K_D -Wert von 54 ± 4 μM für OpuAA/ATP Komplexe und von 20 ± 2 μM für OpuAA/ADP Komplexe berechnet (Abb. 3.5.3 B und Tabelle 7). Die Erhöhung der NaCl Konzentration von 150 mM auf 1 M ging mit einer signifikanten Erhöhung der Affinitäten, im Fall von monomerem OpuAA/ATP um den Faktor 10, im Fall von monomerem OpuAA/ADP um den Faktor 5, einher. Damit beeinflusste die Ionenstärke sowohl das Monomer-Dimer Gleichgewicht und

die ATPase Aktivität von OpuAA, als auch dessen Affinität zu Nukleotiden. Für dimeres OpuAA konnte die Fluoreszenz von OpuAA/TNP-ATP durch Zugabe von ATP nicht signifikant erniedrigt werden (Abb. 3.5.3 B). Dies deutet entweder auf eine niedrige Affinität von ATP zu dimerem OpuAA oder auf eine Nicht-Austauschbarkeit in diesem funktionalen Zustand hin. Diese beiden Möglichkeiten wurden in Bindungsexperimenten mit der Nukleotid-sensitiven OpuAA Mutante F19W untersucht.

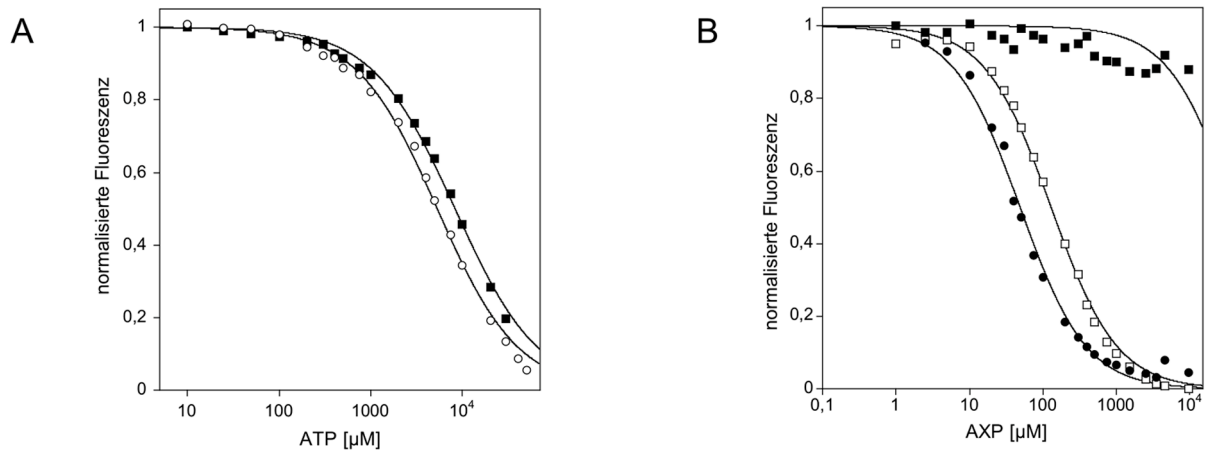


Abb.3.5.3: *Kompetitionsexperimente von OpuAA/TNP-ATP Komplexen. A: Monomer (○) oder Dimer (■) des OpuAA wurde mit 10 μM TNP-ATP in Puffer B mit 150 mM NaCl inkubiert und anschließend schrittweise ATP zugegeben. Die normalisierte Fluoreszenz bei 540 nm wurde gemäß Gleichung 11 analysiert. B: Monomer oder Dimer des OpuAA wurde mit 10 μM TNP-ATP in HS Puffer mit 5 mM MgCl₂ inkubiert und anschließend schrittweise AXP zugegeben. Monomer, X=T (□); Monomer, X=D (●); Dimer, X=T (■). Die Analyse der Daten erfolgte wie in A beschrieben.*

Oligomere Spezies	NaCl [M]	MgCl ₂ 5 mM	Ligand	K _D [mM]
Monomer	0,15	-	ATP	2,8 ± 0,3
Dimer	0,15	-	ATP	3,5 ± 0,5
Monomer	0,15	+	ATP	0,45 ± 0,05
Dimer	0,15	+	ATP	1,8 ± 0,3
Monomer	0,15	+	ADP	0,09 ± 0,01
Monomer	1	+	ATP	0,054 ± 0,004
Dimer	1	+	ATP	> 10
Monomer	1	+	ADP	0,02 ± 0,002

Tabelle 7: *K_D-Werte von OpuAA/AXP Komplexen in Puffer B mit der entsprechenden NaCl und MgCl₂ Konzentration bei 20 ± 2°C bestimmt durch Kompetitionsexperimente.*

3.5.1.3 Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz von OpuAA/TNP-ADP Komplexen

In Fluoreszenztitrationen von dimerem OpuAA mit TNP-ADP/Mg²⁺ blieb das Fluoreszenzsignal im Gegensatz zu Titrationen mit TNP-ATP/Mg²⁺ zeitlich nicht konstant, sondern nahm mit der Zeit zu. Um diese Phänomene genauer zu untersuchen, wurde monomeres oder dimeres OpuAA in LS Puffer mit 10 µM TNP-ADP und in Abwesenheit oder Gegenwart von 5 mM MgCl₂ verdünnt und die Fluoreszenz bei 540 nm zeitaufgelöst verfolgt. Unter diesen Pufferbedingungen war die Monomer-Dimer Umwandlung des OpuAA möglich.

In Abwesenheit von MgCl₂ verursachte die Zugabe von monomerem oder dimerem OpuAA zum Testpuffer einen sofortigen Anstieg der Fluoreszenz um ca. $4 \cdot 10^4$ cps, die dann über die gesamte Messdauer konstant blieb (Abb. 3.5.4, c und d). Dies deutete auf eine stabile Bindungswechselwirkung hin. Ein ungefähr 10-fach höherer und sofortiger Anstieg der Fluoreszenz wurde bei Zugabe von monomerem OpuAA zum Testpuffer in der Gegenwart von 5 mM MgCl₂ beobachtet. Dabei blieb das Fluoreszenzsignal während der gesamten Messdauer konstant (Abb. 3.5.4 a). Die Zugabe von dimerem OpuAA zu Testpuffer in der Gegenwart von 5 mM MgCl₂ resultierte im nahezu gleichen Fluoreszenzwert am Ende der Messung (Abb. 3.5.4 b). Die Fluoreszenz nahm jedoch graduell und mit einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung zu und erlaubte die Anpassung der Fluoreszenz gemäß Gleichung 12. Dabei wurde eine Halbwertszeit von 50 ± 1 min berechnet.

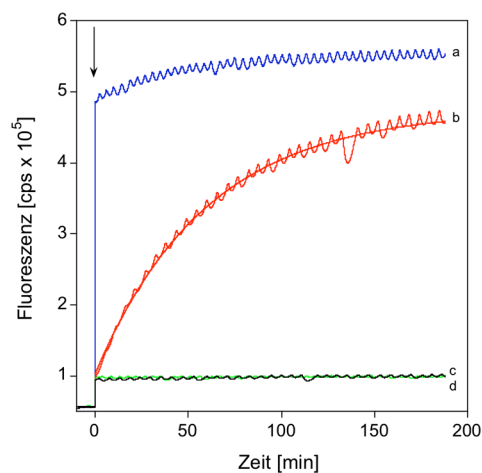


Abb. 3.5.4: Zeitlicher Verlauf der TNP-ADP Fluoreszenz. Zum angegebene Zeitpunkt (siehe Pfeil) wurde 3 µM monomeres (a und c) oder 1,5 µM dimeres (b und d) OpuAA zu LS Puffer mit 10 µM TNP-ADP gegeben. Proben a und b wurden zusätzlich mit 5 mM MgCl₂ versetzt. Die Fluoreszenz bei 540 nm wurde in Intervallen von 1 min über einen Zeitraum von 200 min aufgezeichnet und gemäß Gleichung 12 analysiert.

Die signifikante Erhöhung der Fluoreszenz von OpuAA/TNP-ADP/Mg²⁺ Komplexen im Vergleich zu OpuAA/TNP-ADP Komplexen konnte nur auf eine Erhöhung des β -Wertes zurückgeführt werden, da alle anderen Fluoreszenzparameter konstant gehalten wurden. In

einer unabhängigen Messung wurde der κ -Wert auf 40 ± 2 für OpuAA/TNP-ADP/Mg²⁺ Komplexe bestimmt (Abb. 3.5.1) und war damit im Vergleich zum κ -Wert von OpuAA/TNP-ATP Komplexen um das 7 fache erhöht. Andererseits reflektiert der κ -Wert den Einfluss der molekularen Architektur der Nukleotid-Bindetasche des OpuAA auf die Fluoreszenz des TNP-Nukleotids. Im Fall von dimerem OpuAA war die Fluoreszenzerhöhung graduell. Unter der Annahme, dass die Bindung des TNP-Nukleotids schnell erfolgte, impliziert dies eine nachfolgende langsame Isomerisierungsreaktion oder einen konformellen Wechsel von dimerem OpuAA/TNP-ADP/Mg²⁺.

3.5.2 Nukleotidbindung der OpuAA-Mutante F19W

In einer zweiten, alternativen Strategie wurde die Bindung von Nukleotiden an OpuAA mit Hilfe der Mutante F19W analysiert. In den Kristallstrukturen unterschiedlicher NBDs in Komplex mit ATP oder ADP war ein phylogenetisch konserviertes Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan der Bindungswechselwirkung mit dem Adeninring des Nukleotids beteiligt (Hung *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001; Gaudet & Wiley, 2001; Smith *et al.*, 2002; Schmitt *et al.*, 2003). Durch Sequenzvergleich von OpuAA mit diesen NBDs wurde Phe19 im OpuAA als potentieller Interaktionspartner mit dem Adeninring identifiziert. Eine Substitution des Phe19 durch Tryptophan sollte damit durch Messung der intrinsischen Trp-Fluoreszenz eine direkte Analyse der Interaktion von OpuAA mit Adennukleotiden erlauben, da OpuAA frei von Tryptophanen war.

Hierfür wurde das Expressionsplasmid pBAD33/OpuAA F19W konstruiert (Tabelle 4) und die OpuAA F19W Mutante in der für das native OpuAA beschriebenen Weise bakteriell produziert und isoliert. Die Ausbeute und Reinheit waren mit denen des nativen OpuAA vergleichbar. In GPC Experimenten wurde auch für die F19W Mutante des OpuAA ein Monomer und Dimer detektiert. Zur Überprüfung der Funktionalität wurde die ATPase Aktivität analysiert. Hierzu wurden die Michaelis-Menten Parameter des monomeren OpuAA F19W in Gegenwart von 1 M NaCl bestimmt (Abb. 3.5.5 A). Die Wechselzahl wurde zu $1,5 \pm 0,1$ ATP/min/OpuAA bestimmt und war nur marginal niedriger als die des nativen OpuAA ($2,3 \pm 0,1$; Tabelle 5). Der K_M -Wert wurde zu $1,7 \pm 0,1$ mM bestimmt und war im Vergleich zu nativen OpuAA um einen Faktor 4 erhöht. Da die Wechselzahl der F19W Mutante derjenigen des nativen OpuAA entspricht, impliziert dieses Ergebnis eine Erniedrigung der Affinität der F19W Mutante zu ATP. Andererseits zeigten diese Ergebnisse, dass die F19W Substitution keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilität, Aktivität oder das Oligomerisierungsverhalten von OpuAA hatte.

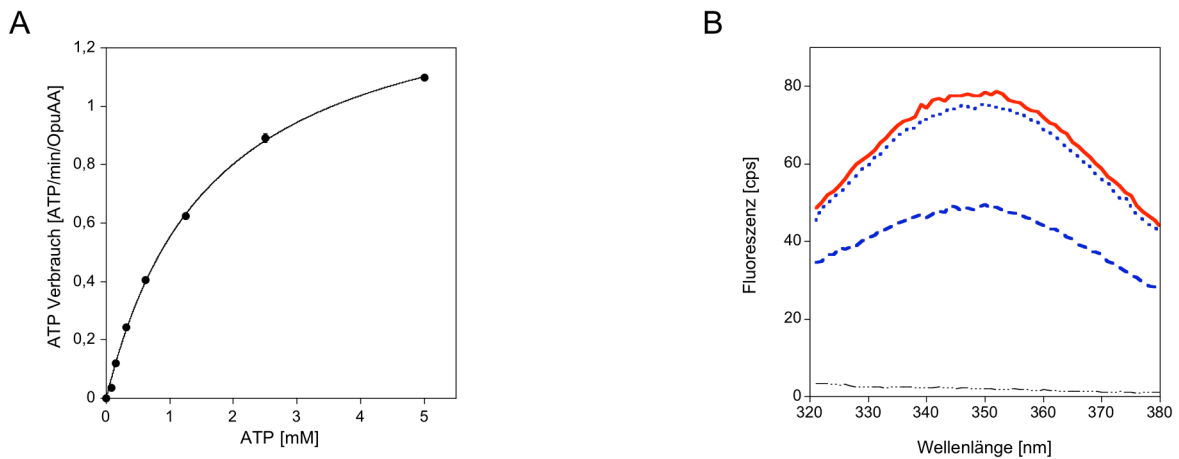


Abb. 3.5.5. Analyse der OpuAA Mutante F19W. **A:** ATPase Aktivität des Monomers bei unterschiedlichen ATP Konzentrationen. Der ATP Verbrauch wurde auf die OpuAA Konzentration normalisiert und die Michaelis-Menten Parameter gemäß Gleichung 6 bestimmt. **B:** Emissionsspektren des Monomers in Abwesenheit (durchgezogene Linie) und in Anwesenheit von 0,5 mM ATP (gestrichelte Linie) oder 0,5 mM AMP (gepunktete Linie). ATP in Abwesenheit von OpuAA (Basislinie). Anregungswellenlänge: 295 nm.

Um den Einfluss von Nukleotiden auf die Fluoreszenzintensität des Trp19 zu untersuchen wurde ein Emissionsspektrum bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm der monomeren OpuAA Mutante in Abwesenheit von Nukleotiden oder in Gegenwart von 0,5 mM ATP/Mg²⁺ oder 0,5 mM AMP/Mg²⁺ aufgezeichnet. In Abwesenheit von Nukleotid wurde ein E_{max} bei 347 nm detektiert. Ein identischer Wert wurde auch für das dimere OpuAA gemessen. Durch Zugabe von 0,5 mM ATP/Mg²⁺ erniedrigte sich die Fluoreszenz um etwa 40 %, während E_{max} unverändert blieb. Durch Zugabe von 0,5 mM AMP/Mg²⁺ erniedrigte sich dagegen die Fluoreszenz um weniger als 5 %. ATP in Abwesenheit von OpuAA zeigte keine Fluoreszenz in dem untersuchten Wellenlängenbereich. Diese Daten implizierten eine Wechselwirkung von ATP mit OpuAA F19W, die zu einer Erniedrigung der Fluoreszenzintensität führte.

Dennoch war zu beachten, dass eine Erniedrigung der Fluoreszenzintensität von mindestens vier unabhängigen Prozessen bewirkt werden konnte: 1. spezifische Bindungswechselwirkung von ATP oder ADP mit Trp19, 2. Stosskollision von Nukleotiden mit Trp19, 3. Verminderung der Lichtintensität an der Anregungswellenlänge durch Absorption von Nukleotiden und 4. unspezifische Wechselwirkung von Nukleotiden mit OpuAA.

Um die Einflüsse der individuellen Prozesse zu ermitteln, wurde in einer ersten Reihe von Experimenten 2 µM monomeres OpuAA F19W oder Tryptophan mit Nukleotiden in HS Puffer mit 5 mM MgCl₂ titriert. Nach jeder Zugabe wurde ein Emissionsspektrum aufgezeichnet und die Intensität am E_{max} bestimmt. Diese Daten wurden auf die Fluoreszenz in Abwesenheit von Nukleotid normalisiert und gegen die ATP Konzentration aufgetragen (Abb. 3.5.6 A).

Im Fall von Tryptophan wurde die Fluoreszenz durch Zugabe von ATP in linearer Weise erniedrigt. Eine lineare Anpassung der Messwerte ergab eine Steigung m_1 von -75 M^{-1} (Abb. 3.5.6 A). Dieses Ergebnis zeigte, dass die durch die Prozesse 2 und 3 (siehe oben) verursachte Fluoreszenzerniedrigung in dem untersuchten ATP Konzentrationsbereich eine lineare Korrelation hatte.

Zugabe von AMP zu OpuAA bewirkte bei AMP Konzentrationen von weniger als 0,5 mM eine Erniedrigung der Fluoreszenz in exponentieller Weise. Bei AMP Konzentrationen von mehr als 0,5 mM nahm die Fluoreszenz dann linear ab (Abb. 3.5.6 A). Eine lineare Anpassung der Messwerte in diesem Konzentrationsbereich ergab eine Steigung, die der Steigung m_1 entsprach. Dies implizierte eine spezifische Bindung von AMP an OpuAA F19W. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die ATPase Aktivität des OpuAA F19W bei 0,5 mM ATP in Gegenwart oder Abwesenheit von 7,5 mM AMP analysiert. Eine Konkurrenz von ATP durch AMP, d.h. eine signifikante Erniedrigung der ATPase Aktivität durch Anwesenheit von AMP konnte, jedoch nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse implizierten, dass AMP in unspezifischer Weise mit OpuAA wechselwirkte und dies zu einer Erniedrigung der Fluoreszenz von OpuAA führte (Prozess 4).

Zugabe von ADP zu OpuAA führte bei ADP Konzentrationen von weniger als 2 mM zu einer Erniedrigung der Fluoreszenz in exponentieller Weise. Dabei war die Amplitude größer, als im Fall von AMP. Bei ADP Konzentrationen von mehr als 2 mM nahm die Fluoreszenz dann in linearer Weise ab (Abb. 3.5.6 A). Eine lineare Anpassung der Messwerte in diesem Konzentrationsbereich ergab eine Steigung m_2 von -30 M^{-1} . Diese Steigung war im Vergleich zu m_1 geringer. Dieses Ergebnis zeigte, dass zumindest Prozess 2 direkt von der Proteinumgebung abhängig war. Andererseits war bei ADP Konzentrationen von mehr als 2 mM Bedingungen der Ligandsättigung erreicht (K_D -Wert $20 \text{ }\mu\text{M}$, Tabelle 7). Dies implizierte, dass die Steigung m_2 ausschließlich die Prozesse 2 und 3 umfasste und damit zur Korrektur der Fluoreszenztitrationen von OpuAA F19W mit ATP oder ADP herangezogen werden konnte. Damit waren die Voraussetzungen zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten von OpuAA F19W/ATP oder OpuAA F19W/ADP Komplexen durch Messung der Trp19 Fluoreszenz gegeben.

Die Titrationsdaten von OpuAA mit ATP oder ADP wurden gemäß dem in Material und Methoden beschriebenen Verfahren korrigiert und normalisiert. Eine Anpassung dieser Daten gemäß Gleichung 15 ergab einen K_D -Wert für monomere OpuAA F19W/ATP Komplexe von $193 \pm 7 \text{ }\mu\text{M}$ und für OpuAA F19W/ADP Komplexe von $72 \pm 2 \text{ }\mu\text{M}$ (Abb. 3.5.6 B). Diese Werte waren im Vergleich zu den in Kapitel 3.5.1.2 bestimmten K_D -Werten um einen Faktor 3-4 erhöht. Dies war im Einklang mit einer ähnlichen Erhöhung des K_M -Wertes von OpuAA F19W in Vergleich zu nativem OpuAA und zeigte, dass die F19W Substitution zu apparent höheren K_D -Werten führte.

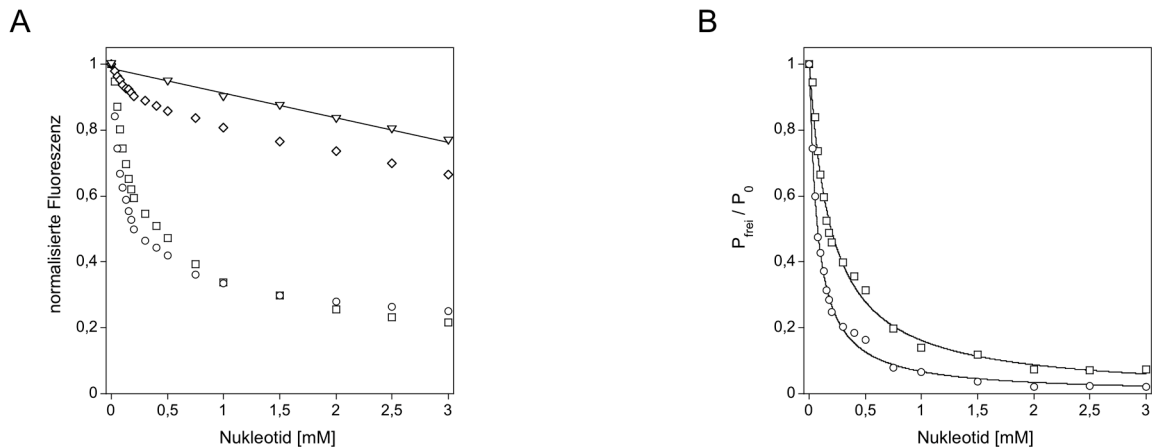


Abb. 3.5.6: Fluoreszenztitration von monomerem OpuAA F19W mit Nukleotiden. **A:** 2 μM OpuAA wurde mit ATP (\square), ADP (\circ) oder AMP (Rauten) titriert. Die Fluoreszenz wurde bei 350 nm bestimmt und auf die Fluoreszenz in Abwesenheit von Nukleotid normalisiert. Ebenso wurde 2 μM Trp mit ATP (\square) titriert, die Fluoreszenz normalisiert und linear angepasst. **B:** Fluoreszenzdaten aus A wurden gemäß dem in Material und Methoden beschriebenen Verfahren korrigiert und mit Hilfe von Gleichung 15 angepasst. ATP (\square), ADP (\circ).

Identische Experimente wurden mit dimerem OpuAA F19W durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde wie beschrieben korrigiert und normalisiert. Die Analyse dieser Daten ergab einen K_D -Wert für dimere OpuAA F19W/ATP Komplexe von $706 \pm 24 \mu\text{M}$ und für OpuAA F19W/ADP Komplexe von $140 \pm 5 \mu\text{M}$ (Abb. 3.5.7 A). Diese Ergebnisse demonstrierten, dass dimeres OpuAA unter Hochsalzbedingungen ATP/ Mg^{2+} oder ADP/ Mg^{2+} binden konnte. Die Affinität gegenüber den Nukleotiden war jedoch im Vergleich zu monomerem OpuAA geringer. Andererseits wurde durch Konkurrenzexperimente gezeigt, dass ATP in diesem Zustand nicht mehr ausgetauscht werden konnte (Kapitel 3.5.1.2).

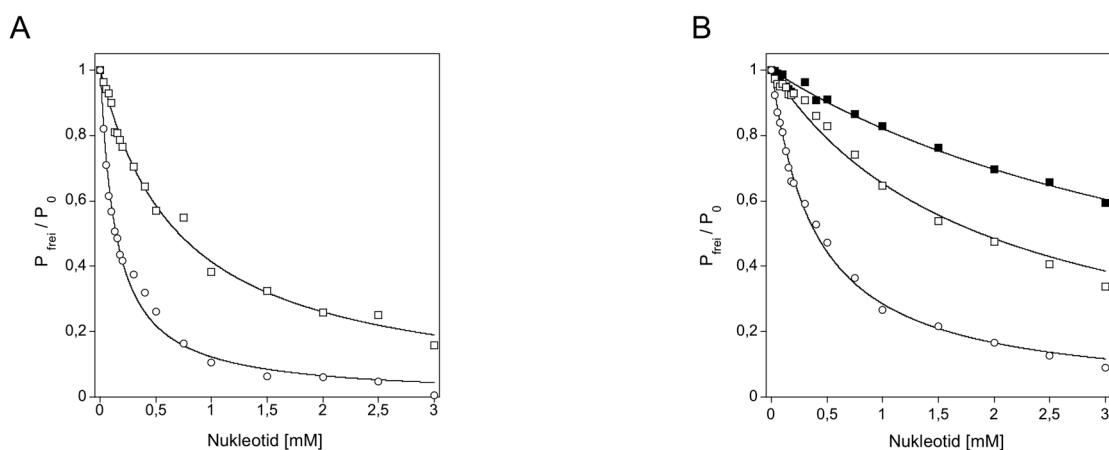


Abb. 3.5.7: Bindung von Nukleotiden an OpuAA F19W. Die Anpassung der Daten erfolgte gemäß Gleichung 15. **A:** Dimeres OpuAA F19W wurde mit ATP (\square) oder ADP (\circ) in HS Puffer 5 mM MgCl_2 titriert. **B:** Monomeres OpuAA F19W wurde mit ATP (\square) oder ADP (\circ) und dimeres OpuAA wurde mit ATP (\blacksquare) in Puffer B 200 mM und 5 mM MgCl_2 titriert.

Oligomere Spezies	NaCl [M]	MgCl ₂ 5 mM	Ligand	K _D [μM]
Monomer	1	+	ATP	193 ± 3
Monomer	1	+	ADP	72 ± 2
Dimer	1	+	ATP	706 ± 24
Dimer	1	+	ADP	140 ± 5
Monomer	0,6	+	ATP	378 ± 11
Dimer	0,6	+	ATP	1100 ± 50
Monomer	0,2	+	ATP	1.900 ± 70
Monomer	0,2	+	ADP	411 ± 10
Dimer	0,2	+	ATP	4.600 ± 200

Tabelle 8: K_D-Werte von monomeren oder dimeren OpuAA F19W/AXP (siehe Ligand) Komplexen in Puffer B mit der entsprechenden NaCl und MgCl₂ Konzentration bei 20 ± 2 °C bestimmt durch Gleichgewichtsbindungsexperimente.

In einer zweiten Reihe von Experimenten wurde Puffer mit 200 oder 600 mM NaCl und 5 mM MgCl₂ verwendet. Die Fluoreszenz wurde wie beschrieben korrigiert und normalisiert. Die Analyse dieser Daten erfolgte gemäß Gleichung 15 und ergab einen K_D-Wert für monomere OpuAA F19W/ATP Komplexe von 1,9 ± 0,07 mM und für OpuAA F19W/ADP Komplexe von 411 ± 10 μM; für dimere OpuAA F19W/ATP Komplexe wurde ein K_D-Wert von 4,6 ± 0,2 mM berechnet (Abb. 3.5.7 B). Weitere Werte sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die K_D-Werte der OpuAA/Nukleotid Komplexe zeigten damit eine starke Abhängigkeit von der Ionenstärke. Dieser Effekt wird in Kapitel 4.2.1 auf Grundlage des Grenzgesetzes von Debye und Hückel (Debye & Hückel, 1923) genauer analysiert.

3.6 Struktur des Substrat-Bindeproteins OpuAC

Der osmoreaktive Transporter OpuA aus *B. subtilis* transportiert unter hyperosmolaren Wachstumsbedingungen kompatible Solute vom extrazellulären Medium in das Zytosol, um den Zellturgor zu stabilisieren (Kempf & Bremer, 1995). Dabei benötigt OpuA ein extrazellulär lokalisiertes Substrat-Bindeprotein, OpuAC (Kempf *et al.*, 1997), das die in niedriger Konzentration (0,1-1 mM) vorliegenden Substrate aus dem Medium bindet und dem Transportkomplex zur Verfügung stellt. OpuAC wird als Präprotein mit einer N-terminalen Signalsequenz aus 20 Aminosäuren translatiert und posttranslational modifiziert: Dabei wird Cys21 mit einer Fettsäure über einen Thioester kovalent verbunden (Abb. 3.6.1 A). Nach Proteolyse des Signalpeptids wird OpuAC über die Lipidmodifikation auf der extrazellulären

Seite der Zytoplasmamembran verankert und damit seine freie Diffusion auf der Oberfläche der Zelle sichergestellt (Kempf *et al.*, 1997). OpuAC bindet die kompatiblen Solute Glycin-Betain und Prolin-Betain mit mikromolarer Affinität. Gemeinsames strukturelles Motiv dieser Substanzen ist eine delokalisierte positive Ladung und eine Carboxylatgruppe. Dies impliziert eine Interaktion dieser Motive mit der Bindungstasche von OpuAC. Ein funktionales Lipid-freies Konstrukt von OpuAC (Abb. 3.6.1 B) wurde bakteriell produziert, gereinigt und kristallisiert. Die dreidimensionale Struktur von OpuAC im Komplex mit Glycin-Betain oder Prolin-Betain sollte dann durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden.

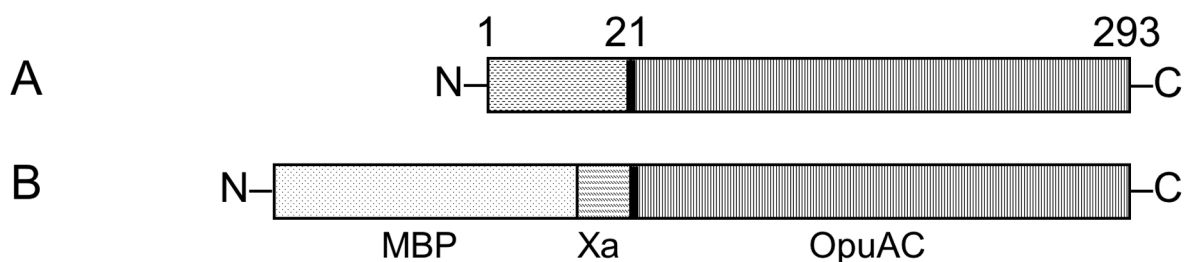


Abb. 3.6.1: Primärstruktur von OpuAC mit Angabe wichtiger Aminosäurepositionen. **A:** Das native OpuAC trägt eine N-terminale Signalsequenz (1-20) und ist an Cys21 mit einer Fettsäure modifiziert, die es in der Zytoplasmamembran verankert. **B:** Das rekombinante OpuAC wurde als N-terminale Fusion mit MBP und einer Faktor Xa Erkennungsstelle heterolog produziert.

3.6.1 Ligandenbindung

Die Funktionalität des gereinigten, rekombinanten OpuAC wurde durch Bindungsexperimente mit seinen Liganden Glycin-Betain und Prolin-Betain überprüft. Dabei wurde seine intrinsische Tryptophan Fluoreszenz als Reporter für Bindungswechselwirkung genutzt, da sich diese bei Zugabe von Liganden veränderte. In Abwesenheit von Liganden zeigte OpuAC bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm ein Emissionsmaximum (E_{\max}) bei 346 nm, was auf eine vollständige Lösungsmittelzugänglichkeit der Tryptophane hindeutete (Lakowicz, 1999). Die Zugabe von Liganden zu OpuAC resultierte in einer Zunahme der Tryptophan Fluoreszenz einerseits und in einer Blauverschiebung von E_{\max} andererseits, die unter Bedingungen der Ligandensättigung 10 nm betrug (Abb. 3.6.2 A). Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass ein Teil der im OpuAC befindlichen Tryptophane bei Ligandenbindung vom Lösungsmittel abgeschirmt wurden und die Polarität ihrer molekularen Umgebung abnahm.

Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität wurde neben der Bindung des Liganden auch durch Stoßkollision oder Filtereffekte hervorgerufen. Um eine zusätzliche Korrektur zu vermeiden, wurde zur Bestimmung des K_D -Wertes von OpuAC/Ligand Komplexen die Verschiebung von E_{\max} bei Ligandenbindung genutzt. Die Beobachtung, dass es bei einer

Glycin-Betain Konzentration von größer als 1 mM keine weitere Verschiebung gab, erlaubte die Normalisierung der E_{max} -Werte. Gemäß der Gleichungen 13 a und b wurden die K_D -Werte für OpuAC/Glycin-Betain und OpuAC/Prolin-Betain Komplexe zu $17 \pm 2 \mu\text{M}$, bzw. $295 \pm 27 \mu\text{M}$ bestimmt (Abb. 3.6.2 B). Diese Werte standen im Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen K_D -Wert von $6 \mu\text{M}$ für den OpuAC/Glycin-Betain Komplex, der mit Hilfe eines Filterbindungstest bestimmt wurde (Kempf *et al.*, 1997). Das rekombinante OpuAC war demnach funktional und konnte für die Kristallisation eingesetzt werden.

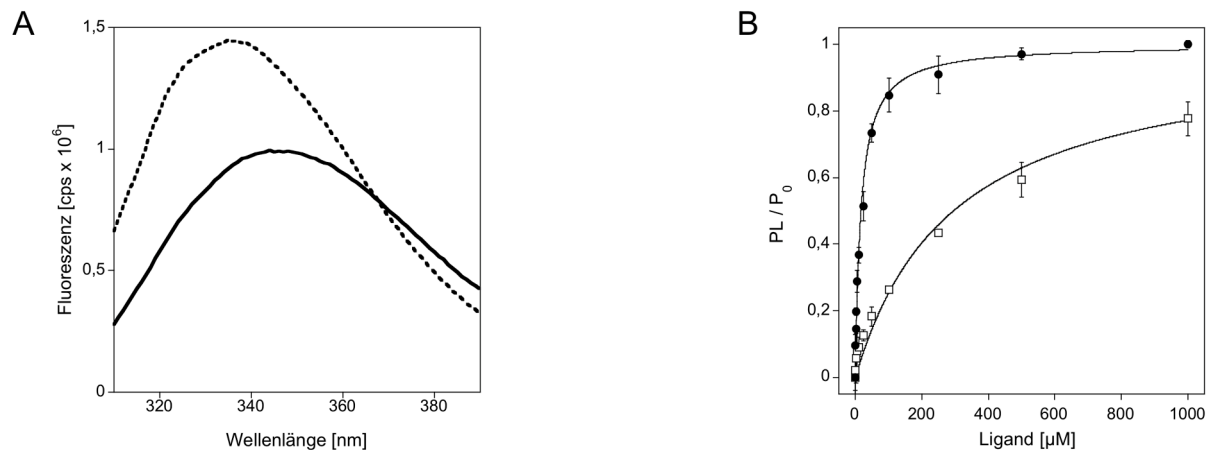


Abb. 3.6.2: Bindungswechselwirkung von OpuAC mit Prolin-Betain (\square) und Glycin-Betain (\bullet). **A:** Emissionsspektren von OpuAC in Abwesenheit (durchgezogene Linie) oder in Gegenwart (gestrichelte Linie) von 1 mM Glycin-Betain. **B:** Die Analyse der normalisierten Verschiebung des E_{max} (PL/P_0) bei Zugabe von Liganden erfolgte gemäß der Gleichungen 13 a und b.

3.6.2 Kristallisation und Bestimmung der Kristallparameter

Kristalle von OpuAC wurden nach der Methode des „Hängenden Tropfens“, eines durch Dampfdiffusion vermittelten Austausches von Wasser zwischen einem Tropfen aus Protein- und Präzipitationslösung und eines Reservoirs mit Präzipitationslösung, erzeugt (Kapitel 2.8.1). In Vorarbeiten von J. Breed wurden Bedingungen gefunden (15 - 20 % (w/v) PEG 4.000, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 - 8,5, 0,15 - 0,3 M NH_4OAc , 10 mg/mL OpuAC, 1 mM Glycin-Betain, 18 °C), unter denen OpuAC in dünnen „Kristallbüscheln“ mit einer Dicke von kleiner als 50 μm kristallisierte, die ineinander verwachsen waren (Abb. 3.6.3 A).

Um die Qualität der Kristalle zu verbessern und damit die Auflösung der Reflexe in Röntgenbeugungsexperimenten zu erhöhen, wurden verschiedene Kristallisationsparameter optimiert: a) Zusammensetzung der Präzipitationslösung wie z.B. Konzentration von PEG oder NH_4OAc bzw. pH, b) Temperatur, c) Zusatz von Additiven zur Präzipitationslösung und d) Veränderung der Kristallisationskinetik.

Die PEG 4000 Konzentration wurde im Bereich von 6 - 19,5 % (w/v) in 1,5 % Schritten, NH_4OAc Konzentration wurde im Bereich von 25 - 300 mM variiert und pH Werte von 8,0, 8,25 und 8,5 wurden getestet. Für Kristalle des nativen OpuAC wurden zunächst Bedingungen bei 100 mM Tris/HCl pH 8,25, 150 mM NH_4OAc und 15 % (w/v) PEG 4000 gefunden, die nur bedingt in der Bildung von isolierten Kristallnadeln resultierten. Auffallend für alle Ansätze war die Bildung vieler, teilweise ineinander verwachsener, Kristalle und deutete auf die Bildung vieler Kristallkeime in der labilen Phase hin, die dann nur bis zu Dimensionen von weniger als 50 μM wuchsen. Im Einklang mit diesen Überlegungen wurde die Kristallisationskinetik, beispielsweise durch Überschichtung des Reservoirs mit Immersionsöl (zur Verlangsamung der Dampfdiffusion), Variation der Proteinkonzentration oder Variation des Volumenverhältnisses von Protein- zu Präzipitationslösung im Tropfen und dessen Volumen, verändert. Die Proteinkonzentration hatte im Bereich 5 - 10 mg/mL keinen Einfluss auf die Qualität und Anzahl der Kristalle. Das Volumenverhältnis des Tropfens wurde zwischen 1:1:0,5 μL und 2:2:1 μL Proteinlösung:Präzipitationslösung:L-Cystein (siehe unten) variiert, wobei keine signifikanten Unterschiede beobachtet wurden. Auch eine Überschichtung mit Immersionsöl zeigte keine signifikanten Veränderungen in Dimension und Anzahl der gebildeten Kristalle.

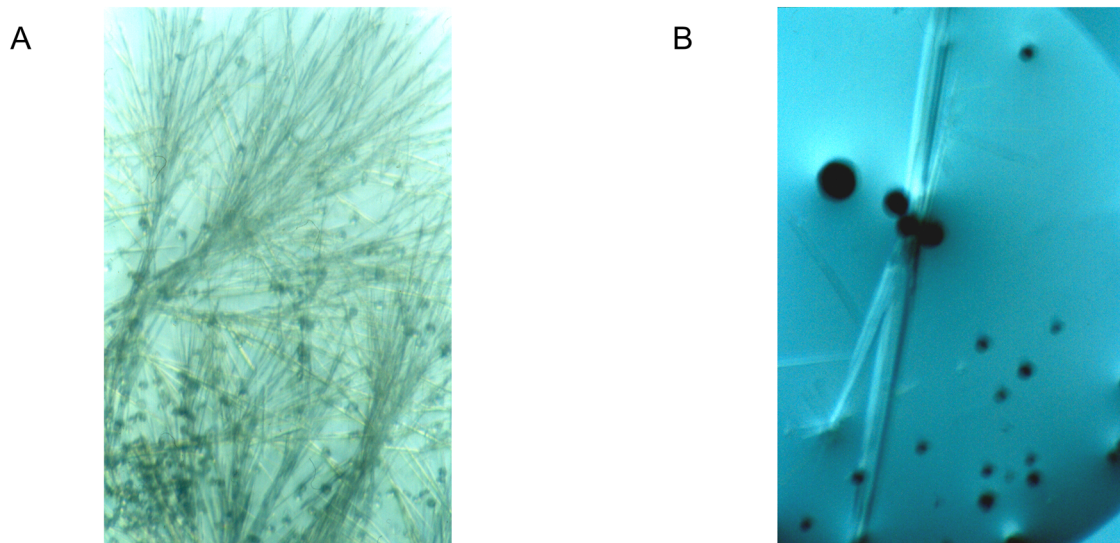


Abb. 3.6.3: Kristalle von OpuAC/Glycin-Betain. **A:** Stark verwachsene Kristallbüschel, die in Abwesenheit von L-Cystein wuchsen **B:** Kristallnadeln, die unter Bedingungen von 100 mM Tris/HCl pH 8,25, 150 mM NH_4OAc , 15 % PEG 4000 und 20 % (v/v) 100 mM L-Cystein wuchsen.

Um das Volumen der Kristallnadeln zu erhöhen, wurde der Einfluss von Additiven zur Präzipitationslösung auf das Kristallwachstum unter Verwendung des *additiv screens* der Firma Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA überprüft. Dabei konnte im Fall von L-Cystein, Dithiothreitol und β -Merkaptoethanol das Volumen der Kristalle erhöht werden. Durch Zugabe von 20 % (v/v) einer 100 mM L-Cystein Lösung wurden einzelne

Kristallnadeln mit durchschnittlichen Dimensionen von 300 x 100 x 50 μm erhalten (Abb. 3.6.3 B). Die Kristalle wurden in *cryo* Puffer (150 mM Tris/HCl, pH 8,25, 200 mM NH_4OAc , 20 % (v/v) PEG 4000, 20 % (v/v) Ethylenglykol) überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und darin bis zur weiteren Verwendung gelagert und zu Röntgenbeugungsexperimenten an der Synchrotronquelle BW6 des Desy, Hamburg verwendet. Native OpuAC/Glycin-Betain Kristalle streuten bei einer Wellenlänge von 1,005 \AA bis zu einer Auflösung von 2,0 \AA und gehörten der orthorombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ an (Tabelle 9a). Unter identischen Bedingungen wurden native OpuAC/Prolin-Betain Kristalle erhalten. Die Kristallparameter und die Daten aus den Beugungsexperimenten sind in Tabelle 9 a zusammengefasst.

Damit standen Datensätze für das native OpuAC in Komplex mit Glycin-Betain oder Prolin-Betain zur Verfügung. Zur Lösung des Phasenproblems, die Voraussetzung zur Berechnung einer Elektronendichte aus Beugungsexperimenten, wurde ein MAD Experiment mit SeMet substituierten OpuAC/Glycin-Betain Kristallen durchgeführt. Unter identischen Bedingungen wurden Kristallnadeln von SeMet substituiertem OpuAC erhalten (100 mM Tris/HCl pH 8,25, 150 mM NH_4OAc , 15 % PEG 4000 (w/v), 20 % (v/v) 100 mM L-Cystein). In Beugungsexperimenten hatten die Reflexe allerdings eine nur schwache Intensität und waren sehr diffus (Abb. 3.6.4 A). Darüber hinaus zeigten die Kristalle anisotropisches Beugungsverhalten.

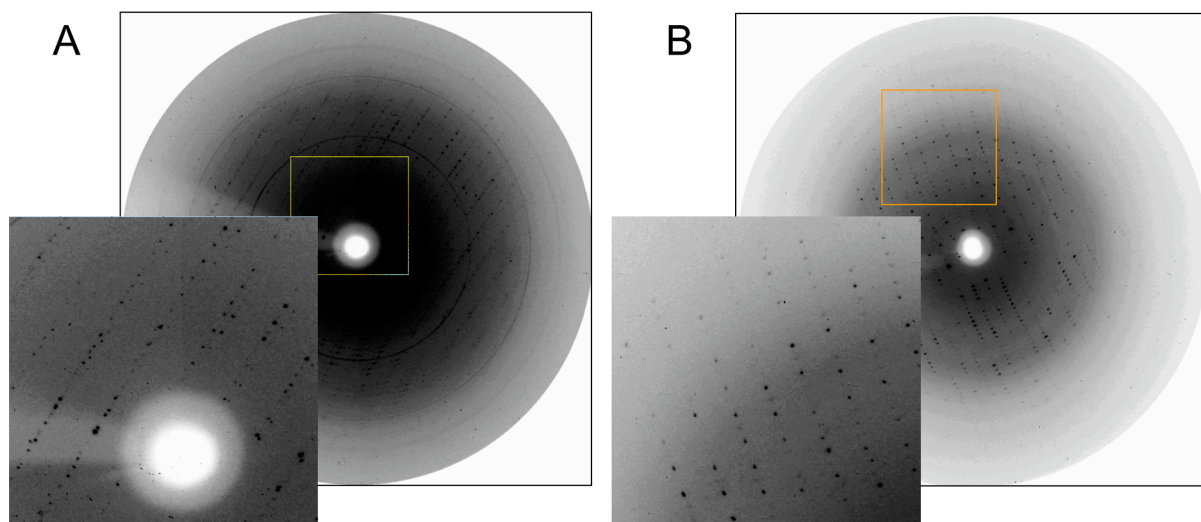


Abb. 3.6.4: Beugungsbilder von SeMet OpuAC/Glycin-Betain Kristallen, aufgenommen an der BW6, Desy, Hamburg. Unteres Bild: Vergrößerung des Beugungsbildes im Bereich des hellen Quadrates. **A:** Kristalle, die unter Bedingungen des nativen OpuAC wuchsen, zeigten diffuse und schwache Reflexe. **B:** Kristalle, die unter optimierten Bedingungen wuchsen, zeigten scharfe und intensive Reflexe.

Parameter der Kristalle

Kristall	OpuAC/Glycin-Betain <u>nativ</u>	SeMet	OpuAC/Prolin-Betain <u>nativ</u>
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Zellkonstanten bei 100 K [Å]	a= 88,47 b= 95,22 c= 29,81 α= β= γ= 90°	a= 88,07 b= 29,78 c= 102,64 α= γ= 90°, β= 94,94°	a= 88,56 b= 28,32 c= 102,83 α= γ= 90°, β= 93,87°

Aufnahme und Prozessierung der Beugungsdaten

		λ_{inf}	λ_{max}	λ_{rem}	
Wellenlänge [Å]	1,005	0,9787	0,97	0,95	1,005
Auflösung [Å]	20 – 2,0	20 – 2,5	20 – 2,5	20 – 2,5	20 – 2,8
gemessene/ Einzigartige Reflexe	537460/ 17266	547071/ 39539	547709/ 34505	548242/ 34419	366205/ 10846
mittlere Redundanz	31,1	13,8	13,8	13,8	33,8
Vollständigkeit ^a [%]	96,5 (80,9)	96,4 (95,9)	96,1 (96,0)	95,8 (94,2)	83,0 (70,7)
I/σ ^a	5,0 (2,3)	10,1 (3,7)	9,6 (3,0)	9,6 (3,1)	10,5 (2,2)
R _{sym} ^a	10,4 (22,2)	9,8 (29,1)	9,9 (31,6)	10,4 (37,7)	10,0 (31,2)

^a: Werte in Klammern gehören zur letzten Auflösungsschale.

$R_{\text{sym}} = \langle \sum_h |I_h - I_h| \rangle / (\sum_h I_h)$, $R_F = \sum | |F_o| - |F_c| | / (\sum |F_o|)$, wobei F_c der berechnete Strukturfaktor ist.

Tabelle 9 a: Kristallparameter von OpuAC/Glycin-Betain (nativ und SeMet Derivat) und OpuAC/Prolin-Betain (nativ). Aufnahme und Prozessierung der Beugungsdaten durchgeführt an der Synchrotronquelle der BW6, Desy, Hamburg.

Dies ließ vermuten, dass die Kristalle einen hohen Grad an Unordnung im Kristallgitter besaßen und/oder die Beugungsreflexe von einem zweiten Kristallgitter überlagert waren (Abb. 3.6.4 A). Die Kristalle konnten zudem nicht eindeutig einer Raumgruppe zugeordnet werden. Somit lieferten diese Kristalle keine zur Lösung des Phasenproblems brauchbaren Datensätze. Eine erneute Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen bei niedrigeren PEG 4000 und NH₄OAc Konzentrationen (50 mM NH₄OAc, 12 % PEG 4000 (w/v)), sowie gleichen Tris/HCl und pH Bedingungen resultierte in einer verbesserten Qualität der Kristalle. Dabei wurde ein signifikanter Einfluss der Temperatur auf die Qualität der Kristalle beobachtet. Zunächst wurde das Protein bei 4 °C kristallisiert, wobei nur kleine Kristalle entstanden, die sich jedoch wieder auflösten. Eine Inkubation der Ansätze bei Raumtemperatur resultierte in erneuter Bildung von Kristallnadeln, die bis zu Dimensionen entsprechend dem des nativen OpuAC wuchsen. In Beugungsexperimenten wurden nun scharfe und intensive Reflexe beobachtet (Abb. 3.6.4 B). SeMet derivatisierte OpuAC/Glycin-Betain Kristalle beugten bei Wellenlängen von 0,9787 Å, 0,97 Å und 0,95 Å bis zu einer Auflösung von 2,5 Å und gehörten der monoklinen Raumgruppe P2₁ an (Tabelle 9 a).

3.6.3 Struktur Bestimmung

Zur Berechnung der OpuAC/Glycin-Betain Elektronendichte wurden die aus dem MAD Experiment gewonnenen Datensätze verwendet. Mit Hilfe des Programms SHELXD (Sheldrick *et al.*, 1993) konnten 16 der 20 erwarteten SeMet Positionen im Dimer der asymmetrischen Einheit lokalisiert werden. Anschließend wurde mit SOLVE und RESOLVE (Terwilliger & Berendzen, 1999) eine Elektronendichte berechnet. Nach Lösungsmittelangleichung wurde ein erstes Modell mit O (Jones *et al.*, 1991) durch manuelles Bauen erstellt und mit CNS (Brünger *et al.*, 1998) und Refmac 5 (Murshudov *et al.*, 1997) in mehreren Zyklen verfeinert. Nach Anwendung eines gemittelten anisotropischen B-Faktors und Lösungsmittelbereinigung wurde das Modell zu 2,7 Å durch manuelles und automatisches Bauen der Aminosäuresequenz in die 1 $F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$ und 2 $F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$ Elektronendichte verfeinert. Die automatische Suche von Wasser Molekülen wurde mit CNS bei einem Ausschlußwert von 3 Å für individuelle Wasser Moleküle durchgeführt und manuell auf vorhandenen Elektronendichte überprüft. Das finale Modell hatte einen R_{free} -Wert (Brünger, 1992) von 27,5 % zeigte einen OpuAC Dimer, zwei Glycin-Betaine und 115 Wasser Moleküle (Tabelle 9b). Das Monomer umfasste die Reste 9 bis 272 des rekombinanten OpuAC (Reste 30 bis 293 des Präproteins), auf die sich nachfolgende Angaben immer beziehen. Für die Reste 1 bis 8 war keine Elektronendichte vorhanden. Die Qualität des Modells wurde mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft; die resultierenden Parameter sind in Tabelle 9 b aufgelistet.

Modell:	OpuAC /Glycin-Betain	OpuAC /Prolin-Betain
Auflösung [Å]	2,7	2,8
R_F [%]	23,6	25,9
R_{free} [%]	27,5	31,0
rmsd Bindungslängen [Å]	0,011	0,009
rmsd Bindungswinkel [°]	1,3	1,253
mittlerer B-Faktor [Å²]	37,4	33,82
Ramachandran Plot ^a		
favorisiert [%]	79,1	81,5
erlaubt [%]	16,8	15,7
generell erlaubt [%]	3,6	1,3
nicht erlaubt [%]	0,4	1,5
Aminosäuren	9 - 272	9 - 272
Oligomerisierung der AU	Dimer	Dimer
Ligand	2 Glycin-Betain	2 Prolin-Betaine
Wasser Moleküle	115	

^a: Die Analyse wurde mit Hilfe des Programms PROCHECK (Kapitel 2.9) durchgeführt.

R_{free} ist wie R_F definiert, aber berechnet für 10 % von zufällig ausgewählten Reflexen, die für die Verfeinerung ausgeschlossen wurden. AU: asymmetrische Einheit.

Tabelle 9 b: Parameter der OpuAC/Glycin-Betain und OpuAC/Prolin-Betain Modelle.

Die Berechnung der OpuAC/Prolin-Betain Elektronendichte erfolgte durch *molecular replacement* (Drenth, 1999) mit Hilfe des Programms AMoRE (Navaza, 1994) mit OpuAC/Glycin-Betain als Matrize. Ein verfeinertes Modell bei 2,8 Å mit einem R_{free} -Wert von 31,0 % zeigte einen OpuAC Dimer in der asymmetrischen Einheit mit zwei Prolin-Betain und umfasste die Reste 9 bis 272 des rekombinanten OpuAC (Tabelle 9 b). Weitere Parameter des Modells enthält die Tabelle 9 b.

3.6.4 Faltung von OpuAC im Komplex mit Glycin-Betain oder Prolin-Betain

Die Struktur von OpuAC im Komplex mit Glycin-Betain zeigte ein Dimer in der asymmetrischen Einheit. Einer strukturellen Argumentationslinie zufolge ist eine physiologische Relevanz des OpuAC Dimers aufgrund der geringen Dimer-Kontaktfläche jedoch wenig plausibel. Die Monomere A und B hatten eine ähnliche Faltung, die aus zwei globulären Domänen 1 und 2 bestand (Abb. 3.6.5 A). Die beiden Domänen waren über zwei Peptidsegmente, die als Gelenke fungierten, miteinander verbunden und bestanden aus jeweils zwei zentralen β -Faltblättern, die von mehreren β -Helizes flankiert waren.

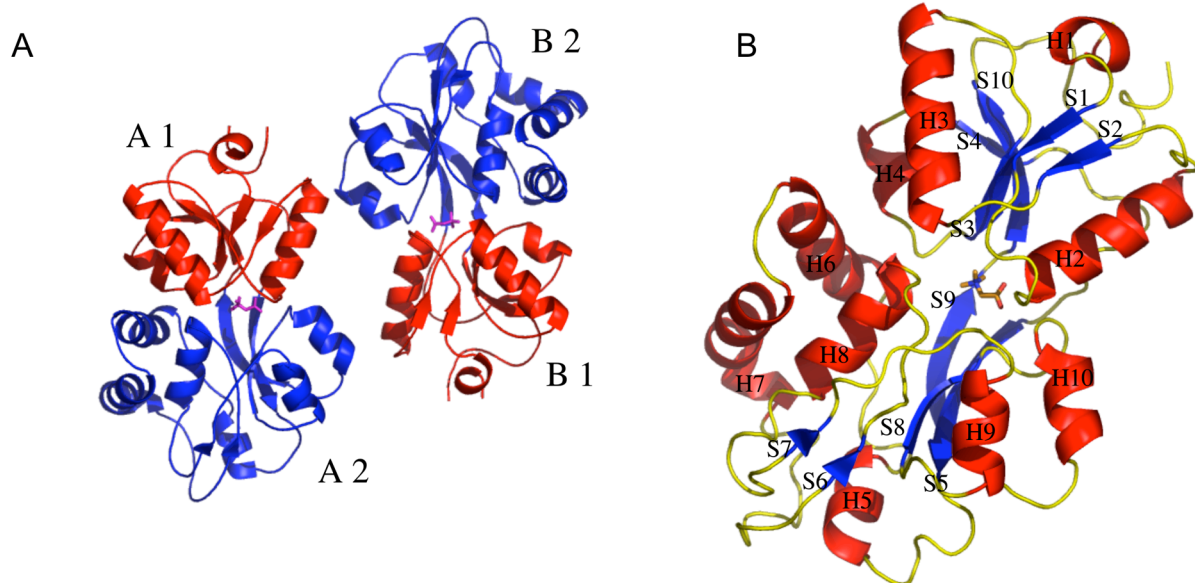


Abb. 3.6.5: Struktur von OpuAC im Komplex mit Glycin-Betain (in Stäbchendarstellung). **A:** Dimer der asymmetrischen Einheit. Monomere A und B mit den Domänen 1 (rot) und 2 (blau). Schlaufen in geglätteter Darstellung. **B:** Monomer A mit Helizes (rot), Faltblattstränge (blau) und Schlaufen (gelb).

Domäne A1, die N- und C-Terminus enthielt, bestand aus einem parallelen β -Faltblatt mit den Strängen S1 (AS: 17-19) und S2 (AS: 44-46) und war von Helix H2 (AS: 26-38) flankiert, sowie einem antiparallelen β -Faltblatt mit den Strängen S3 (AS: 68-72), S4 (AS: 83-85) und S10 (AS: 253-258) und war von den Helizes H3 (AS: 50-63) und H4 (AS: 76-80) flankiert. In Domäne A2 setzte sich das parallele β -Faltblatt aus den Strängen S6 (AS: 170-171) und S7 (AS: 198-199) zusammen und war von Helix H5 (AS: 111-117) flankiert. Das antiparallele β -

Faltblatt mit den Strängen S5 (AS: 97-103), S8 (AS: 220-224) und S9 (AS: 243-251) war von den Helizes H5 (AS: 111-117), H8 (AS: 179-189) und H9 (AS: 208-215) flankiert. Der Monomer B zeigte einige Unterschiede in Sekundärstrukturelementen: Helix H7 war unterteilt in Helix H7a (AS: 141-151) und Helix H7b (AS: 153-160). Der Strang S8 war um eine Aminosäure erweitert (AS: 220-225). Der Ligand Glycin-Betain war in einer Spalte zwischen den beiden globulären Domänen 1 und 2 lokalisiert und von den β -Faltblattsträngen S5 und S9 der Gelenkregion flankiert. Die Topologie des Monomers 1 mit einer Bezeichnung der β -Helizes und β -Faltblattsträngen zeigt Abbildung 3.6.5 B. OpuAC im Komplex mit Prolin-Betain hatte eine nahezu identische Faltung. Eine solche Faltung ist für Substrat-Bindeproteine (SBP) konserviert (Bjorkman *et al.*, 1994; Tame *et al.*, 1996). Generell werden SBPs in zwei Gruppen mit unterschiedlicher Anzahl der verbindenden Peptidsegmenten und damit unterschiedlicher Domänenfaltung unterteilt (Quioco & Ledvina, 1996): Gruppe I mit drei Peptidsegmenten und Gruppe II mit zwei Peptidsegmenten. Eine zusätzliche Gruppe wird von den *E. coli* SBPs FhuD (Clarke *et al.*, 2000) und BtuF (Borths *et al.*, 2002; Karpowich *et al.*, 2003) repräsentiert, in denen nur ein verbindendes Peptidsegment existiert. Gemäß dieser Nomenklatur besitzt OpuAC eine SBP-typische Klasse II Faltung.

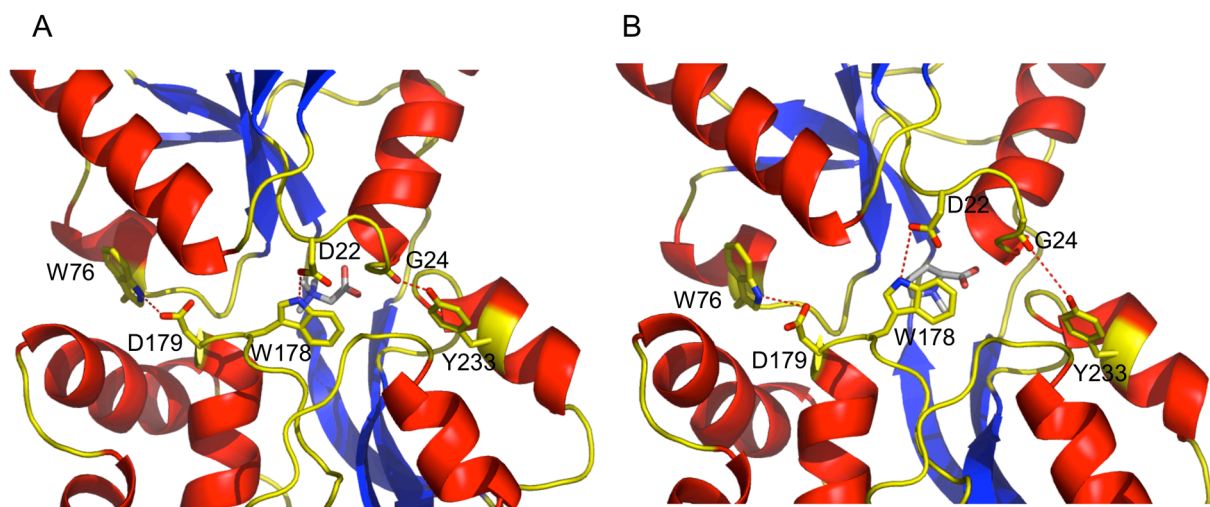


Abb. 3.6.6: Wasserstoffbrücken zwischen Asp22/Trp178, Asp179/Trp76 und Tyr233/Gly24, die die Domänen 1 und 2 von OpuAC/Glycin-Betain (A) oder OpuAC/Prolin-Betain (B) überbrücken. Ligand und Aminosäuren in Stäbchendarstellung.

Die beiden Domänen 1 und 2 hatten Kontakte über die N-Termini der Helizes H3, H4, H6 und H8 einerseits und der Helizes H2 und H10 andererseits (Abb. 3.6.5 B). Damit nahmen die Domänen eine geschlossene Konformation ein und schirmten den Ligand vom Lösungsmittel ab. In diesem Zusammenhang konnten mehrere Wasserstoffbrücken identifiziert werden, in denen der Wasserstoffbrückendonator und der Wasserstoffbrückenakzeptor auf unterschiedlichen Domänen lokalisiert waren und die Wasserstoffbrücke so die beide Domänen überbrückte (Abb. 3.6.6): Asp22/Trp178, Asp179/Trp76 und Tyr233/Gly24. Die

Wasserstoffbrücke zwischen Asp22 und Trp179 hatte in der OpuAC/Glycin-Betain Struktur eine Distanz von 2,8 Å (Abb. 3.6.6 A). Dagegen war sie in der OpuAC/Prolin-Betain Struktur auf 4,4 Å erweitert (Abb. 3.6.6 B). Interessanterweise waren auch die beiden anderen Distanzen in der OpuAC/Prolin-Betain Struktur im Vergleich zu der OpuAC/Glycin-Betain Struktur erhöht. Die Abbildung 3.6.9 zeigt eine direkte Überlagerung beider Strukturen in einer Ausschnittsvergrößerung mit Angabe der Distanzen der Wasserstoffbrücken.

Die Architektur der Substrat-Bindetasche wurde von drei Tryptophanen, Trp72 am C-Terminus von S3, Trp178 N-terminal von H8 und Trp225 C-terminal von S8, ausgebildet. Dabei umschlossen die planaren aromatischen Indolgruppen der Tryptophane die Trimethylammoniumgruppe von Glycin-Betain (Abb. 3.6.7 A) oder Prolin-Betain (Abb. 3.6.7 B).

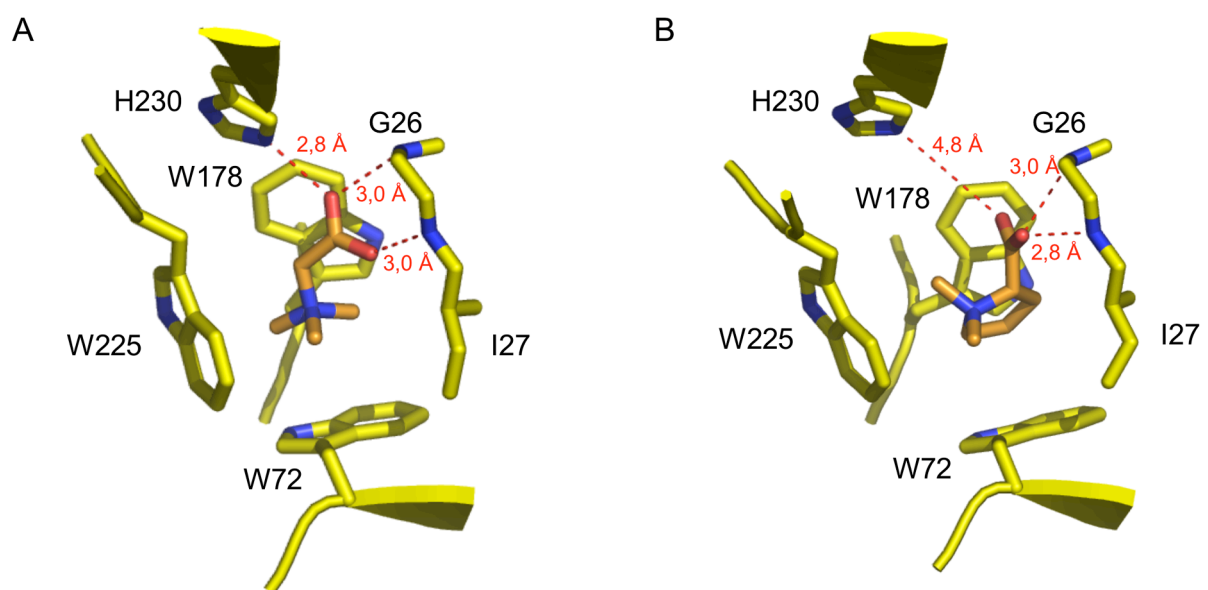


Abb. 3.6.7: Substrat-Bindetasche von OpuAC/Glycin-Betain (A) und OpuAC/Prolin-Betain (B). Die Tryptophane 72, 178 und 225 bilden ein sog. „Tryptophan-Prisma“ zur Komplexierung des Substrats. Wasserstoffbrücken bestehen zwischen der Carboxylatgruppe von Glycin-Betain bzw. Prolin-Betain und His230, sowie den Amidprotonen von Gly26 und Ile27. Distanzangaben in rot.

Der Indolring von Trp225 lag parallel zu den β -Faltblattsträngen der Gelenkregion und stand rechtwinklig zu dem Indolring von Trp73. Der Indolring des Trp178 überbrückte diese Geometrie zu einem hypothetischen Prisma, wobei der Indolring zu der Basisfläche des Prismas verdreht war (Abb. 3.6.7). Die Carboxylatgruppe des Liganden stand aus dem „Tryptophan-Prisma“ heraus und bildete eine Wasserstoffbrücke mit dem Imidazolring von Histidin 230 aus Domäne 2 und den Amidprotonen von Glycin 26 und Isoleucin 27 der Domäne 1. Die Distanz der Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxylatgruppe und dem Imidazolring in OpuAC/Glycin-Betain betrug 2,8 Å. Im Vergleich dazu war in OpuAC/Prolin-Betain diese Wasserstoffbrücke um 2 Å auf 4,8 Å erweitert. Die Distanzen der Wasserstoffbrücken zwischen der Carboxylatgruppe und den Amidprotonen war in beiden Strukturen

ähnlich. Zusätzlich zu diesen Wechselwirkungen wurden die Liganden durch das „Tryptophan-Prisma“ komplexiert. Die Abbildung 3.6.9 zeigt eine direkte Überlagerung beider Strukturen.

Zwei Beiträge von Wechselwirkungen waren an der Komplexierung der Liganden durch das „Tryptophan-Prisma“ beteiligt. Die positive Ladung des quartären Ammoniumions verteilte sich auf die vier gebundenen C-Atome, die so mittels Kationen- π Wechselwirkung mit dem aromatischen System der Indolringe interagierten. Andererseits gab es van-der-Waals Interaktionen. Um die individuelle Natur der Wechselwirkung zwischen Ligand und dem „Tryptophan-Prisma“ zu charakterisieren wurden alle interatomaren Distanzen bestimmt (Abb. 3.6.8 A und B) und mit einer Liste von theoretischen van-der-Waals Radien verglichen, die von Li und Nussinov (Li & Nussinov, 1998) publiziert waren. Dabei besitzen die Methyl- oder Methylengruppen bzw. die aromatischen Ringatome, wenn der Einfluss der positiven Ladung auf die Kontaktdistanzen vernachlässigt wird, van-der-Waals Radien von 1,92 Å bzw. 1,82 Å. Dies resultiert in einer mittleren Distanz von 3,74 Å mit einer Standardabweichung von 0,5 Å zwischen diesen Atomen. Im Einklang damit war es plausibel, dass zwei Atome in Kontakt waren, wenn ihre Distanz im Bereich zwischen 3,5 Å und 4,0 Å lag. Die Atome der Indolringe, die dieses Kriterium erfüllen sind im Fall einer Kationen- π Interaktion blau markiert und im Fall einer van-der-Waals Interaktion rot markiert (Abb. 3.6.8). Glycin-Betain bildete gemäß diesem Kriterium 9, 12 und 8 Kontakte mit dem Indolring von Trp72, Trp178 und Trp225 über kationische- π Interaktion aus. Dagegen bildete Prolin-Betain nur jeweils 6 Kationen- π Kontakte mit dem Indolring von Trp72 und Trp225 aus. Diese Kontakte wurden durch 15 van-der-Waals Interaktionen mit dem Indolring von Trp72 und Trp178, sowie Isoleucin 27 ergänzt. Die unterschiedliche Zahl der Kontakte der Indolringe mit dem Ligand impliziert einen differenzierten enthalpischen Beitrag jedes der drei Tryptophanreste an der Bindung.

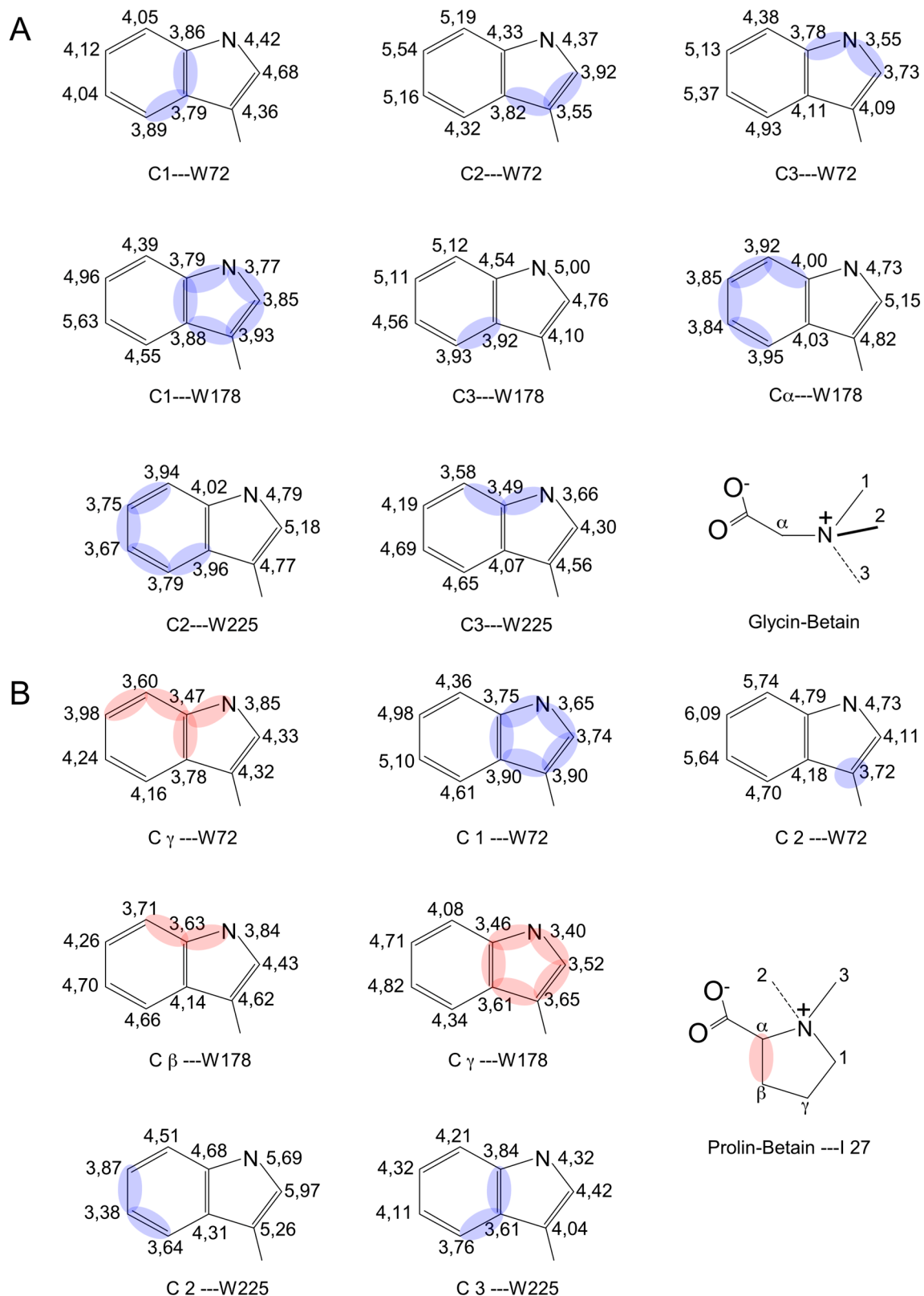


Abb. 3.6.8: Distanzen in Å zwischen den Indolringatomen von Trp72, 178 und 225 bzw. C- β von I27 und den C-Atomen von Glycin-Betain (A) oder Prolin-Betain (B). Kationen- π -Interaktion (siehe Text): blaue Unterlegung, van-der-Waals Interaktionen (siehe Text): rote Unterlegung.

Eine Überlagerung von beiden Strukturen zeigte eine unterschiedliche Orientierung des Liganden im „Tryptophan-Prisma“ (Abb. 3.6.9). So kamen die vier Methyl- bzw. Methylen-gruppen, die an das N-Atom gebunden waren, nicht in Deckung und auch die Carboxylate waren gegeneinander versetzt. Die Orientierung der Tryptophanreste und des Histidin 230 ihrerseits zeigten in beiden Strukturen Abweichungen. Diese Unterschiede erklärten das unterschiedliche Muster von Kationen- π und van-der-Waals Interaktionen (Abb. 3.6.8). Eine signifikante Abweichung im Vergleich beider Strukturen zeigte auch das Peptidsegment, das Asp22 und Gly26/Ile27 miteinander verband. Diese Variation erklärte, warum die Distanz der Wasserstoffbrücke zwischen Asp22 und Trp178 zunahm. Auch die Position weiterer Aminosäuren, die an Wasserstoffbrücken zwischen Domäne 1 und Domäne 2 beteiligt waren (Asp179/Trp76 und Tyr233/Gly24) war so variiert, dass die entsprechenden Distanzen in OpuAC/Prolin-Betain im Vergleich zu OpuAC/Glycin-Betain erhöht wurden. Ein Vergleich dieser Merkmale wurde als Kriterium genutzt, um Affinität und Selektivität der Bindungswechselwirkung der Liganden mit OpuAC qualitativ zu analysieren (Kapitel 4.1). Diese Analyse war interessant, da die K_D -Werte beider Komplexe sich um das 15 fache unterschieden, obwohl beide Liganden die gleichen molekularen Motive enthalten.

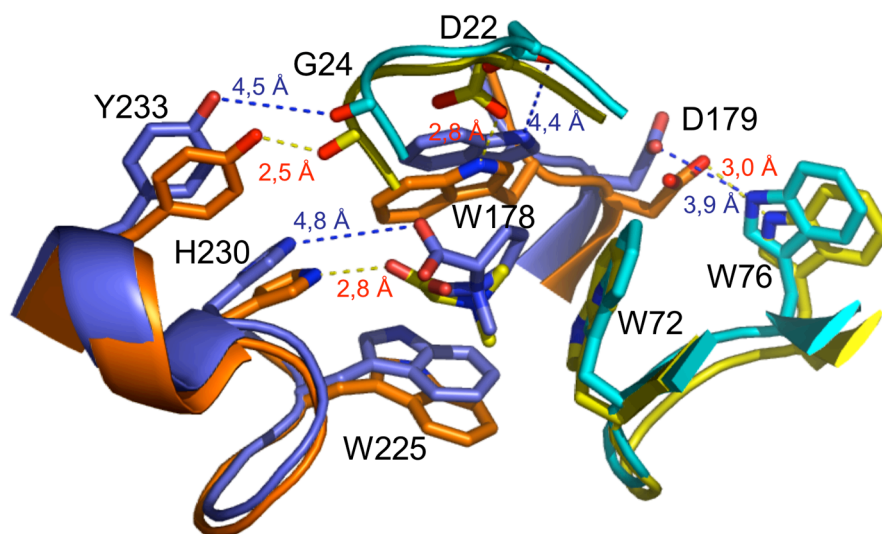


Abb. 3.6.9: Überlagerung der OpuAC/Glycin-Betain und OpuAC/Prolin-Betain Struktur. Farbwahl: OpuAC/Glycin-Betain: Domäne 1 in gelb, Domäne 2 in orange, Distanzen in rot. OpuAC/Prolin-Betain: Domäne 1 in türkis, Domäne 2 in violett, Distanzen in blau. Aminosäuren, die am „Tryptophan-Prisma“ beteiligt sind oder relevante Wasserstoffbrücken ausbilden, sind besonders gekennzeichnet.

Kürzlich wurde die Struktur von ProX, das SBP des osmoreaktiven ABC-Transporters ProU aus *E. coli*, im Komplex mit Glycin-Betain oder Prolin-Betain beschrieben (Schiefner *et al.*, 2003). Im Einklang mit der hier gezeigten Struktur waren auch im Fall von ProX drei Tryptophane, sowie ein analoges Wasserstoffbrückennetzwerk an der Bindung des Liganden beteiligt. Die Indolringe nahmen im Vergleich zu OpuAC jedoch eine unterschiedliche

Geometrie ein und zeigten als Konsequenz signifikant geringere Kontakte mit den Liganden. Die Autoren bezeichneten die an der Ligandenbindung beteiligten Tryptophane aufgrund ihrer rechtwinkligen Anordnung als „Tryptophan-Box“. Ein Vergleich des „Tryptophan-Prismas“ mit der „Tryptophan-Box“ verdeutlicht einen evolutiven Mechanismus, dem zufolge ein gemeinsames Prinzip für die Bindungswechselwirkung mit Liganden für jedes Protein individuell variiert wird.

3.7 Intermolekulare Orientierung und Dynamik des OpuAA Dimers

Das Nukleotid-Bindeprotein OpuAA ist für die Energetisierung des Translokationsprozesses des OpuA Transporters verantwortlich. Hierzu katalysiert OpuAA die Hydrolyse von ATP und die Übertragung der Energie auf OpuAB, das die Translokationspore bildet. In vorangegangenen Experimenten konnte für OpuAA ein funktionales Wechselspiel zwischen katalytischem Zustand und Oligomerisierung gezeigt werden (Kapitel 3.3). Während für den posthydrolytischen Zustand, in Gegenwart von ADP/Mg²⁺, der Monomer die prädominante oligomere Spezies war, dominierte der Dimer im Nukleotid-freien und ATP-gebundenen Zustand. Ein Zerfall des Dimers wurde durch ADP/Mg²⁺ induziert und von einer Konformationsänderung begleitet. In diesem Kontext sollten folgende Fragestellungen adressiert werden: Welche intermolekulare Orientierung nimmt das dimere OpuAA im Nukleotid-freien Zustand ein? Wird durch Nukleotidbindung an das Dimer eine intermolekulare Dynamik induziert? Welche kinetischen Parameter bestimmen den durch ADP/Mg²⁺ induzierten Zerfalls von OpuAA? Gibt es potentielle Konformationsänderungen bei Bindung von ATP/Mg²⁺?

Im Einklang mit diesen Überlegungen musste ein System etabliert werden, das in einer distanz- und zeitabhängigen Weise die intermolekulare Orientierung des dimeren OpuAA zu detektieren vermochte. Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) (Förster, 1948; Stryer, 1978) eines Donor-(Fluorophors) auf einen Akzeptor-(Fluorophor) war hier die Methode der Wahl. Die Transfereffizienz (E_T -Wert), die ein Maß für die räumliche Entfernung der Fluorophore darstellt, kann statisch oder zeitaufgelöst bestimmt werden. Donor und Akzeptor mussten hierfür zwei notwendige Bedingungen erfüllen: 1. Spektrale Überlappung der Donor-Emission mit der Akzeptor-Absorption 2. Räumliche Distanz des Donor/Akzeptor (D/A)-Paares in Abhängigkeit seiner individuellen Förster-Distanz (R_0) innerhalb gewisser Grenzen (20-100 Å) (Förster, 1948). Als D/A-Paar eignete sich Oregon Green[®] (OG) und Texas Red[®] (TR) mit einem R_0 -Wert von 51,3 Å, das z.B. für die Analyse der Assoziation und Dissoziation der cAMP-abhängigen Proteinkinase verwendet wurde (Johnson *et al.*, 1993).

Folgende Strategie wurde dabei gewählt: Das OpuAA Monomer sollte mit Hilfe von Maleinimid-modifiziertem OG bzw. TR durch eine Cystein-spezifische Kopplungsreaktion an

einer ausgewählten Aminosäureposition markiert werden. Eine solche Strategie war für OpuAA geeignet, da es frei von weiteren Cysteinen war. Anschließend sollte durch Dimerisierung von OpuAA das D/A-Paar in räumliche Nähe gebracht werden, so dass ein strahlungsloser Energietransfer möglich war, und damit Informationen über die Distanz der Fluorophore gewonnen werden konnten. Für diese Versuchsanordnung mussten zunächst geeignete Positionen im OpuAA gefunden werden, an denen eine Cystein-Substitution sinnvoll war.

3.7.1 Auswahl von Positionen im OpuAA zur Cystein-Substitution

Die Architektur der NBDs von ABC-Transportern folgt einem generellen Schema: eine katalytischen Domäne und eine Signaldomäne sind in einer L-förmigen Anordnung zueinander orientiert (Kapitel 1.2.1). Theoretisch betrachtet, erforderte eine eindeutige Aussage über die räumliche Orientierung der NBDs im Dimer mindestens drei Entfernungsvektoren. Dafür musste der E_T -Wert von mindestens drei D/A-Paaren, mit Donor und Akzeptor auf unterschiedlichen Monomeren im Dimer, durch FRET-Messungen bestimmt werden. Das sich hieraus ergebende räumliche Modell gewinnt mit steigender Zahl an D/A-Paaren an Aussagekraft. Andererseits kann bei begrenzter Zahl von D/A-Paaren eine Aussage über die Architektur des Dimers getroffen werden, wenn bereits homologe Kristallstrukturen vorliegen. Sie können als Modell für den OpuAA Dimer genutzt werden, in dem die Entfernungsvektoren hierauf projiziert werden.

Für eine begrenzte Zahl von NBDs ist eine Kristallstruktur des Dimers verfügbar (Tabelle 2). Die intermolekulare Orientierung der Untereinheiten im Dimer folgt jedoch keiner einheitlichen Architektur. Aufgrund der intermolekularen Wechselwirkungsfläche können mehrere Gruppen an Dimeren unterschieden werden: In Rad50 (Hopfner *et al.*, 2000) oder MJ0796 (E171Q) (Smith *et al.*, 2002) erfolgte die Wechselwirkung im Dimer über die katalytischen Domäne des einen Monomers und die Signaldomäne des anderen Monomers. Dabei bildete die Wechselwirkungsfläche aus Walker A Motiv und C-Schleufe eine Bindungstasche für ATP aus. Diese Architektur wurde als *head-to-tail* Dimer bezeichnet und gilt momentan als die physiologisch relevante Dimerstruktur (Kapitel 1.2.2). Eine solche Architektur wurde auch für MalK aus *E. coli* im Komplex mit ATP beobachtet, wobei die im Fall von MalK existente regulatorische Domäne eine zusätzliche Wechselwirkung vermittelte (Chen *et al.*, 2003). Auch biochemisch konnte eine Beteiligung des Walker A Motivs und der C-Schleufe an der Ausbildung der Nukleotid-Bindetasche von MalK durch Vanadat induzierte Proteinfragmentierung demonstriert werden (Fetsch & Davidson, 2003). Im Nukleotid-freien Zustand öffnete sich der MalK Dimer und eine Wechselwirkung fand nur über die regulatorische Domäne statt (Chen *et al.*, 2003). Eine unterschiedliche Architektur wurde für

den MalK Dimer aus *S. typhimurium* beobachtet (Diederichs *et al.*, 2000). Hier wiesen die regulatorischen Domänen keine Wechselwirkung auf, sondern zeigten zu entgegengesetzten Enden des Dimers. Die Wechselwirkung im Dimer erfolgte einerseits über katalytische Domäne beider Monomere und andererseits über die Signaldomäne beider Monomere. Diese Architektur wurde als *head-to-head* Dimer bezeichnet. Im Fall von HisP erfolgte die Wechselwirkung im Dimer ausschließlich über die katalytische Domäne beider Monomere, wobei die Bindungstasche für ATP individuell von jedem Monomer ausgebildet wurde (Hung *et al.*, 1998). Diese Architektur wurde als *back-to-back* Dimer bezeichnet und ist im Gegensatz zu den zuvor genannten Dimer Strukturen in der asymmetrischen Einheit ein kristallographisches Dimer.

Im Einklang mit diesen Strukturen sollte im OpuAA eine Aminosäureposition in der katalytischen Domäne und alternativ in der Signaldomäne für die Cystein-Substitution ausgewählt werden. Die möglichen Kombinationen von D/A-Paaren sollten dabei, je nachdem welche Orientierung das OpuAA Dimer hatte, individuelle und signifikant unterschiedliche E_T -Werte aufweisen und damit eine eindeutige Aussage über die intermolekulare Orientierung der Untereinheiten im Dimer ermöglichen. Hierzu wurde zunächst mit Hilfe des Programms ClustALW ein Sequenzvergleich von OpuAA mit MalK aus *T. littoralis* durchgeführt. MalK wurde ausgewählt, da es eine 25 %ige Identität zu OpuAA hat und ebenfalls eine regulatorische Domäne besitzt. Damit war die Kristallstruktur von MalK (Diederichs *et al.*, 2000) die optimale Matrize für OpuAA als diese Arbeiten begonnen wurden. Ein dreidimensionales Modell des OpuAA Monomers auf Grundlage von MalK wurde mit Hilfe des Programmpakets Swiss Model Repository (Schwede *et al.*, 2003) erstellt. Dabei berechnete ProMod II zunächst einen Satz von Modellen, die dann mit dem Programm Gromos96 durch Minimierung der Kraftfeldenergie optimiert und selektiert wurden.

Im Einklang mit obigen Überlegungen und auf Grundlage des OpuAA Modells (Abb. 3.7.1) erwiesen sich die Aminosäuren Serin45 in der katalytische Domäne, sowie Serin171 bzw. Glycin161 in der Signaldomäne als geeignete Positionen zur Markierung. Die Seitengruppen an diesen Positionen zeigten im Modell zur Proteinoberfläche, was eine notwendige Voraussetzung für die Markierung mit Fluorophoren ist. Darüber hinaus waren in keiner der beschriebenen Dimer Strukturen Aminosäuren in den entsprechenden Proteinregionen an der Bindungswechselwirkung der Monomere im Dimer beteiligt. Eine Ausnahme bildete Serin171, das in der C-Schleife lokalisiert war. Für die Dimer Strukturen von Rad50 (Hopfner *et al.*, 2000), MJ0796 (E171Q) (Smith *et al.*, 2002) und MalK/ATP aus *E. coli* (Chen *et al.*, 2003) war die C-Schleife an der Komplementierung der Nukleotid-Bindetasche des anderen Monomers beteiligt. Für die Dimer Struktur von MalK/PP_i (Diederichs *et al.*, 2000) aus *T. littoralis* war dies jedoch nicht der Fall. Andererseits war der Austausch von Serin zu Cystein

phylogenetisch konserviert, da in der Seitenkette ein Sauerstoff- gegen ein Schwefelatom ausgetauscht wurde.

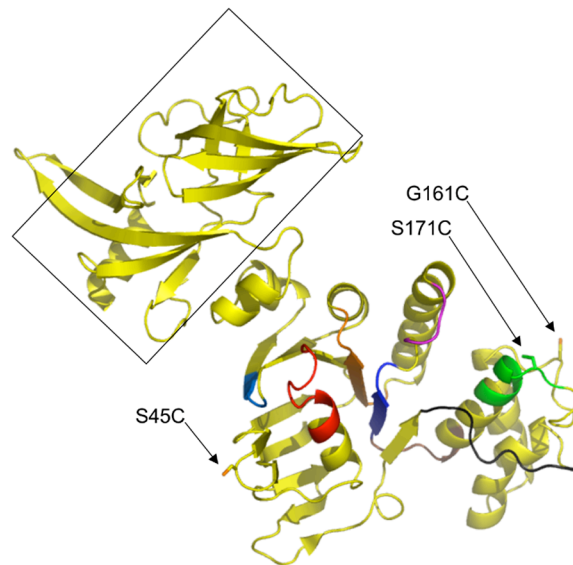


Abb. 3.7.1: Modell von OpuAA, das auf Grundlage von MalK aus *T. litoralis* berechnet wurde. Die gewählten Aminosäuresubstitutionen sind mit einem Pfeil markiert. Konservierte Motive (Kapitel 1.2.1) sind gekennzeichnet: Walker A Motiv (rot), Q-Schleife (schwarz), C-Schleife (grün), Pro-Schleife (braun), Walker B Motiv (blau), D-Schleife (rosa), H-Schleife (orange), Gly-Schleife (türkis). Die regulatorische Domäne ist von einem Kasten umgeben.

3.7.2 Isolierung und Funktionalität der OpuAA-Mutanten S45C, G161C und S171C

Zur bakteriellen Produktion der Cystein-Mutanten S45C, G161C und S171C des OpuAA wurden die Expressionsplasmide pBAD33/OpuAA-His₆ S45C, pBAD33/OpuAA-His₆ S171C und pBAD33/OpuAA-His₆ G161C konstruiert (Tabelle 4). Die Kultivierung der transformierten *E. coli* BL21(DE3) Zellen und die Isolierung des rekombinanten Proteins mittels IMAC erfolgten in der für das native OpuAA beschriebenen Weise, wobei auf die Zugabe von NEM bei der Zellyse verzichtet wurde, um eine Modifikation des freien Cysteins im OpuAA zu vermeiden. Die durch IMAC erhaltenen Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE auf ihren Gehalt an rekombinanten Protein und dessen Reinheit analysiert (Abb. 3.7.2 A und B). OpuAA S45C und OpuAA S171C wurden in ähnlichen Ausbeuten, wie die des nativen OpuAA erhalten; dagegen wies OpuAA G161C eine 4 fach niedrigere Ausbeute auf. Die Reinheit aller Cystein-Mutanten war mit der des nativen OpuAA vergleichbar. In einem oxidativen Gel zeigten die OpuAA-Mutanten S45C und G161C jedoch Proteinbanden mit niedrigerer elektrophoretischer Mobilität, die in einem reduzierenden Gel nicht nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.7.2 B). Dies deutete auf die Bildung einer potentiellen intermolekularen Disulfidbrücke hin. Um die Ausbildung von Cystinen zu unterdrücken, wurde der OpuAA Lösung 1 mM DTT zugesetzt. Nachfolgend wurde das Monomer der

OpuAA-Mutanten durch GPC isoliert. In der GPC wurde ein für das native OpuAA typischer Monomer und Dimer Peak detektiert und implizierte eine Neutralität der Cysteine bezüglich dem Monomer-Dimer Gleichgewicht.

Zum Nachweis der Funktionalität der Cystein-Mutanten wurde die ATPase Aktivität des Monomers in Gegenwart von 1 M NaCl und 5 mM ATP/Mg²⁺ analysiert. Unter diesen Bedingungen wurde für das native OpuAA ATPase Aktivität detektiert (Kapitel 3.4.1). Natives OpuAA zeigte einen ATP-Verbrauch von $1,1 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ und die Cystein-Mutanten S45C und G161C eine diesem Wert vergleichbare Aktivität von $2,8 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ bzw. $0,7 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ (Abb. 3.7.2 C). Dieses Ergebnis zeigte den minimalen Einfluss der Cystein-Substitution an den Positionen S45 und G161 auf die Funktionalität von OpuAA.

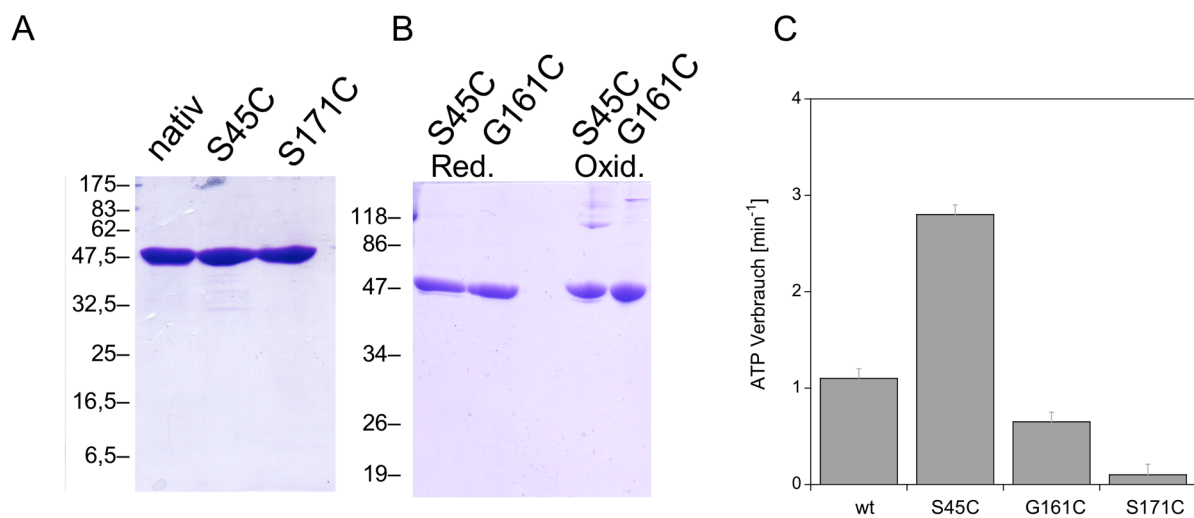


Abb. 3.7.2: Analyse der Cystein-Mutanten S45C, G161C und S171C. **A und B:** Die vereinigten IMAC Elutionsfraktionen der zytosolischen Proteinfraction von *E. coli* BL21(DE3) pBAD33/OpuAA-His₆, /OpuAA-His₆ S45C, /OpuAA-His₆ S171C und /OpuAA-His₆ G161C wurden durch 15 %ige SDS-PAGE analysiert (CBB Färbung, Markerproteine in kDa, rechte Hälfte B oxidierende Bedingungen während der PAGE). **C:** ATPase Aktivität des monomeren OpuAA in Gegenwart von 1 M NaCl und 5 mM ATP/Mg²⁺. Der ATP Verbrauch wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

Für OpuAA S171C wurde nur eine marginale ATPase Aktivität von $0,1 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ nachgewiesen (Abb. 3.7.2 C). Im Modell von OpuAA (Abb. 3.7.1) wurde ersichtlich, dass sich Serin 171 in der C-Schleife von OpuAA befindet. In mehreren Publikationen wurde sowohl strukturell (Smith *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003), als auch biochemisch (Fetsch & Davidson, 2003) eine Beteiligung des entsprechenden Serins in der C-Schleife an der Komplexierung von ATP gezeigt. Diese Daten bezogen sich andererseits auf das NBD Dimer. Es war daher überraschend, dass das OpuAA Monomer durch Substitution des entsprechenden Serin eine deutliche Reduktion der ATPase Aktivität aufwies. Ein Erklärungsversuch dieser widersprüchlichen Daten könnte in einer hohen konformellen Flexibilität der Signaldomäne liegen. Die C-Schleife könnte dadurch potentiell an der Komplexierung des ATP sowohl im

monomeren, als auch im dimeren OpuAA beteiligt sein. Im Hinblick auf diese ungeklärten Fragen wurde für weitere Untersuchungen auf die Cystein-Mutante S171C verzichtet.

3.7.3 Markierung der Cystein-Mutanten des OpuAA mit Fluorophoren

Für FRET-Messungen wurden die Cystein-Mutanten des OpuAA mit den modifizierten Fluorophoren Oregon Green[®] 488 Maleinimid (OG), als Donor-Fluorophor, oder Texas Red[®] C₂ Maleinimid (TR), als Akzeptor-Fluorophor, markiert, die ein geeignetes D/A-Paar bildeten. Die mit der Maleinimidgruppe modifizierten Fluorophore erlaubten eine spezifische und kovalente Markierung der freien Cysteinen unter alkalischen Bedingungen. Die Absorptionseigenschaften der Fluorophore waren gegenüber ihrer direkten molekularen Umgebung sensitiv. Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurde jedoch eine genaue Angabe über den Extinktionskoeffizienten des Farbstoffs benötigt, wenn dieser an OpuAA kovalent gebunden waren. Um diesen Wert zu ermitteln, wurden OG oder TR mit einem 10 fachen molaren Überschuss von OpuAA S45C oder OpuAA G161C versetzt. Damit war ein quantitativer Umsatz des Farbstoffes gewährleistet. Absorptionsspektren in Anwesenheit oder Abwesenheit von OpuAA in NaP_i Puffer pH 7,5 wurden aufgezeichnet (Abb. 3.7.3). Sowohl OG, als auch TR wies dabei eine Rotverschiebung von ca. 10 nm bei Bindung des Fluorophors an OpuAA auf, wobei der Extinktionskoeffizient von TR um das 2 fache zunahm und der Extinktionskoeffizient von OG leicht abnahm (Tabelle 10).

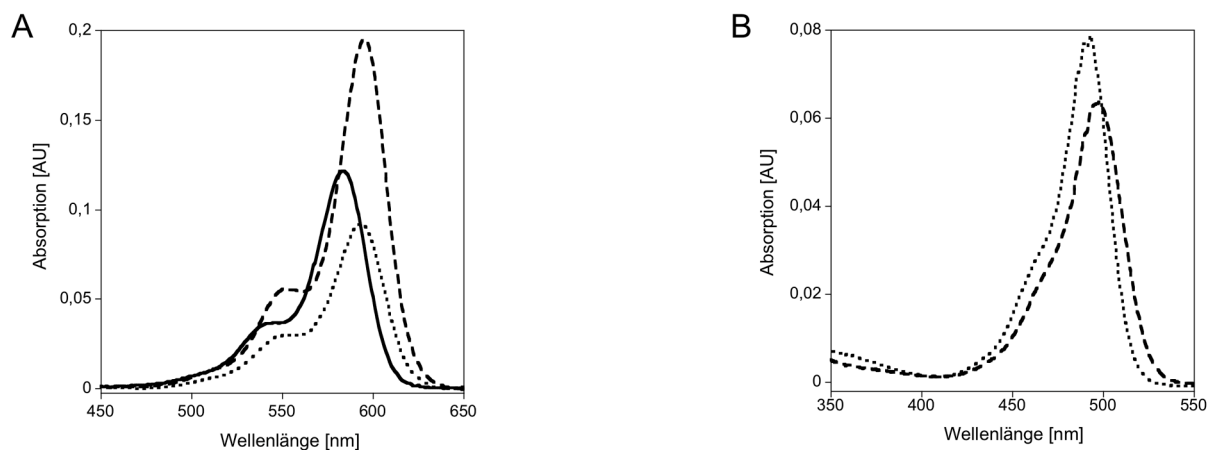


Abb. 3.7.3: Absorptionsspektren von Texas Red[®] (A) und Oregon Green[®] (B) in 10 mM NaP_i, 1 M NaCl, pH 7,5 (gepunktete Linie) und nach Kopplung an OpuAA-His₆S45C (gestrichelte Linie). A: Texas Red in MeOH (durchgezogene Linie).

Für die Markierung der OpuAA-Mutanten wurde das Monomer mit einem 2,5 fachen molaren Überschuss an Fluorophor versetzt, und der freie Fluorophor nach Inkubation über Nacht bei 4 °C mit Hilfe einer PD-10 Entsalzungssäule abgetrennt. Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe eines BCA-Tests bestimmt und die Konzentration des gebundenen Fluorophors unter Berücksichtigung der in Tabelle 10

angegebenen Werte durch Absorptionsmessung bestimmt. Die Markierungseffizienz von OpuAA G161C lag bei etwa 50 % (Fluorophor/OpuAA) und für OpuAA S45C bei etwa 60 % (Fluorophor/OpuAA). Da für die FRET-Messungen eine quantitative Kopplung notwendig war (Kapitel 4.3), erforderte dies eine Abtrennung des nicht-markierten OpuAA von markiertem OpuAA. Dafür wurden die Ladungseigenschaften der Fluorophore ausgenutzt: OG war einfach negativ geladen; somit war eine Abtrennung von unmarkiertem OpuAA durch eine Anionen-Austauschchromatographie (AAC) prinzipiell möglich. TR war zwitterionisch, jedoch wurde auch in diesem Fall eine Trennung durch AAC getestet.

Fluorophor gebunden an	ϵ [$\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$] und A_{max} , frei	ϵ [$\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$] und A_{max} , OpuAAS45C	ϵ [$\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$] und A_{max} , OpuAAG161C
Texas Red[®] Lösungsmittel	0,12, 583 nm MeOH	0,19, 595 nm NaP _i , pH 7,5, 1 M NaCl	0,11, 598 nm NaP _i , pH 7,5, 1 M NaCl
Oregon Green[®] Lösungsmittel	0,078, 491 nm NaP _i , pH 9	0,065, 498 nm NaP _i , pH 7,5, 1 M NaCl	0,065, 497 nm NaP _i , pH 7,5, 1 M NaCl

Tabelle 10: Extinktionskoeffizienten (ϵ) und Absorptionsmaxima (A_{max}) von Texas Red[®] und Oregon Green[®] in freier Form und an OpuAA gebunden.

Für die Abtrennung des nicht-markierten OpuAA von markiertem OpuAA mittels AAC wurde parallel zur Abtrennung des freien Fluorophors die NaCl Konzentration des Puffers von 1 M auf 10 mM durch Entsalzung erniedrigt. Anschließend wurde die Probe auf eine HiTrap Q⁺ Säule gegeben. Gebundene Proteine wurden mit einem Gradienten von 10 mM bis 1 M NaCl in Puffer B in 12 SV eluiert. Bei einer Wellenlänge von 216 nm wurden zwei Peaks detektiert, die bei 0,4 M und 0,6 M NaCl eluierten. Ausschließlich der Peak, der bei 0,6 M NaCl eluierte, zeigte eine Absorption an der für den Fluorophor typischen Wellenlänge (491 nm für OG und 592 nm für TR) (Abb. 3.7.4). Dies implizierte eine Trennung von markiertem von unmarkiertem OpuAA. In Übereinstimmung wiesen die Fraktionen dieses Peaks eine Markierungseffizienz von mehr als 95 % auf. Damit wurde markiertes OpuAA erfolgreich isoliert und konnte für FRET-Messungen genutzt werden.

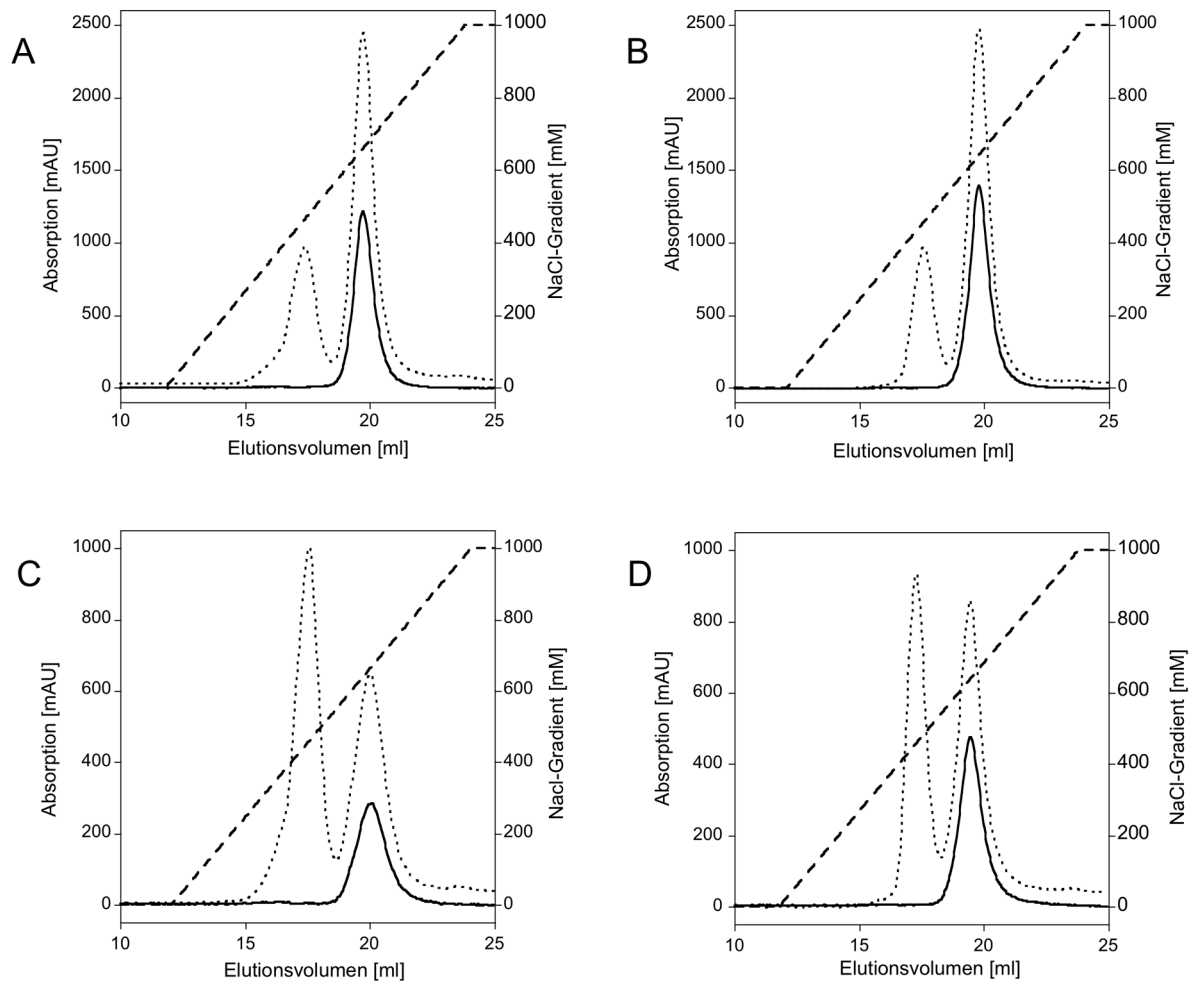


Abb. 3.7.4: Trennung von nicht-markiertem und markiertem OpuAA-OG bzw. -TR durch einen NaCl Gradienten (gestrichelte Linie) in einer AAC. Chromatogramm der Elution von OpuAA(S45C)/OG (A), OpuAA S45C-TR (B), OpuAA G161C-OG (C) und OpuAA G161C-TR (D) bei 216 nm (gepunktete Linie). Durchgezogene Linie: 491 nm: A und C. 592 nm: B und D.

3.7.4 Konzeption der FRET-Messungen

In dieser Arbeit sollte die räumliche Orientierung der Monomere im homo-dimeren OpuAA mittels FRET, dem strahlungslosen Energietransfer eines in Resonanz stehenden D/A-Paares, bestimmt werden. Dazu wurde jeweils eine Untereinheit mit Donor bzw. Akzeptor an einer einzigen Position markiert. Nach Assemblierung des Homodimers sollte dann der FRET-Transfers (ΔF) des D/A-Paares durch Messung der Fluoreszenz am E_{\max} des Donors bestimmt werden. Der FRET-Transfer ist die Differenz der Fluoreszenz in Abwesenheit (F^D) und Anwesenheit von Akzeptor ($F^{D/A}$). Der E_T -Wert, als Maß für die räumliche Distanz der Fluorophore, ist das Verhältnis von FRET-Transfer zu F^D (Gleichung 18 a). Dies erfordert eine vollständige D/A-Paarung in Gegenwart des Akzeptors. Eine unvollständige Paarung des Donors in Gegenwart des Akzeptors, durch einen zusätzlichen Term F^{D^*} symbolisiert,

resultiert in einer apparenten Erniedrigung des E_T -Wertes (Gleichung 18 b); ein Überschuss an Akzeptor beeinflusst den E_T -Wert dagegen in erster Näherung nicht.

$$E_T = 1 \square \frac{F^{D/A}}{F^D} = \frac{F^D \square F^{D/A}}{F^D} \quad \text{Gleichung 18 a}$$

$$E_T^{app} = 1 \square \frac{F^{D/A} + F^{D*}}{F^D + F^{D*}} = \frac{F^D \square F^{D/A}}{F^D + F^{D*}} \quad \text{Gleichung 18 b}$$

$$\frac{E_T^{app}}{E_T} = \frac{F^D}{F^D + F^{D*}} < 1$$

Die Assemblierung des homo-dimeren OpuAA erfolgte unter Bedingungen eines dynamischen M-D Gleichgewichtes. Bei stöchiometrischer Verwendung der Fluorophor-markierten Untereinheiten implizierte dies eine statistische Verteilung der Markierungen im Dimer mit 25 Mol-% D/D, 25 Mol-% A/A und 50 Mol-% D/A. Darüber hinaus existierte gemäß dem Massenwirkungsgesetz ein Monomer Anteil, der sich aus 50 Mol-% aus Donor und 50 Mol-% Akzeptor zusammensetzte. Damit war der Donor unvollständig mit Akzeptor gepaart und der gemessene apparente E_T -Wert erniedrigt. Der apparente E_T -Wert könnte durch komplexe Korrekturen angepasst werden; dieses Verfahren ist jedoch sehr fehlerbehaftet (Kapitel 4.3.1). Somit musste eine Möglichkeit entwickelt werden, den E_T -Wert direkt, d.h. ohne Korrekturen, zu bestimmen. Dabei war es zwingend den Anteil an ungepaartem Donor soweit zu erniedrigen, dass er keinen signifikanten Einfluss auf den E_T -Wert ausübte. Zunächst war es plausibel, das OpuAA Monomer durch einen GPC Schritt abzutrennen. Darüber hinaus war die Verwendung des Akzeptor-markierten Monomers in Überschuss zu dem Donor-markierten Monomer bei der Assemblierung des Dimers eine geeignete Strategie. So konnte z.B. bei einem 9 fachen molaren Überschuss des Akzeptor-markierten Monomers eine theoretische Paarung von 95 Mol-% aller Donor-markierten Monomere mit 1 Mol-% D/D, 81 Mol-% A/A und 18 Mol-% D/A im Dimer erreicht werden. Damit wurde das Verhältnis $E_T^{app}/E_T = 0,95$.

Andererseits konnte der hohe Überschuss des Akzeptor-Fluorophors in der zu untersuchenden Probe zu einer apparenten Erhöhung des E_T -Wertes durch strahlungsabhängige Prozesse führen. Diese Prozesse treten auf, da der Akzeptor im Bereich der Anregungs- und der maximalen Emissionswellenlänge des Donors absorbiert und so eine Erniedrigung der Donor-Fluoreszenz auf Grund von Reabsorption oder erniedrigter Anregungsintensität bewirkt (Lakowicz, 1999). Dies führt zu einem artifiziellen, d.h. strahlungsabhängigen FRET-Transfer. Andererseits sind diese Prozesse von der Konzentration des Akzeptor-Fluorophors in der zu untersuchenden Probe abhängig. Damit bestand die Möglichkeit einen Konzentrationsbereich zu bestimmen, in dem kein artifizieller FRET-Transfer auftrat. In Kontrollversuchen wurden daher Bedingungen gewählt, unter denen ein strahlungsloser

FRET-Transfer ausgeschlossen werden konnte. Zunächst wurde das Emissionsspektrum einer OpuAA S45C-OG Probe, in einer Konzentration von 50 nM, in Anwesenheit oder Abwesenheit eines 9 fachen Überschusses an TR aufgezeichnet (Abb. 3.7.5 A). Anschließend wurde die Emission von 450 nM TR in Abwesenheit von OpuAA S45C-OG aufgezeichnet. Ein Vergleich der Spektren zeigte keine Erniedrigung der Donor-Fluoreszenz durch die Anwesenheit von TR. In einem zweiten Kontrollversuch wurde das freie TR durch OpuAA S45C-TR ersetzt. OpuAA S45C-OG, in einer Konzentration von 50 nM, wurde entweder mit 450 nM nativen OpuAA oder 450 nM OpuAA S45C-TR versetzt. Parallel wurde 450 nM OpuAA S45C-TR mit 50 nM nativen OpuAA versetzt. In allen Proben wurde die Assemblierung des Dimers vermieden, so dass ein strahlungsloser FRET-Transfer durch D/A-Paarung im Dimer ausgeschlossen werden konnte. Die Emissionsspektren aller drei Proben wurden aufgezeichnet (Abb. 3.7.5 B) und auch hier zeigte ein Vergleich der Spektren keine Erniedrigung der Donor-Emission durch die Anwesenheit von OpuAA S45C-TR. Das Ergebnis beider Kontrollversuche demonstrierte die Abwesenheit eines artifiziellen FRET-Transfers unter den gewählten Konzentrationsbedingungen des Akzeptors. Im Einklang damit wurde für alle FRET-Untersuchungen ein 9 facher Überschuss an TR eingesetzt und eine OpuAA Gesamtkonzentration von 0,5 μ M nicht überschritten. Damit konnte eine apparente Erhöhung des E_T -Wertes in den folgenden Experimenten ausgeschlossen werden.

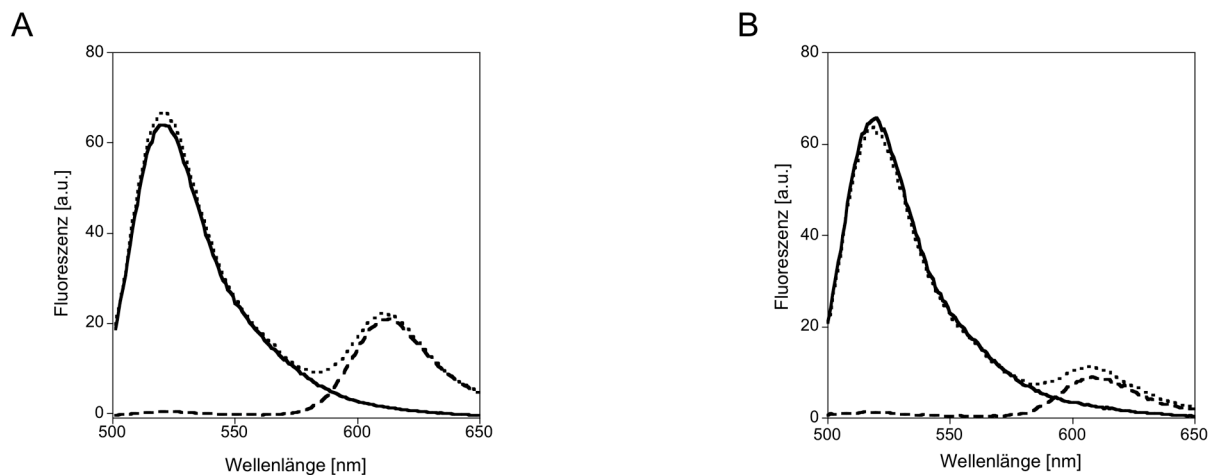


Abb.3.7.5: Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm. **A:** 50 nM OpuAA S45C-OG (durchgezogene Linie). 450 nM TR in Abwesenheit (gestrichelte Linie) oder Gegenwart von 50 nM OpuAA-His₆S45C-OG (gepunktete Linie). **B:** 0,5 μ M OpuAA S45C-OG/OpuAA (1:9) (durchgezogene Linie). 450 nM OpuAA S45C-TR in Gegenwart von 50 nM OpuAA (gestrichelte Linie) oder 50 nM OpuAA S45C-OG (gepunktete Linie).

3.7.5 FRET-Untersuchungen

Für FRET-Untersuchungen der Fluorophor-markierten OpuAA Mutanten wurden zunächst drei Proben verglichen: OpuAA-OG in Gegenwart oder Abwesenheit von OpuAA-TR, sowie OpuAA-TR in Abwesenheit von OpuAA-OG. In Abwesenheit des entsprechenden Partners wurde die Probe mit nativem OpuAA komplementiert. Zunächst wurden die OpuAA Mutanten, sowie natives OpuAA gemäß dem in Tabelle 11 aufgeführten Schema unter Berücksichtigung einer 1:9 Stöchiometrie kombiniert. Bei der gewählten Gesamtkonzentration von 0,5 μM in LS Puffer lag OpuAA vorherrschend in monomerer Form vor (Kapitel 3.3). Eine Assemblierung des dimeren OpuAA mit statistischer Verteilung der D/A-Markierungen wurde durch Konzentrierung der Probe erreicht. Hierfür wurden die Proben auf 0,8 M NaCl eingestellt, auf 10 μM konzentriert und für 3 Tage bei 4 °C inkubiert. Diese Bedingungen verringerten eine Aggregation des TR-markierten OpuAA; andererseits war eine Assoziation des Dimers möglich. Anschließend wurden die Proben einem GPC Schritt in HS Puffer unterzogen. OpuAA Monomer und Dimer eluierten in einem Verhältnis von 5:1. Die Fraktionen, die dimeres OpuAA enthielten, wurden vereinigt und für alle FRET-Messungen um den Faktor 5 verdünnt. Damit war sichergestellt, dass eine OpuAA Konzentration von 0,5 μM nicht überschritten wurde (Kapitel 3.7.4).

	S45C-OG 50 nM	G161C-OG 50 nM	Nativ 50 nM
S45C-TR 450 nM	S45C-OG/S45C-TR	G161C-OG/S45C-TR	Nativ/S45C-OG
G161C-TR 450 nM	-	G161C-OG/G161C-TR	Nativ/G161C-TR
Nativ 450 nM	S45C-OG/Nativ	G161C-OG/Nativ	-

Tabelle 11: Kombinationen von nativem OpuAA und der Cystein-Mutanten S45C oder G161C mit Fluorophormarkierungen für FRET-Untersuchungen.

Emissionsspektren von 500-650 nm bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm wurden aufgezeichnet. Zunächst wurde die OpuAA Proben S45C-OG/S45C-TR, S45C-OG/Nativ und Nativ/S45C-TR im Nukleotid-freien Zustand untersucht. Die Spektren der Proben, in denen nur ein Fluorophor vorhanden war, wurden summiert und mit dem Spektrum der Probe verglichen, die beide Fluorophore enthielt. Dabei wurde eine Abnahme der Donor-Fluoreszenz in Gegenwart von Akzeptor detektiert und implizierte einen FRET-Transfer (Abb. 3.7.6 A). Um die Authentizität des FRET-Transfers zu demonstrieren, wurde der Zerfall des Dimers durch Zugabe von 10 mM ADP/Mg²⁺ induziert (Kapitel 3.3), und damit Bedingungen generiert, unter denen ein FRET-Transfer aufgehoben werden musste. Ein Vergleich der Spektren dieser internen Kontrolle zeigten keine Erniedrigung der Donor-

Fluoreszenz in Gegenwart des Akzeptors (Abb. 3.7.6 B). Dieses Ergebnis demonstrierte die Spezifität des FRET-Transfers durch strahlungslosen Energietransfer des D/A-Paares im OpuAA Dimer, da ein Zerfall des Dimers die Erniedrigung der Donor-Fluoreszenz aufhob.

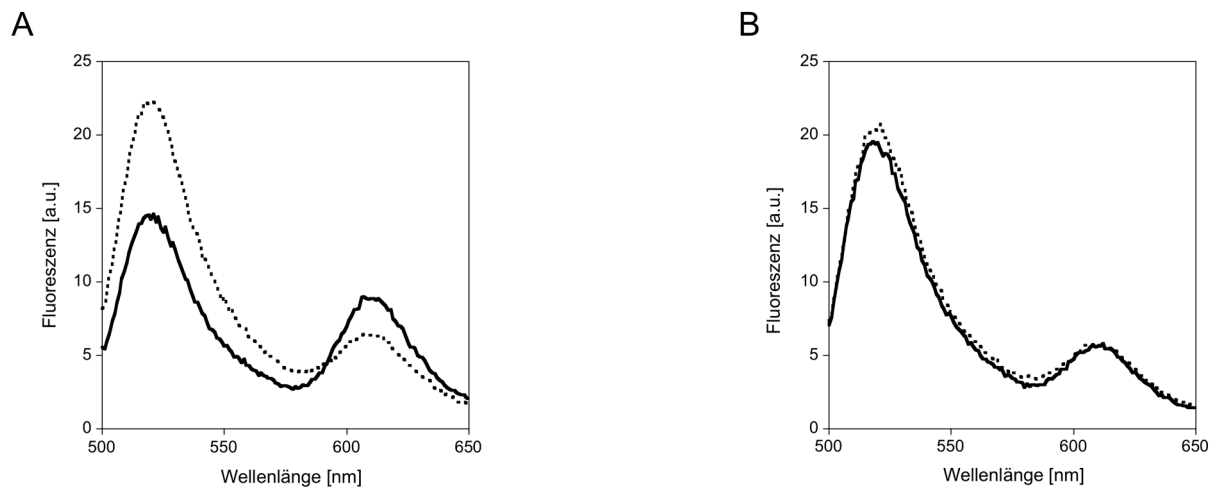


Abb. 3.7.6: Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm von Fluorophor-markiertem dimeren OpuAA S45C-OG/S45C-TR (gepunktete Linie) und OpuAA S45C-OG/nativ + OpuAA nativ/S45C-TR. Die Spektren wurden summiert. (durchgezogene Linie). **A:** Nukleotid-frei. **B:** Nach Inkubation mit 10 mM ADP/Mg²⁺ für 2 h.

Die TR-markierte OpuAA-Mutante G161C zeigte in der GPC ein hohes Maß an Aggregation. Als Konsequenz konnten die Fluorophor-markierten Proben ohne vorherige exakte Bestimmung der Konzentration nicht direkt miteinander verglichen werden. Es zeigte sich, dass dieses Vorgehen sehr fehlerbehaftet war (Kapitel 4.3.1). Andererseits konnte der E_T -Wert einer (OpuAA)₂-OG/TR Probe ohne exakte Kenntnis der Proteinkonzentration durch eine zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung unter Bedingungen des Dimer-Zerfalls bestimmt werden. Während bei $t = 0$ maximaler FRET-Transfer gegeben war, war bei $t = \infty$ der Dimer zerfallen und ein Endzustand erreicht, in dem kein FRET-Transfer stattfand. Dies ermöglichte die Berechnung des E_T -Wertes gemäß den Gleichungen 16 a und b.

Hierzu wurde das D/A-markierte OpuAA Dimer (G161C)₂-OG/TR mittels GPC isoliert und durch Zugabe von 10 mM ADP/Mg²⁺ ein Zerfall des Dimers induziert. Im direkten Anschluss an die Zugabe von ADP/Mg²⁺ wurde die Fluoreszenz am Emissionsmaximum des Donors in Intervallen von 5 s gemessen (Abb. 3.7.7 A). Die Fluoreszenz stieg in Abhängigkeit von der Zeit mit einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung an und strebte einem Sättigungswert entgegen. Ein solcher Verlauf ist z.B. für die Zerfallskinetik eines Dimers typisch. Als ein Kontrollexperiment wurde die Monomer-Fraktion derselben Probe unter identischen Bedingungen analysiert (Abb. 3.7.7 A). Hier blieb die Fluoreszenz über die Messdauer konstant. Diese Ergebnisse implizierten einen ADP/Mg²⁺ induzierten Zerfall des D/A-Dimers; dabei führte die Abnahme des FRET-Transfers zu einem Anstieg der Donor Fluoreszenz. Mit Gleichung 16 a konnte die Amplituden und die Halbwertszeiten des Zerfalls für die drei

Dimer Kombinationen angepasst werden: (S45C)₂-OG/TR: $22,0 \pm 0,3$ min; G161C-OG/S45C-TR: $20,7 \pm 0,1$ min; (G161C)₂-OG/TR: $12,9 \pm 0,1$ min. Gemäß der Gleichung 16 b konnte aus den Amplituden des zeitlichen Verlaufs der E_T-Wert berechnet werden (Abb. 3.7.7 B). Der strikte monoexponentielle Verlauf der Fluoreszenz erlaubte eine Extrapolation des E_T-Wertes auf den Zeitpunkt der ADP/Mg²⁺ Zugabe bei t= 0 und damit auf den Nukleotid-freien Zustand des OpuAA Dimers. Für die drei Dimer Kombinationen wurden folgende E_T-Werte und Fluorophor-Distanzen berechnet: (S45C)₂-OG/TR: 30 % und 60 Å; G161C-OG/S45C-TR: 47 % und 52 Å, (G161C)₂-OG/TR: 49 % und 51 Å. In Kapitel 4.3 wird auf Grundlage dieser Distanzen ein Modell für das OpuAA Dimer im Nukleotid-freien Zustand entwickelt.

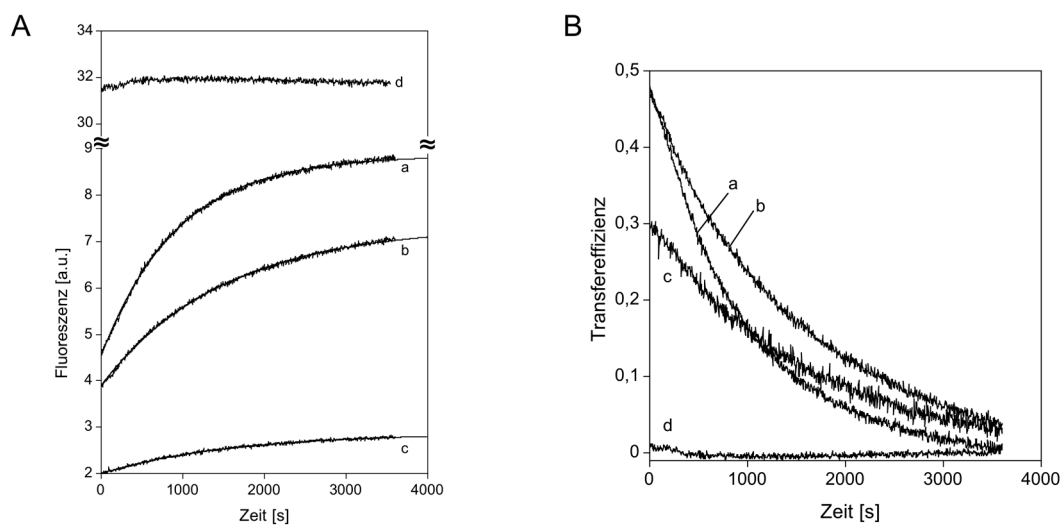


Abb. 3.7.7: FRET-Messungen. **A:** Zeitlicher Verlauf der Donor-Fluoreszenz bei 519 nm von dimerem (a) oder monomerem (d) OpuAA G161C-OG/G161C-TR, dimerem OpuAA G161C-OG/S45C-TR (b) und dimerem S45C-OG/S45C-TR (c). Die Anpassung der Daten erfolgte gemäß Gleichung 16 a. **B:** zeitlicher Verlauf der Transfereffizienz. a-d: siehe A. Die Fluoreszenzdaten aus A wurden gemäß Gleichung 16 b analysiert.

Identische Experimente wurden durchgeführt, wobei ADP durch ATP ersetzt wurde. In allen untersuchten Proben zeigte sich nach Nukleotid Zugabe ein Anstieg der Fluoreszenz, der im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten einen niedrigeren Amplitudenwert erreichte (Abbildung nicht gezeigt). Im Einklang mit dem in Kapitel 3.3 untersuchten Einfluss von Nukleotiden auf das Monomer-Dimer Gleichgewicht, war es plausibel, dass ATP partiell hydrolysiert war und einen partiellen Zerfall des Dimers induzierte.

4 Diskussion

4.1 Affinität und Selektivität der Ligandbindung von OpuAC

Substrat-Bindeproteine (SBPs) sind ein essentieller Bestandteil vieler bakterieller ABC-Transporter. Ihr Vermögen strukturell unterschiedliche niedermolekulare Substanzen wie z.B. Zucker, Aminosäuren oder Vitamine durch Variation der Substrat-Bindetasche auf Grundlage einer generellen Proteinarchitektur mit hoher Affinität und Selektivität zu binden, ist faszinierend. In dieser Arbeit wurde die Struktur von OpuAC, dem SBP des OpuA Transporters, im Komplex mit Glycin-Betain (GB) oder Prolin-Betain (PB) gelöst. OpuAC zeigte eine SBP-typische Klasse II Faltung (Quioco & Ledvina, 1996), in der zwei globuläre Domänen über eine aus zwei Peptidsegmenten bestehende Gelenkregion miteinander verbunden waren. Die globulären Domänen setzten sich aus jeweils zwei zentralen β -Faltblättern zusammen, die von mehreren β -Helizes flankiert waren. Das Substrat war in einer Spalte zwischen den beiden Domänen lokalisiert und wurde von einer Ansammlung aus drei Tryptophanresten komplexiert. Die planaren Indolringe der Tryptophane 72 und 225 standen rechtwinklig zueinander, während der Indolring des dritten Tryptophan 178 diese Geometrie zu einem Prisma überbrückte. Die Architektur dieses „Tryptophan-Prismas“ war geeignet, die delokalisierte, positive Ladung der quartären Ammoniumgruppe der Liganden über kationische- π und van-der-Waals Interaktion zu komplexieren. Zusätzlich zu diesen Interaktionen wurde die Carboxylatgruppe der Liganden durch das Histidin 230 und die Amidprotonen von Glycin 26 und Isoleucin 27 über Wasserstoffbrücken gebunden. Kürzlich wurde die Struktur von ProX, dem SBP des osmoreaktiven Transporters ProU aus *E. coli*, im Komplex mit GB oder PB beschrieben und zeigte ähnliche Bindungswechselwirkungen mit den Liganden (Schiefner *et al.*, 2003). Die an der Koordination der Liganden beteiligten drei Tryptophanreste hatten im Fall von ProX jedoch eine unterschiedliche Geometrie: Zwei Indolgruppen waren parallel und standen im rechten Winkel zu der dritten Indolgruppe. Die Autoren bezeichneten eine solche Architektur als „Tryptophan-Box“. Die Zahl der interatomaren Kationen- π Interaktionen mit einer Distanz von weniger als 4 Å zwischen GB und der Tryptophan-Ansammlung in ProX und OpuAC unterschied sich. Während in OpuAC/GB 29 solcher Bindungswechselwirkungen gezählt wurden, gab es in ProX/GB lediglich 18 davon. Der K_D -Wert von OpuAC/GB wurde im Vergleich zu ProX/GB Komplexen dadurch jedoch nicht erniedrigt; beide Komplexe hatten ähnliche K_D -Werte im niederen mikromolaren Bereich. Andererseits konnte durch Alanin Substitution einzelner Tryptophanreste in ProX eine Korrelation des K_D -Wertes mit der Zahl der Kationen- π Interaktionen gezeigt werden

(Schiefner *et al.*, 2003). Der OpuAC/PB Komplex hatten im Vergleich zu dem OpuAC/GB Komplex einen 15 fach höheren K_D -Wert und wies im Einklang damit auch eine erniedrigte Zahl an Kationen- π Kontakten auf. Andererseits wurden die 12 Kationen- π Interaktionen von OpuAC/PB durch weitere 15 van-der-Waals Interaktionen ergänzt. Unter der Voraussetzung, dass beide Interaktionstypen einen gleichen Beitrag an freier Bindungsenthalpie leisten, musste es daher einen weiteren Faktor geben, der die Affinität der Komplexe bestimmt. Hierfür kamen die Wasserstoffbrücken zwischen dem Carboxylat des Liganden und His230 bzw. den Amidprotonen von Gly26 und Ile27, sowie die Wasserstoffbrücke zwischen Trp178 und Asp22 in Betracht. Ein besonderes Kennzeichen dieser Wasserstoffbrücken war ihre Fähigkeit, die beiden globulären Domänen direkt bzw. indirekt mit Hilfe des Liganden zu überbrücken.

Die Strukturen einer Reihe von SBPs wurde in Gegenwart und Abwesenheit von Liganden gelöst (Mowbray & Petsko, 1983; Pflugrath & Quioco, 1988; Milburn *et al.*, 1991; Mowbray & Cole, 1992). In Abwesenheit von Liganden war die Spalte zwischen den beiden globulären Domänen weit geöffnet. Im Gegensatz dazu zeigten SBP Strukturen im Komplex mit Ligand eine Reorientierung der beiden globulären Domänen relativ zueinander, die eine Schließung der Spalte zur Folge hatte, so dass der gebundene Ligand von der wässrigen Umgebung abgeschirmt wurde. Dies implizierte einen Ligand-induzierten konformellen Wechsel der SBPs, der im Einklang mit den strukturellen Daten durch eine Reihe biochemischer Daten bewiesen werden konnte (Zukin *et al.*, 1977; Miller *et al.*, 1983; Martineau *et al.*, 1990). Diese Konformationen fanden in der Literatur als „offene“ und „geschlossene“ Konformation Eingang, und der Mechanismus des Übergangs wurde mit dem einer Venus-Fliegenfalle verglichen (Mao *et al.*, 1982). In Abwesenheit von Ligand war die „offene“ Konformation der SBPs bevorzugt, während in Anwesenheit von Ligand die „geschlossene“ Konformation die vorherrschende konformelle Spezies war. Diese Daten implizierten einen Mechanismus, in dem der Ligand in der offenen Konformation des SBP zunächst mit niedriger Affinität gebunden wurde. Die beiden Domänen verschlossen nachfolgend die Spalte, so dass der Ligand dann in der geschlossenen Konformation mit hoher Affinität gebunden war (Ledvina *et al.*, 1998; Davidson, 2002). Danach bestimmte die thermodynamische Stabilität der geschlossenen Konformation des SBP die Affinität des SBP/Ligand Komplexes.

Ein solcher Mechanismus war auch für OpuAC plausibel. In der Struktur des OpuAC/GB Komplexes waren beide globuläre Domänen in räumlicher Nähe und implizierten eine geschlossene Konformation von OpuAC. Die an dem Aufbau der Substrat-Bindetasche beteiligten Tryptophane 72, 178 und 225 waren auf beiden Domänen lokalisiert. So konnte, nach Bindung des Liganden, ein Netzwerk aus Kationen- π bzw. van-der-Waals Interaktionen entstehen, das beide Domänen überbrückte. Ebenso führte das Wasserstoffbrücken-Netzwerk der Carboxylatgruppe des Liganden mit den Amidprotonen von Gly26 bzw. Ile27

aus Domäne 1 und mit His230 aus Domäne 2 zu einer stabilen Assoziation der beiden Domänen. Während für OpuAC/GB optimale Distanzen der Wasserstoffbrücken vorlagen, war in OpuAC/PB die Distanz der Wasserstoffbrücke zwischen His230 und der Carboxylatgruppe von 2,8 Å auf 4,8 Å erweitert. Eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen dem Carboxylat von Aspartat 22 aus Domäne 1 und der Indolgruppe von Tryptophan 178 aus Domäne 2 wurde identifiziert, die beide Domänen direkt überbrückte. Auch in diesem Fall war die Distanz der Wasserstoffbrücke in der OpuAC/PB Struktur von ihrer optimalen Länge in OpuAC/GB von 2,8 Å um 1,6 Å erweitert. Ein ähnlicher Effekt wurde für die Wasserstoffbrücken zwischen Tryptophan 76 aus Domäne 1 und Aspartat 179 aus Domäne 2, sowie dem Amidsauerstoff von Glycin24 aus Domäne 1 und der Hydroxygruppe von Tyrosin 233 aus Domäne 2 beobachtet. Diese strukturellen Befunde eröffnen eine Hypothese, der zufolge die thermodynamische Stabilität der geschlossenen Konformation über die Distanzen und damit den Energiebeitrag der betreffenden Wasserstoffbrücken reguliert wäre. Diese Hypothese gibt eine plausible Begründung für die signifikanten Unterschiede in der Affinität von OpuAC/GB Komplexen ($K_D = 17 \pm 2 \mu\text{M}$) und OpuAC/PB Komplexen ($K_D = 295 \pm 17 \mu\text{M}$).

In diesem Zusammenhang bleibt offen, warum GB oder PB mit unterschiedlicher Affinität gebunden wurden, obwohl sie gleiche strukturelle Motive besitzen. Um die Frage nach der Selektivität zu beantworten, wurden die Strukturen von OpuAC/GB und OpuAC/PB überlagert. Dabei zeigte sich eine unterschiedliche Orientierung der quartären Ammoniumgruppe von GB und PB im „Tryptophan-Prisma“. Beide Liganden waren andererseits in ein individuelles Netzwerk von Kationen- π oder van-der-Waals Interaktionen eingebettet, so dass die relative Orientierung der einzelnen Tryptophane variierte. In OpuAC/GB war z.B. die Wechselwirkung zwischen Trp178 und GB ausgeprägt und bewirkte eine optimale Positionierung von Trp178 für die Ausbildung der Wasserstoffbrücke mit Asp22. Im Fall von PB war dies nicht gegeben. Auch die Distanz der Wasserstoffbrücke zwischen Trp76 und Asp179 könnte durch die Positionierung von Trp178 indirekt beeinflusst werden. Die Lage des Liganden im „Tryptophan-Prisma“ bestimmte auch die Orientierung der Carboxylatgruppe, die an der Ausbildung des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes mit His230 bzw. Gly26 und Ile26 beteiligt war. Einer zweiten Hypothese zufolge bestimmt das jeweilige Muster der Kationen- π und van-der-Waals Interaktionen die Selektivität der OpuAC/Ligand Bindung durch Variation der relativen Orientierung der Tryptophane. Die Position der Tryptophane könnte dann einen Einfluss auf die Distanz von relevanten Wasserstoffbrücken haben.

Im Hinblick auf den vorgeschlagenen Mechanismus wurde die Bedeutung der Wasserstoffbrücke zwischen Aspartat 22 und Tryptophan 178 durch einen Sequenzvergleich von OpuAC mit weiteren SBPs untersucht. Diese SBPs wurden ausgewählt, da sie in der Datenbank die höchste Identität zu OpuAC hatten und damit potentiell zu osmoreaktiven

ABC-Transportern gehörten. In allen untersuchten SBPs war das entsprechende Aspartat konserviert, und nur in einigen Ausnahmen durch Glutamat konservativ substituiert (Abb. 4.1). Auch das entsprechende Tryptophan war in den untersuchten SBPs hoch konserviert. Interessanterweise zeigten die weiteren an der Bindung von GB beteiligten Aminosäuren einen unterschiedlich hohen Grad an Konservierung (Abb. 4.1): Trp72, sowie Gly26 waren unter den untersuchten SBPs hoch konserviert, während Trp225 und His230 nur mäßig konserviert waren. Die entsprechende Position von Histidin 230 war durch Serin, Glutamin oder Asparagin substituiert, die eine potentielle Wasserstoffbrücke mit dem Carboxylat von GB ausbilden können. Diese Vergleiche unterstützen die Hypothese, der zufolge die Wasserstoffbrücke zwischen Aspartat 22 und Tryptophan 178 als molekularer Schalter fungiert, um die Assoziation und Dissoziation der Domänen zu regulieren.

In der Substrattranslokation wird der Ligand von dem SBP an eine potentielle Bindestelle in der Transmembrandomäne (TMD) weitergegeben (Mitchell, 1990). Die Freisetzung des Liganden impliziert einen Wechsel des SBP von der geschlossenen in die offene Konformation. Für das SBP des Maltose-Transporters, MBP, wurden Regionen auf beiden globulären Domänen identifiziert, die mit den beiden Untereinheiten der TMD, MalF und MalG, potentiell interagieren (Dean *et al.*, 1992; Hor & Shuman, 1993). Ähnliche Daten wurden auch für den Histidin-Transporter (Liu *et al.*, 1999,a) erhalten und den Vitamin B₁₂-Transporter (Borths *et al.*, 2002) postuliert. Bei einem Konformationswechsel des SBPs würden die Untereinheiten der TMD ihre relative Orientierung zueinander verändern. Dies gilt auch für den umgekehrten Fall. Für den rekonstituierten Maltose-Transporter bewirkte die Anwesenheit des Ligand-beladenen SBP eine Stimulation der ATPase Aktivität (Davidson *et al.*, 1992). Im katalytischen Übergangszustand des Komplexes, der mit Hilfe von Vanadat stabil isoliert wurde, war das SBP fest an die TMD assoziiert und hatte seinen Liganden jedoch verloren (Chen *et al.*, 2001). Diese Daten zeigten erstmals eine Kopplung der ATPase Aktivität mit einer Wechselwirkung des SBP/Ligand Komplexes und der TMD. Der Verlust des Liganden implizierte dabei einen Konformationswechsel des SBP von einem geschlossenen in einen offenen Zustand, der durch die SBP/TMD Interaktion induziert wurde. Andererseits konnte für die Histidin-Permease (Petronilli & Ames, 1991) und den Maltose-Transporter (Mannering *et al.*, 2001) eine Entkopplung der ATPase Aktivität von der Interaktion mit Ligand-beladenen SBP gezeigt werden, wenn die TMD spezielle Mutationen trug. Diese Daten gaben Evidenzen, dass eine Konformationsänderung in der TMD zur Vermittlung eines Signals zwischen SBP und NBD genutzt wird. In diesem Zusammenhang bleibt jedoch unbeantwortet, ob die Hydrolyse von ATP einen Konformationswechsel in dem SBP induziert oder im umgekehrten Fall ein Konformationswechsel des SBP ein Signal für die TMDs darstellt, um die ATP Hydrolyse einzuleiten. Der OpuA Transporter aus *L. lactis* ist ein seltenes Beispiel für eine Fusion des SBP mit der TMD (van der Heide & Poolman,

2002). Poolman und Mitarbeiter haben die mechanistische Bedeutung von zwei SBPs im OpuA Translokationskomplex mit Hilfe von hetero-oligomeren OpuA Komplexen, mit nur einem SBP oder einer funktionellen Inaktivierung eines der beiden SBPs, untersucht (Biemans-Oldehinkel & Poolman, 2003). Diese Daten implizierten eine kooperative Interaktion der beiden SBPs auf Stufe der Assoziation von SBP und TMD oder der Weitergabe des Substrates an die TMD. Für den Transportprozess war ein einziges SBP zwar ausreichend, jedoch bewirkte die Gegenwart von zwei SBPs aufgrund der kooperativen Interaktion eine Erhöhung der Transportaktivität (Biemans-Oldehinkel & Poolman, 2003). Diese Aspekte unterstreichen die zentrale Rolle der SBPs in der Funktion der SBP-abhängigen ABC-Transporter.

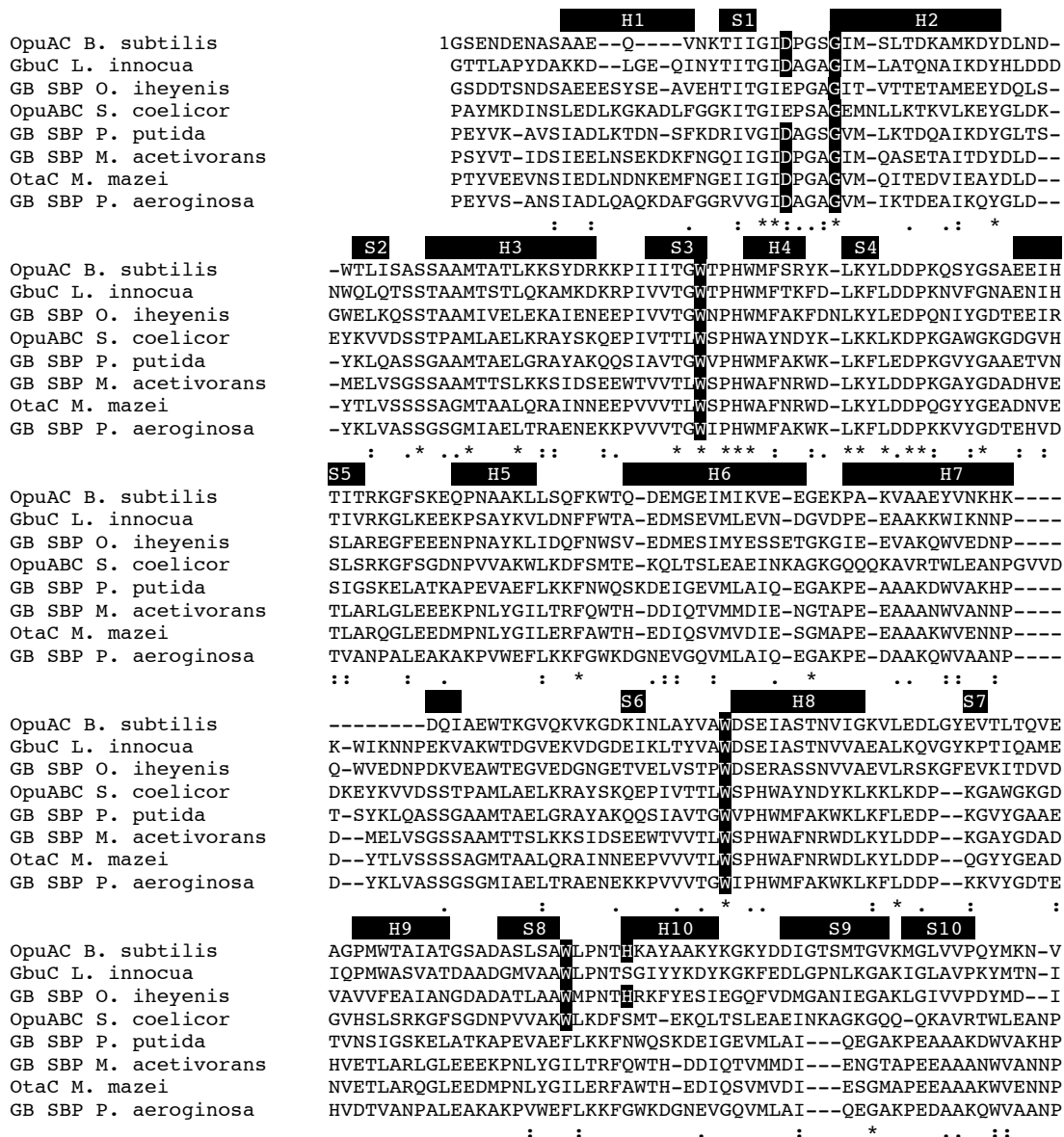


Abb. 4.1: Sequenzvergleich von OpuAC aus *B. subtilis* mit SBPs potentieller osmoreaktiver ABC-Transporter. Wichtige Aminosäuren der Substrat-Bindetasche und D22 sind schwarz unterlegt. Sekundärstrukturelemente von OpuAC sind mit schwarzen Balken angegeben (Nomenklatur siehe Kapitel 3.6.4).

4.2 ATP Bindung und Hydrolyse von OpuAA

B. subtilis ist in seinem natürlichen Habitat häufigen Schwankungen in der Verfügbarkeit von Wasser ausgesetzt (Kempf & Bremer, 1998). Unter hyperosmolaren Bedingungen nimmt die zytosolische Konzentration gelöster Stoffe aufgrund des Ausstroms von Wasser aus der Zelle drastisch zu. Diesem Prozess folgt zunächst der Einstrom von K^+ , um den Turgor zu stabilisieren. K^+ wird jedoch zügig durch kompatible Solute ersetzt, die von OpuA importiert werden. Die NBD des OpuA Transporters, OpuAA, ist ein zytosolisches Protein und interagiert mit seiner TMD. Es wird daher den Veränderungen in der Zusammensetzung und Konzentration der gelösten Stoffe im Zytosol direkt ausgesetzt. Im Hinblick auf die physiologische Rolle von OpuA könnten diese Veränderungen ein Signal zur Aktivierung von OpuA repräsentieren.

4.2.1 Einfluss der Ionenstärke

Um die veränderten Bedingungen im Zytosol zu imitieren, wurde der Einfluss verschiedener Salze in unterschiedlichen Konzentrationen auf die basale ATPase Aktivität des isolierten OpuAA analysiert. Diese Experimente wurden unter Bedingungen der Substratsättigung durchgeführt; die erhaltenen Umsätze entsprachen daher maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{max}). Die ATPase Aktivität des OpuAA wurde mit Erhöhung der Salzkonzentration in linearer Weise stimuliert. Diese Stimulation wurde durch eine Erhöhung der Ionenstärke und nicht der Osmolarität verursacht, da sich das kompatible Solut Glycin-Betain als zwitter-ionische Substanz neutral verhielt. Dabei hatte die Natur des Kations (Na^+ oder K^+) im Vergleich zur Natur des Anions (Cl^- oder P_i^-) einen stärkeren Einfluss auf die Stimulation. Im Vergleich zu Na^+ -Salzen zeigte OpuAA in Gegenwart von K^+ -Salzen eine deutlich höhere basale ATPase Aktivität.

Auch im Fall des OpuA aus *L. lactis* bewirkte eine Erhöhung der Ionenstärke eine Stimulation der ATPase Aktivität (van der Heide *et al.*, 2001). In diesen Experimenten war OpuA in Liposomen rekonstituiert und die Ionenstärke wurde intravesikulär erhöht. Dabei beobachteten Poolman und Mitarbeiter insbesondere einen stimulierenden Effekt von P_i^- -Salzen und sauren Phospholipiden auf die ATPase Aktivität von OpuAA. Aus diesen und anderen Daten haben die Autoren ein Modell vorgeschlagen, in dem eine Erhöhung der Ionenstärke über die mechanische Spannung der Membran, d.h. über eine veränderte Lipid-Protein Interaktion, weitergeleitet wird und zu einer Aktivierung von OpuA führt (van der Heide *et al.*, 2001). In den hier durchgeführten Experimenten wurde die ATPase Aktivität jedoch auch in Abwesenheit von TMD und Membran durch Ionenstärke stimuliert. Damit ist ein Mechanismus, wie er für OpuA aus *L. lactis* vorgeschlagen wurde, für OpuA aus *B.*

subtilis zunächst nicht plausibel, obwohl die hohe Sequenzidentität beider Transporter eine konservierte Funktionsweise beider Transporter impliziert.

Andere Modelle, in denen ein direkter Einfluss der Ionenstärke und/oder K^+ auf die Aktivierung von osmoreaktiven Transportern oder Kinasen postuliert werden, wurden vorgeschlagen (Poolman *et al.*, 2002). Der sekundäre Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* hat hoch geladene N- und C-terminale Erweiterungen, die potentielle Sensoren für die Ionenstärke darstellen (Peter *et al.*, 1998). Ähnlich wie für OpuAA aus *B. subtilis* konnte für das rekonstituierte BetP eine Aktivierung durch K^+ gezeigt werden, wobei die Natur des Anions keinen Einfluss hatte (Rubenhagen *et al.*, 2001). Auch auf die Autokinase Aktivität der osmoregulierten Sensor Kinase EnvZ hatte K^+ einen direkten Einfluss (Jung *et al.*, 2001). Dagegen wurde der Turgor-Sensor KdpD aus *E. coli*, der die Expression des hochaffinen K^+ Aufnahmesystems KdpFABC reguliert, durch eine Erhöhung der Ionenstärke stimuliert und durch K^+ inhibiert (Jung *et al.*, 2000). Diese Daten implizieren eine wichtige Rolle von K^+ , das in Folge der ersten bakteriellen Adaptionsreaktion intrazellulär bis zu sub-molaren Konzentrationen akkumuliert wird (Kempf & Bremer, 1998). Im Fall von OpuAA war K^+ ein Modulator der ATPase Aktivität. Durch Substitution von Na^+ durch K^+ wurde sowohl die Wechselzahl als auch der K_M -Wert erhöht, und der K_M -Wert in den Bereich der zytosolischen ATP Konzentration verschoben. Als eine Konsequenz diese Szenarios lägen 50 % des OpuAA im ATP gebundenen Zustand vor und eine Erhöhung der zytosolischen ATP Konzentration würde zu einer direkten Steigerung der Aktivität führen. Die Modulation der ATPase Aktivität durch K^+ könnten daher einen Mechanismus repräsentieren, um auf hyperosmolaren Stress zu reagieren. Einer Hypothese zufolge, könnte dies auf die Existenz einer potentiellen K^+ Bindestelle im OpuAA hindeuten, die bei Akkumulation von K^+ aktiviert wird und die Aktivität von OpuAA reguliert. Ein solcher K^+ Sensor wurde beispielsweise für BetP (Rubenhagen *et al.*, 2001) und den Turgor Sensor KdpD (Jung *et al.*, 2000) (siehe oben) postuliert.

Neben diesen Modellen, die einen direkten Einfluss der Ionenstärke auf die Aktivität von OpuAA z.B. durch einen K^+ Sensor postulieren, ist auch ein indirekter Einfluss der Ionenstärke auf die OpuAA/Nukleotid Interaktion möglich. Ein solches Erklärungsmodell ist plausibel, denn sowohl das Edukt, $[ATP/Mg]^{2\ominus}$, als auch die Produkte, $[ADP/Mg]^\ominus$ und $[HPO_4^{2\ominus}/H^+]$ bzw. $[H_2PO_4^\ominus]$, sind ionischer Natur und deuten auf potentielle elektrostatische Effekte während der Katalyse hin. In Proteinen spielen elektrostatische Wechselwirkungen häufig nicht nur in der Stabilisierung der Struktur eine große Rolle, sondern sind gerade auch für die enzymatische Funktion z.B. in der Substraterkennung oder der Stabilisierung eines katalytischen Übergangszustandes wichtig (Warshel & Russell, 1984; Matthew, 1985). Eine entscheidende Eigenschaft von elektrostatischen Wechselwirkungen ist ihre Abhängigkeit von der Ionenstärke. Das Grenzgesetz von Debye und Hückel beschreibt, unter der

Annahme von Punktladungen, den Einfluss der Ionenstärke auf das elektrostatische Potential der geladenen Spezies (Debye & Hückel, 1923). Eine Erhöhung der Ionenstärke bewirkt dabei eine Abschirmung bzw. Erniedrigung des elektrostatischen Potentials der ionischen Interaktionspartner und führt zu einer Erniedrigung ihrer Aktivitätskoeffizienten (siehe Appendix, Gleichung XI). Diese Theorie ermöglicht eine phänomenologische Beschreibung von ionischen Interaktionen, die ausgenutzt werden kann, um beispielsweise Informationen über die Architektur der Substrat-Bindetasche oder des Reaktionsmechanismus zu erhalten (Record *et al.*, 1978; Green & Andersen, 1991).

Für v_{\max} gibt es gemäß dem Modell der katalytischen Übergangszustände (Kraut, 1988) keine einfache Erklärung für eine Abhängigkeit von der Ionenstärke (Norby & Esmann, 1997). In erster Näherung kann jedoch über eine potentielle Minimierung repulsiver elektrostatischer Kräfte durch Erhöhung der Ionenstärke spekuliert werden. Solche repulsiven Kräfte können z.B. bei der Hydrolyse von $[\text{ATP/Mg}]^{2\ominus}$ zu $[\text{ADP/Mg/P}]^{3\ominus}$ auftreten, wenn zusätzlich zu den bestehenden negativen Ladungen eine weitere negative Ladung in der Nukleotid-Bindetasche erzeugt wird. In diesem Szenario würde die Kinetik der Reaktion durch eine Veränderung der Aktivierungsenergie oder des energetischen Zustandes der Produkte variiert. Andererseits eignet sich die Abhängigkeit der K_D -Werte von OpuAA/ATP/Mg²⁺ Komplexen von der Ionenstärke, um elektrostatische Interaktionen während der Nukleotid-Erkennung zu quantifizieren (Robinson & Stokes, 1970; Norby & Esmann, 1997). In Gleichgewichtsbindungsexperimenten mit der Nukleotid-sensitiven OpuAA Mutante F19W wurde eine Abnahme des K_D -Wertes mit steigender Na⁺ Konzentration gemessen. Mit Hilfe des Debye-Hückel Grenzgesetzes und dem Massenwirkungsgesetz kann ein linearer Zusammenhang zwischen K_D -Wert und Ionenstärke formuliert werden, dessen Steigung dem Produkt der elektrischen Ladungen von Substrat und Substrat-Bindetasche entspricht (Appendix, Gleichung XII). Die Anwendung des Debye-Hückel Grenzgesetzes ist theoretisch nur für verdünnte Lösungen akkurat; Snyder *et al.* (Snyder *et al.*, 1981) und Norby *et al.* (Norby & Esmann, 1997) zeigten allerdings in ihren Studien, dass eine gute Beschreibung der Daten durch das Debye-Hückel Grenzgesetz bis zu NaCl Konzentrationen von 1 M möglich war. Eine solche Auftragung ergab für das OpuAA Monomer bzw. das Dimer eine Steigung von -1,8 bzw. -1,5 (Abb. 4.2). Unter Berücksichtigung der 2 fach negativen Ladung des Nukleotids, $[\text{ATP/Mg}]^{2\ominus}$, bei pH 7,5 kann daraus eine Nettoladung von -0,9 für die Nukleotid-Bindetasche des Monomers bzw. von -0,75 für das Dimer berechnet werden. Dieses Ergebnis war überraschend, da es eine elektrostatische Repulsion zwischen dem Ligand und der Proteinumgebung zur Konsequenz hat. Es erklärt jedoch, warum die Affinität von OpuAA zu ATP in Abwesenheit von Mg²⁺ stark abnimmt und warum OpuAA eine höhere Affinität zu ADP im Vergleich zu ATP hat. Für die Na⁺/K⁺ ATPase wurden ähnliche Berechnungen durchgeführt (Norby & Esmann, 1997). Im

Gegensatz zu OpuAA wurde dabei eine positive Nettoladung in der Proteinumgebung bestimmt, so dass attraktive Wechselwirkungen zwischen dem Ligand und der Bindetasche herrschten. Andererseits macht ein solches Ergebnis im Hinblick auf die physiologische Rolle von OpuA Sinn. Nur wenn die intrazelluläre Ionenstärke ansteigt wie es z.B. bei hyperosmolarem Stress der Fall ist können diese repulsiven Kräfte neutralisiert werden und eine Bindung von ATP ermöglichen. Ein solcher Mechanismus würde den unnötigen Import von Glycin-Betain unter iso-osmotischen Bedingungen verhindern.

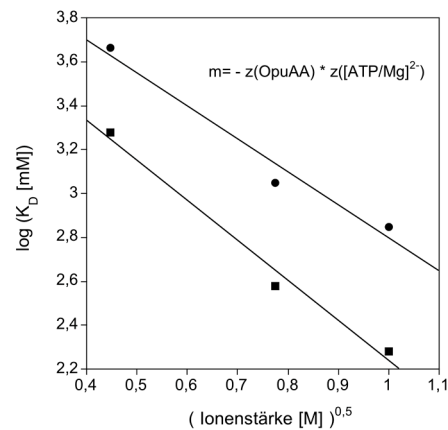


Abb. 4.2: Abhängigkeit der K_D -Werte von OpuAA/ATP/Mg²⁺ Komplexen von der Ionenstärke. Die in Kapitel 3.5 erhaltenen K_D -Werte des Monomers (■) und des Dimers (●) wurden gemäß Gleichung XII (Appendix) gegen die Ionenstärke aufgetragen. Die Steigung der Kurven (m) entspricht dem Produkt der elektrischen Ladungen (z) von Substrat und Substrat-Bindetasche.

4.2.2 ATP Hydrolyse des OpuAA Dimers

Die Ionenstärke war nicht nur ein dominanter Effektor der ATPase Aktivität und der Affinität von OpuAA/Nukleotid Komplexen, sondern modulierte auch entscheidend das Monomer-Dimer Gleichgewicht von OpuAA. Bei NaCl Konzentrationen von etwa 100 mM war eine dynamische Umwandlung von Monomer und Dimer möglich. Andererseits war unter diesen Bedingungen die ATPase Aktivität und auch die Affinität zu Nukleotiden gering. Eine lineare Erhöhung der Ionenstärke resultierte in einer linearen Steigerung der ATPase Aktivität und einer Erniedrigung des K_D -Wertes von OpuAA/Nukleotid Komplexen. Auch die Monomer-Dimer Umwandlung reagierte auf eine Erhöhung der Ionenstärke. Unter Hochsalzbedingungen von 1 M NaCl wurde die Umwandlungszeit der oligomeren Spezies erniedrigt, und als Konsequenz konnten OpuAA Monomer und Dimer getrennt isoliert und analysiert werden. Eine solche getrennte Analyse der oligomeren Spezies von NBDs wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Das Monomer hatte eine basale ATPase Aktivität mit einer Wechselzahl von 2,3 min⁻¹, die einer Michaelis-Menten Kinetik folgte und gemäß des oligomeren Zustandes keine Koopera-

tivität aufwies. Das Dimer zeigte dagegen eine 10 fach geringere basale ATPase Aktivität. Diese Beobachtung war zunächst überraschend, da verschiedene Studien das NBD Dimer als aktive oligomere Spezies oder als transientes katalytisches Intermediat postulierten: Ames und Mitarbeiter zeigten einen exponentiellen Anstieg der ATPase Aktivität von HisP bei einer linearen Erhöhung der Proteinkonzentration (Nikaido *et al.*, 1997). Eine Kooperativität in der ATP Hydrolyse konnte für die intakte Histidin-Permease (Liu *et al.*, 1997,a), nicht jedoch für das isolierte HisP, gezeigt werden (Nikaido *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu zeigte bereits die isolierte NBD 0796 aus *M. janaschii* eine kooperative ATP Hydrolyse mit einem Hill-Koeffizient von 1,7 (Moody *et al.*, 2002) und implizierte eine Interaktion der NBDs während des Hydrolysezyklus. Eine Erklärung dieser Daten gab die Struktur von MJ0796, dessen katalytische Base Glutamat 171 zu Glutamin substituiert war und somit eine Inaktivierung der ATPase bewirkte, indem das Dimer durch ATP überbrückt wurde (Smith *et al.*, 2002). Für die NBD von Mdl1p konnte ein Dimer in Gegenwart von ATP/Mg²⁺ und BeF_x, das ein posthydrolytisches Intermediat repräsentierte, isoliert werden (Janas *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu diesen Bedingungen, die eine Assemblierung des Dimers induzierten, war das NBD Monomer im Nukleotid-freien Zustand die vorherrschende oligomere Spezies. Dies implizierte die Notwendigkeit einer dynamischen Monomer-Dimer Umwandlung bzw. Modulation der Dimer-Interaktionsfläche (siehe Kapitel 4.4) im ATP Hydrolysezyklus der NBD mit dem Dimer als aktiver oligomerer Spezies. In diesem Kontext stellte sich Frage, warum das OpuAA Dimer ATPase inaktiv war, und es eröffneten sich verschiedene Hypothesen, die nachfolgend diskutiert werden sollen.

In ihrem Hydrolysezyklus durchläuft die NBD verschiedene Schritte wie z.B. die Bindung von ATP, die Hydrolyse von ATP, die Freisetzung von ADP und anorganischem Phosphat, um in einen Nukleotid-freien Zustand einzutreten. Zusätzlich zu diesen Schritten durchläuft die NBD eine potentielle Monomer-Dimer Umwandlung (siehe oben). Die ATPase Aktivität wird dabei von der Geschwindigkeit des langsamsten Schrittes bestimmt. Mit steigender Ionenstärke wurde eine solche oligomere Umwandlung für OpuAA verlangsamt. In Kapitel 4.4 wird über die Nukleotid-abhängige Monomer-Dimer Umwandlung von OpuAA als Ergebnis einer Modulation der Dimer-Interaktionsfläche spekuliert. Als eine weiterführende Hypothese könnte eine fixierte Interaktionsfläche für eine verlangsamte Produktentlassung verantwortlich sein und damit die Hydrolyserate bestimmen. Der Einfluss der Ionenstärke deutet auf elektrostatische Interaktionen während des Assoziations- bzw. Dissoziationsprozess von OpuAA hin. Auch für die NBD 0796 E171Q aus *M. janaschii* wurde eine kritische Rolle von elektrostatischen Effekten auf die Dimer Assoziation beschrieben (Moody *et al.*, 2002).

Alternativ konnte die marginale ATPase Aktivität des OpuAA Dimers durch eine signifikant verminderte Affinität zu ATP unter Bedingungen hoher Ionenstärke begründet sein. Eine

solcher Effekt wurde z.B. für HisP (Nikaido *et al.*, 1997) oder die isolierte NBD des HlyB-Transporters (Benabdelhak *et al.*, 2004) berichtet. Um dies zu überprüfen, wurden Bindungsexperimente mit Hilfe der Nukleotid-sensitiven OpuAA Mutante F19W durchgeführt. Diese Experimente zeigten jedoch, dass das Dimer sowohl ATP/Mg²⁺, als auch ADP/Mg²⁺ unter Hochsalzbedingungen mit mikromolaren K_D-Werten binden konnte. Andererseits wurde durch Konkurrenzexperimente von dimeren OpuAA/TNP-ATP/Mg²⁺ Komplexen mit ATP demonstriert, dass das Nukleotid in diesem funktionalen Zustand nicht ausgetauscht werden konnte. Eine solche Nicht-Austauschbarkeit wurde für den NBD/ATP Komplex des Mdl1p beschrieben (Janas *et al.*, 2003). Dieser Effekt könnte durch einen Konformationswechsel, wie er z.B. für MalK beschrieben wurde (Schneider *et al.*, 1994) verursacht werden, der eine Dissoziation des Nukleotids verhindert. Dabei bleibt jedoch unklar, ob eine Hydrolyse des ATP in diesem Zustand möglich ist oder nicht. Für den ersten Fall wäre die Rate der Produktfreisetzung der bestimmende Schritt (siehe oben), für den zweiten Fall wäre die Rate der ATP Hydrolyse der bestimmende Schritt und das Dimer läge in einem inaktiven, „prähydrolytischen“ Zustand vor.

Einer weiteren Argumentationslinie zufolge könnte eine solche Inaktivierung, auf eine fehlende Interaktion zwischen OpuAA und OpuAB zurückzuführen sein. Die Annahme einer solchen Wechselwirkung ist sinnvoll, denn sie könnte die Aktivität des OpuAA Dimers nicht nur regulieren, sondern eine Kopplung der ATP Hydrolyse mit der Translokation des Substrates ermöglichen. Ein solcher Mechanismus wurde für die Histidin-Permease (Liu *et al.*, 1999,b) und den Maltose-Transporter (Davidson & Nikaido, 1990; Sharma & Davidson, 2000) postuliert. In diesen Studien zeigten die Transporter im rekonstituierten Zustand eine niedrige konstitutive ATPase Aktivität, die in Gegenwart des SBP/Substrat Komplex stimuliert wurde. Um diese Theorie für OpuA zu untersuchen, wurde der Einfluss einer potentiellen Interaktion von OpuAA mit OpuAB bzw. OpuAB/AC auf die ATPase Aktivität von OpuAA analysiert. Diese Experimente erfolgten im Detergenz-solubilisierten Zustand von OpuAB. Die Gegenwart von OpuAB/AC bewirkte eine Aktivierung der ATPase Aktivität des OpuAA Dimers. Dies implizierte nicht nur eine Interaktion von NBD, TMD und SBP, sondern auch eine Überführung des OpuAA Dimers von einem inaktiven in einen aktiven Zustand. Die Zugabe des Substrates Glycin-Betain führte jedoch zu einer Reduktion der ATPase Aktivität. Für den Histidin-Transporter wurde ein ähnlicher Effekt beschrieben, wenn HisP spezielle Mutationen trug, die mit einer veränderten Assemblierung von HisP mit der TMD assoziiert waren (Liu *et al.*, 1999,b). Eine solche Erklärung ist auch in diesem Fall möglich. So könnte die Detergenzmizelle die Interaktionsfläche von OpuAA und OpuAB beeinflussen oder modifizieren. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Aktivierung von OpuAA/AB mit der Wahl des Detergenz variierte. Auch der Maltose-Transporter aus *T. litoralis* wurde im Detergenz-solubilisierten Zustand untersucht. Dabei wurde keine

Stimulation durch das SBP beobachtet und ebenfalls ein Einfluss des Detergenz diskutiert (Greller *et al.*, 2001). Eine Stimulation der ATPase Aktivität durch OpuAC/Glycin-Betain erfolgte dagegen bei dem aus einer Ko-Reinigung isolierten, d.h. *in vivo* assemblierten, OpuA-Transporter. Für das monomere OpuAA wurde eine Steigerung der ATPase Aktivität bereits in Gegenwart von OpuAB detektiert. Im Hinblick auf das Vorliegen von OpuAB als Dimer im Detergenz-solubilierten Zustand, und unter der Annahme einer stöchiometrischen Interaktion von OpuAA und OpuAB, impliziert dies eine Dimerisierung von OpuAA, die eine Aktivierung der NBD bewirken könnte. Ähnliche Ergebnisse wurden für den Maltose-Transporter aus *E. coli* im Detergenz-solubilierten Zustand beschrieben, bei dem bereits die Gegenwart der TMD eine Erhöhung der Aktivität im Vergleich zur isolierten NBD bewirkte. (Reich-Slotky *et al.*, 2000).

Diese Daten zeigten die Möglichkeit einer *in vitro* Assemblierung des OpuA Transporters. Die Gegenwart von OpuAB und OpuAC führt zu einer differenzierten Aktivierung der ATPase Aktivität von OpuAA, wobei speziell das Dimer von einer inaktiven in eine aktive Form überführt werden kann. Dies impliziert ein hohes Maß an konformeller Flexibilität in der Assemblierung der Komponenten des OpuA Transporters. Auch die generell nur schwache Wechselwirkung zwischen OpuAA und OpuAB ist ein Indiz für hohe konformelle Flexibilität.

4.3 Architektur des OpuAA Dimers

Die Architektur des OpuAA Dimers wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Bestimmung intermolekularer Distanzen mit Hilfe des Förster Resonanz Energietransfer (FRET) (Förster, 1948; Stryer, 1978) untersucht und mit der Architektur verschiedener dimerer NBDs verglichen. Diese Untersuchungen waren wichtig, da das NBD Dimer einerseits als essentielles katalytisches Intermediat im ATP-Hydrolysezyklus von ABC-Transportern angesehen wird, andererseits jedoch mehrere unterschiedliche Modelle zur Dimer-Interaktionsfläche postuliert werden (Hung *et al.*, 1998; Diederichs *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Die Anwendung von FRET ermöglichte, jenseits der klassischen Röntgenstrukturanalyse, nicht nur statische Distanzinformationen zu erhalten, sondern auch zeitliche Änderung von Distanzen, die z.B. durch Konformationsänderungen oder Dissoziation hervorgerufen werden können, zu analysieren.

4.3.1 FRET in homo-dynamischen/statischen Systemen

Die Effizienz des strahlungslosen Energietransfers (E_T) eines Donor Fluorophors (D) auf einen Akzeptor Fluorophor (A) ist bei hetero-FRET ein Maß für die räumliche Distanz des D/A-Paares. E_T kann statisch, d.h. durch Vergleich der Donor Fluoreszenz in Anwesenheit

und Abwesenheit des Akzeptors, oder dynamisch, d.h. durch Vergleich der Donor-Fluoreszenzlebensdauer in Anwesenheit und Abwesenheit des Akzeptors bestimmt werden (Lakowicz, 1999). Im einfachsten Fall liegt das D/A-Paar stöchiometrisch vor und ist entweder auf einem Molekül lokalisiert oder ist auf zwei unterschiedliche Komponenten (Heterodimer) verteilt, wobei die Dissoziationskonstante des Komplexes (K_D) sehr viel kleiner ist als die Konzentration der eingesetzten Komponenten. Ein solches Szenario wird als statisches Modell bezeichnet. Der E_T -Wert kann, wenn eine stöchiometrische Markierung von Fluorophor und Protein gewährleistet ist, einfach bestimmt werden und gibt eine absolute Distanz des D/A-Paares.

Mehrere Faktoren können dieses Szenario komplizieren: Im Fall eines dynamischen Modells, d.h. bei einem K_D -Wert in gleicher Größenordnung wie die Konzentration der eingesetzten Komponenten, liegt ein Teil der Komponenten als Monomer vor. Wenn das zu untersuchende Dimer aus gleichen Komponenten (Homodimer) besteht und/oder keine 100 %ige Markierungseffizienz gegeben ist, sind Donor und Akzeptor im Dimer nicht mehr stöchiometrisch, sondern statistisch verteilt. Andererseits ist auch eine statistische Verteilung der Fluorophore nicht mehr gewährleistet, wenn die mit Donor bzw. Akzeptor markierten Untereinheiten unterschiedlich zum Dimer assoziieren. In diesem Szenario kann der apparente E_T -Wert ohne Korrektur nur für qualitative Aussagen, d.h. für relative Änderungen von Distanzen genutzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch für das homodynamische Modell des OpuAA ein Verfahren etabliert, das die Bestimmung absoluter Distanzen von D/A-Paaren aus dem E_T -Wert ermöglichte.

Der apparente E_T -Wert wird sowohl von der Verteilung des Donors, des Akzeptors und des nicht-markierten Proteins im Dimer, als auch von dem Monomer-Dimer Verhältnis beeinflusst und ist im Vergleich zu dem realen E_T -Wert erniedrigt. Diese Größen hängen wiederum von der Markierungseffizienz, der eingesetzten Stöchiometrie von Donor und Akzeptor, der absoluten Konzentration der Komponenten, dem K_D -Wert bzw. der kinetischen Ratenkonstanten des Monomer-Dimer Gleichgewichtes sowie einem potentiellen Einfluss der Fluorophore auf diese Größen ab. Eine rechnerische Anpassung des E_T -Wertes ist prinzipiell möglich; sie verlangt jedoch die genaue Kenntnis sämtlicher genannter Größen, deren experimentelle Bestimmung oft fehlerbehaftet ist (siehe unten). Aus diesem Grund wurde im Fall von OpuAA versucht, Effekte, die den E_T -Wert beeinflussen, experimentell auszugleichen. Diese Strategie hatte zudem den Vorteil, dass das Verhältnis von FRET- zu Hintergrundsignal maximal war und damit der Fehler des E_T -Wertes minimiert wurde. Die genannten Größen sollen nachfolgend diskutiert werden.

Im Fall einer nicht-stöchiometrischen Markierungseffizienz des Proteins mit Fluorophor (Fl.) wird der Anteil an D/A-Paaren und damit der E_T -Wert erniedrigt. Es ist daher vorteilhaft,

entweder eine stöchiometrische Markierung zu erreichen oder nicht-markiertes Protein abzutrennen. Die Cystein-spezifische Markierung von OpuAA mit Maleinimid-modifizierten Fluorophoren zeigte eine Markierungseffizienz von 60 – 70 %; nicht-markiertes OpuAA wurde daher mit Hilfe von AAC abgetrennt. Eine interessante Alternative wäre die spezifische Isolierung von FI.-markierten Proteinen mit Hilfe immobilisierter Antikörper oder Lipocaline (Korndorfer *et al.*, 2003), die den jeweiligen Fluorophor mit hoher Affinität und Selektivität binden. Eine solche Isolierung ist andererseits nicht notwendig, wenn eine stöchiometrische Markierung z.B. durch Fusion von Fluorophor und Protein auf DNA-Ebene gewährleistet ist. Hierfür eignen sich Varianten des *green fluorescent protein* (GFP) (Tsien, 1998) wie z.B. das D/A-Paar *cyan fluorescent protein* (CFP) and *yellow fluorescent protein* (YFP). Ein solcher Ansatz wird insbesondere für die intrazelluläre Analyse von Protein-Protein Interaktionen häufig genutzt (Llopis *et al.*, 2000). Cole und Mitarbeiter haben eine weitere interessante Alternative vorgestellt: eine auf der Intein-Strategie basierende posttranslationale Ligation eines FI./Peptid-Konjugates an das Zielprotein (Scheibner *et al.*, 2003). Auch die Existenz hochaffiner Liganden-Bindestellen kann unter Verwendung fluoreszierender Liganden ausgenutzt werden, um stöchiometrische FI./Protein-Konjugate zu erhalten (Otto *et al.*, 2003). Ein Nachteil dieser Methoden ist jedoch die eingeschränkte Lokalisation des Fluorophors am Zielprotein. Ungeachtet dessen ist die direkte Inkorporation von FI./Aminosäure-Konjugaten mit Hilfe modifizierter t-RNAs während der Translation eine interessante Alternative, die eine Orts-spezifische und stöchiometrische Markierung von Proteinen ermöglicht (Cornish *et al.*, 1994; Lien *et al.*, 2002). Die einfachste Strategie für *in vitro* Experimente mit isolierten Proteinen ist die Verwendung der natürlichen Aminosäure Tryptophan als Donor-Fluorophor. Andererseits haben synthetische Fluorophore im Gegensatz zu Tryptophan optimierte spektrale Eigenschaften wie z.B. die Fluoreszenz-quantenausbeute.

In einem homodimeren System wird der E_T -Wert von dem Monomer-Dimer Verhältnis und der Verteilung von Donor und Akzeptor im Dimer beeinflusst. Um eine rechnerische Anpassung des E_T -Wertes zu vermeiden (siehe oben), können verschiedene Strategien angewandt werden: Für ein rein homo-statisches System ist es schwierig, eine statistische Verteilung von Donor und Akzeptor im Dimer zu erreichen, da die Austauschraten des Dimers potentiell sehr gering sind. Am Beispiel von GST wurde *in vitro* gezeigt, dass eine statistische Verteilung durch gemeinsame Denaturierung beider FI./Protein-Konjugate mit einer anschließenden Rückfaltung erreicht werden kann (Scheibner *et al.*, 2003). Die dimeren Komponenten könnten anschließend, unter Ausnutzung der geringen Austauschraten, mit Hilfe unterschiedlicher Affinitätspeptide auf den Untereinheiten selektiert werden. Diese Methode kann jedoch nur dann angewendet werden, wenn ein Protokoll zur Rückfaltung existiert. Falls beide Untereinheiten des Homodimers an der gleichen Position

markiert werden sollen, könnte die Markierungsreaktion sowohl in Gegenwart des Donor-, als auch des Akzeptor-Fluorophors erfolgen (Heidecker *et al.*, 1995). Die dimeren Komponenten könnten dann mit Hilfe von Antikörpern (siehe oben) selektiert werden. Eine alternative Strategie im Fall einer Fl./Protein-Fusion auf DNA-Ebene bietet die Ko-Expression beider Untereinheiten mit der Möglichkeit einer intrazellulären Assemblierung des Komplexes. Wenn beide Untereinheiten unterschiedliche Affinitätspeptide tragen, können die Dimere affinitätschromatographisch selektiert werden. Eine elegante Methode haben Otto *et al.* unter Ausnutzung von hochaffinen Liganden-Bindestellen im Protein vorgestellt (Otto *et al.*, 2003). Dort wurde das statische Homodimer zunächst mit 10 mol-% Donor-Ligand beladen und nachfolgend mit Akzeptor-Ligand titriert. Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer des Donors war von dem molaren Anteil des Akzeptors linear abhängig, und erlaubte eine Extrapolation des E_T -Wertes. Eine weitere Methode zur Bestimmung des E_T -Wertes ist homo-FRET (Weber, 1954), bei der auf den Akzeptor-Fluorophor verzichtet werden kann. In der zeitaufgelösten-Fluoreszenz-Anisotropie Methode wird der Donor mit polarisiertem Licht angeregt und der exponentielle Abfall der Anisotropie, der durch mehrere Faktoren wie z.B. Rotation des Dimers und des Fluorophors oder homo-FRET verursacht wird, aufgezeichnet (Bastiaens *et al.*, 1992). Der E_T -Wert kann aus der Ratenkonstante des homo-FRET und der Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors berechnet werden. Ein Nachteil dieser Methode ist die simultane Anpassung des Anisotropieabfalls mit den Amplituden und Lebensdauern aller Faktoren, die einen Abfall der Polarisation bewirken (Bastiaens *et al.*, 1992). Eine solche Vorgehensweise kann, insbesondere wenn die Lebensdauer der Fluorophorrotation und des homo-FRET ähnliche Größenordnungen haben (0,5 – 2,5 ns) haben, fehlerbehaftet sein und erfordert eine Kontrolle, in der alle Parameter identisch sind, jedoch kein homo-FRET vorliegt. Das Design einer solchen Kontrolle kann sich schwierig gestalten. Im Fall eines rein homo-dynamischen Modells ist es vorteilhaft Bedingungen zu finden, die das dynamische Gleichgewicht der Komponenten verlangsamen, so dass eine Abtrennung des Monomers ermöglicht wird. Die monomere Fraktion gibt ansonsten ein Hintergrundsignal, das das FRET Signal überdecken kann. Falls dies nicht möglich ist, bieten Messungen der Fluoreszenzlebensdauer (hetero-FRET) oder des Anisotropieabfalls (homo-FRET) einen Ausweg, da das Problem der Reabsorption, das bei hohen Konzentrationen und/oder Akzeptorüberschuss auftritt (siehe unten), bei diesen Verfahren keine Rolle spielt. Damit kann bei hohen Konzentrationen, unter denen das Dimer die vorherrschende Spezies ist, gearbeitet werden, und Kontrollexperimente können bei niedrigen Konzentrationen durchgeführt werden, unter denen das Monomer die vorherrschende Spezies ist. Auch in diesem Fall sind geeignete Kontrollexperimente wichtig, um die Lebensdauer des FRET Signals eindeutig von anderen Faktoren unterscheiden zu können (siehe oben).

Im Fall von OpuAA wurden die Vorteile eines homo-dynamischen Systems, mit denen eines homo-statischen Systems kombiniert. Das Akzeptor-markierte OpuAA wurde in großem Überschuss mit dem Donor-markierten OpuAA gemischt. Da das Mischen der Komponenten unter dynamischen Bedingungen erfolgte, waren im Dimer nahezu alle Donor-Moleküle mit Akzeptor-Molekülen abgesättigt. Damit entfiel eine rechnerische Anpassung der Donor-Akzeptor Verteilung im OpuAA Dimer. Nachfolgend wurde durch Zugabe von 1 M NaCl statischen Bedingungen erzeugt und die monomere Fraktion abgetrennt. Bei dieser Vorgehensweise war es notwendig zu zeigen, dass die Abnahme der Donor-Fluoreszenz in dem untersuchten Konzentrationsbereich nicht durch Reabsorption verursacht wurde. Eine solche Kontrolle wurde unter Verwendung von monomerem OpuAA oder freiem Fluorophor durchgeführt, da dabei kein FRET möglich war.

Die Konzentrationsangabe von FI./Protein-Konjugaten ist insbesondere für ein homo-dynamisches Modell eine kritische Größe, da ein fehlerhafter Wert nicht nur ein falsches Monomer-Dimer Verhältnis, sondern auch eine falsche D/A-Stöchiometrie und eine falsche Markierungseffizienz wiedergibt. Dramatische Auswirkungen auf den E_T -Wert haben fehlerhafte Konzentrationsangaben, wenn in statischen FRET-Messungen ein Vergleich der Donor-Fluoreszenz in Anwesenheit oder Abwesenheit des Akzeptors mit Hilfe zweier Proben erfolgt, deren Konzentration zuvor bestimmt werden muss. Dieses Problem tritt insbesondere dann auf, wenn ein Trennungsschritt wie z.B. die Abtrennung der monomeren Fraktion vor der eigentlichen Messung vorgenommen werden muss. Oft wird die Konzentration des FI./Protein-Konjugates spektroskopisch am Anregungsmaximum des Fluorophors bestimmt, ohne zu berücksichtigen, dass die Absorptionseigenschaften des Fluorophors von der Proteinumgebung und dem Lösungsmittel beeinflusst werden. Die Verwendung jener Daten für den freien Farbstoff kann dabei nur eine grobe Abschätzung sein. Dieser Tatsache wurde im Rahmen dieser Arbeit Rechnung getragen. Ebenso werden spektroskopische Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration wie z.B. der BCA Test durch den Fluorophor beeinflusst und kann zu Fehlern führen. Als eine alternative Strategie könnte sich eine Konzentrationsbestimmung der FI./Protein-Konjugate mit Hilfe von MALDI eignen. Da die Signalintensität in MALDI keine absolute Korrelation zu der Konzentration hat, muss jedoch zuvor eine Kalibrierung mit den individuellen Komponenten vorgenommen werden. Die beste Lösung dieses Problems ist jedoch, wenn keine Konzentrationsangaben benötigt werden. Dies ist der Fall, wenn die Donor-Fluoreszenz in Abwesenheit des Akzeptors für die Berechnung des E_T -Wertes nicht herangezogen werden muss. In diesem Zusammenhang kann eine Denaturierung der D/A-Probe gegebenenfalls als Kontrolle genutzt werden. Bei *in vivo* Untersuchungen ist es meist unmöglich, identische Donor Konzentrationen in Gegenwart und Abwesenheit von Akzeptor zu generieren. Hier wird dieses Problem durch eine spezifische Bleichungsinaktivierung des Akzeptors umgangen. Eine solche Vorgehens-

weise wäre prinzipiell auch für *in vitro* Experimente möglich. Bei Lebensdauermessungen (siehe oben), kann gänzlich auf die Angabe von Konzentrationen verzichtet werden. Eine alternative und elegante Strategie besteht in einer Ligand-induzierten Dimer-Assoziation oder, im entgegengesetzten Fall, in einer Ligand-induzierten Dimer-Dissoziation. Im Fall von OpuAA konnte durch Zugabe von ADP/Mg²⁺ eine Dimer-Dissoziation induziert werden. Damit konnte aus einer einzigen Probe alle nötigen Informationen zur Berechnung des E_T-Wertes erhalten werden.

4.3.2 Vergleich der Distanzen

Die Architektur des OpuAA Dimers sollte durch Vergleich intermolekularer Distanzen von OpuAA mit allen dimeren NBDs, deren Kristallstruktur publiziert war, analysiert werden. Die intermolekularen Distanzen des OpuAA Dimers wurden experimentell durch FRET bestimmt. Hierzu wurde zunächst eine ortspezifische einzelne Cystein-Substitution im OpuAA an den Aminosäurepositionen 45 oder 161 vorgenommen und die erhaltenen OpuAA Mutanten mit Donor- oder Akzeptor-Fluorophor markiert. Diese Positionen wurden ausgewählt, weil sie in der katalytischen Domäne bzw. der Signaldomäne lokalisiert waren und damit eine bestmögliche Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Dimer-Architekturen gewährleisten sollten. Durch Variation der OpuAA Mutanten wurden im assemblierten Dimer die D/A-Paare 45/45, 45/161 und 161/161 erhalten, deren Effizienz zum strahlungslosen Energietransfer (E_T) in einer Fluoreszenzmessung bestimmt wurde. Mit Hilfe von Gleichung 16 b und einem R₀-Wert von 51 Å für das D/A-Paar Oregon Green/Texas Red (Johnson *et al.*, 1993) wurde aus den E_T-Werten Distanzen für den Nukleotid-freien Zustand berechnet (Tabelle 12).

In einem zweiten Schritt wurde den Aminosäurepositionen 45 und 161 im OpuAA strukturell analoge Positionen in den zum Vergleich ausgewählten dimeren NBDs, MalK aus *E. coli* oder *T. litoralis*, NBD 0796 aus *M. janaschii*, HisP aus *S. typhimurium* und BtuD aus *E. coli*, zugeordnet. Dazu wurde die Aminosäuresequenz der NBDs miteinander verglichen (Abb. 4.2). Für die OpuAA Position 161 wurde eine homologe Position „A“ in den entsprechenden NBDs gefunden (Abb. 4.3 und Tabelle 12). Für die OpuAA Position 45 war keine eindeutige Zuordnung möglich, da OpuAA in diesem Sequenzbereich zusätzliche Aminosäuren aufwies, die in den ausgewählten NBDs abwesend waren (Abb. 4.3). Für dieses Problem boten sich zwei Lösungen an: In einem Modell von OpuAA (Abb. 3.7.1), das auf Grundlage von MalK_{T.l.} erstellt wurde, war die Position 45 in der die Faltblattstränge β_1 und β_2 (Nomenklatur gemäß HisP) verbindenden Schlaufe lokalisiert. Eine Strategie war daher die Aminosäure N-terminal zu β_2 in der entsprechenden Schlaufe als Position „B“ für die Distanzmessungen zu benutzen (Tabelle 12). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen

ließ jedoch auch einen alternativen Schluss zu, nachdem die entsprechende Position in \square_2 lokalisiert ist. Diese zweite Hypothese begründete sich auf folgende Fakten in den untersuchten NBD Kristallstrukturen: \square_1 und \square_2 sind antiparallel mit nahezu gleicher Länge. Der C-Terminus von \square_1 liegt in dem Bereich der konservierten aromatischen Aminosäure, die von den NBDs genutzt wird, um das Nukleotid mittels \square - \square Interaktion zu koordinieren (Kapitel 1.2.1) und damit in fester Geometrie zum Walker A Motiv steht (Abb. 4.3; Position X). Der N-Terminus von \square_2 liegt in dem Bereich eines konservierten Glutamats (Abb. 4.3; Position Y), das auch in der Sequenz von OpuAA vorhanden ist. Als Konsequenz wäre in OpuAA der N-Terminus von \square_2 im Bereich von Glu38 und die Position 45 in \square_2 lokalisiert. Im Einklang mit diesen Überlegungen wurde für die genannten NBDs 7-10 Aminosäuren C-terminal vom Beginn des \square_2 eine Position „C“ für die Distanzbestimmungen ausgewählt (Tabelle 12).

	\square_1	X	Y	\square_2	
OpuAA <i>B. subtilis</i>	MSVDEKPIKIKVEKVS	IFGKQTKKAVQMLANGKTKKEILKATG	STVGVN	50	
0796 <i>M. janaschii</i>	-----MIKLNVT	TY-KM	-----GE	IIYA-----LK	22
HisP <i>S. typhimurium</i>	---MMSENKLHVIDLHKRYG	-----	-----GHE	VLKG-----	24
MalK <i>T. litoralis</i>	-----MAGVRLVDVVKV	FG	-----	EV	TAV-----R
MalK <i>E. coli</i>	-----MASVQLQNVTKAWG	-----	-----	EV	VVS-----K
BtuD <i>E. coli</i>	-----MSIVMQLQDV	AESTR	-----	---	LGP-----
	:::: :: :				
		Walker A			
OpuAA <i>B. subtilis</i>	QADF	FEVYDGEIFVIMGLSGSGKSTL	VRMLNRLIEPTAGNIYIDGDMITNM	100	
0796 <i>M. janaschii</i>	NV	LN	IK	EG	EFVSI
HisP <i>S. typhimurium</i>	-VSI	Q	AR	AG	DVISIIGSSGSGKSTFL
MalK <i>T. litoralis</i>	E	MS	LE	V	KDGEF
MalK <i>E. coli</i>	D	IN	L	D	I
BtuD <i>E. coli</i>	LS	GE	VR	A	GEILHLVGPNGAGKSTLL
	. : * : . . . : * : . * : * : . : : * : .				
		Q-Schleufe			
OpuAA <i>B. subtilis</i>	SKDQ	-----LRE	VRRK	KISMV	FQK
0796 <i>M. janaschii</i>	DDDE	-----LTK	IRRD	KIGF	V
HisP <i>S. typhimurium</i>	RD	KD	Q	L	V
MalK <i>T. litoralis</i>	E	K	I	---	---
MalK <i>E. coli</i>	---	---	---	---	---
BtuD <i>E. coli</i>	S	-----	ATK	L	A
	. : .				
		C-Schleufe			
OpuAA <i>B. subtilis</i>	--VDK	Q	E	R	Q
0796 <i>M. janaschii</i>	GAM	S	G	E	E
HisP <i>S. typhimurium</i>	--LSK	H	D	A	R
MalK <i>T. litoralis</i>	--V	P	R	Q	E
MalK <i>E. coli</i>	--A	K	E	V	I
BtuD <i>E. coli</i>	---	H	D	K	T
	. : .				
		Walker B D-Schleufe			H-Schleufe
OpuAA <i>B. subtilis</i>	P	-----	D	I	L
0796 <i>M. janaschii</i>	P	-----	P	I	L
HisP <i>S. typhimurium</i>	P	-----	D	V	L
MalK <i>T. litoralis</i>	P	-----	Q	V	F
MalK <i>E. coli</i>	P	-----	S	V	F
BtuD <i>E. coli</i>	TP	Q	A	N	P
	. : * : . . . : * : . * : * : . : : * : .				
		Walker B D-Schleufe			H-Schleufe
OpuAA <i>B. subtilis</i>	DE	A	R	I	G
0796 <i>M. janaschii</i>	N	V	A	-	R
HisP <i>S. typhimurium</i>	G	F	A	R	H
MalK <i>T. litoralis</i>	V	E	A	M	T
MalK <i>E. coli</i>	V	E	A	M	T
BtuD <i>E. coli</i>	N	H	T	L	R
	. : .				
		Walker B D-Schleufe			H-Schleufe
OpuAA <i>B. subtilis</i>	A	G	H	I	M
0796 <i>M. janaschii</i>	---	---	---	---	---
HisP <i>S. typhimurium</i>	---	---	---	---	---
MalK <i>T. litoralis</i>	---	---	---	---	---
MalK <i>E. coli</i>	---	---	---	---	---
BtuD <i>E. coli</i>	---	---	---	---	---
	. : .				

MalK E. coli	----FLPVKVTAT-AIDQVQVELPMPNRQQVWLPVESRDVQVGANMSLGI	285
BtuD E. coli	-----KMLASGRREEVLTTPNLAQA	229
OpuAA B. subtilis	KKAAESDLSLQDILNTEFTVPENTYLTEIFDVVSDANIPIAVVDEKQRM	380
HisP S. typhimurium	QQFLKGSL-----	257
MalK T. litoralis	RPEDLYDAMFAQVRVPGENLVRVVEIVENLGSERIVRLRVGGVTFVGSF	339
MalK E. coli	RPEHLLPSDIADVILEGE-----VQVVEQLGNETQIHIQIPSIQNLYVY	329
BtuD E. coli	YGMNFRRLDIEGHRMLISTI-----	249
OpuAA B. subtilis	KGIVVRGALIGALAGNNEYINAEGTNEQTQDPSAQEVK----	418
MalK T. litoralis	RSE--SRVREGVEVDVVFDMKKIHIF--DKTTGKAIF-----	372
MalK E. coli	RQNDVVLVEEGATFAIGLPPERCHLFREDGTACRRLHKEPGV	371

Abb. 4.3: Sequenzvergleich von OpuAA aus *B. subtilis* mit NBDs, deren dimere Kristallstruktur publiziert ist. Konservierte Sequenzmotive (siehe Kapitel 1.2.1) sind schwarz unterlegt. X: konservierte aromatische Aminosäure, Y: konserviertes Glutamat (siehe Text), Unterlegung: Faltblattstränge \square_1 , \square_2 (magenta), Position A (rot), Position B (blau), Position C (grün).

Um die potentiell unterschiedlichen räumlichen Orientierungen der Seitenkette in den Positionen A, B und C der verschiedenen NBDs auszugleichen, wurde für sämtliche Distanzbestimmungen der Amidstickstoff der jeweiligen Aminosäureposition verwendet. Die Distanzen zwischen den Positionspaaren A/A, A/B und B/B, sowie alternativ A/C und C/C der ausgewählten NBDs wurden mit Hilfe des Programms Pymol bestimmt und sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Förster Distanz R_0 wird von mehreren Parametern wie z.B. der Orientierung der Übergangsdipolmomente oder der Quantenausbeute beeinflusst. Otto *et al.* haben diesbezüglich einen Fehler des R_0 -wertes im Bereich von 10-15 % abgeschätzt (Otto *et al.*, 2003), der für die nachfolgende Beurteilung ein Maß sein soll, ob die experimentell bestimmten Distanzen von OpuAA der Architektur einer der genannten NBDs entsprechen könnte.

Zunächst wurde OpuAA mit NBD Dimeren verglichen, die im Komplex mit ATP vorlagen. Die für OpuAA ermittelten Distanzen waren dagegen für den Nukleotid-freien Zustand extrapoliert. Im Fall des HisP Dimers (Hung *et al.*, 1998) wichen die Distanzen der Paare A/A um 35 Å und der Paare B/B bzw. C/C um 32 Å bzw. 40 Å von den experimentellen Daten in OpuAA im Nukleotid-freien Zustand ab. Damit konnte eine *back-to-back* Architektur, wie sie in der Kristallstruktur von HisP vorgeschlagen wurde, für OpuAA sicher ausgeschlossen werden. Auch die NBD Dimere MJ0796 (Smith *et al.*, 2002) und MalK_{E.c.} in einer geschlossenen Konformation (g.K.) (Chen *et al.*, 2003) waren zum Vergleich mit OpuAA interessant, obwohl in diesen Strukturen die beiden Untereinheiten über zwei ATP Moleküle überbrückt waren. Im Einklang damit zeigten die Distanzen der Paare A/B bzw. A/C signifikante Abweichungen von 34 Å bzw. 23 Å und 18 Å zu den experimentellen Daten im OpuAA. Damit schieden auch diese NBDs im Komplex mit ATP für ein strukturelles Modell für den OpuAA Dimer aus.

Position/ Paar	OpuAA	MalK _{Ec} g.K.	MalK _{Ec} s.o.K.	MalK _{Ec} o.K.	MalK _{Tl}	0796 _{Mj}	BtuD _{Ec}	HisP _{St}
A	G161	H125	H125	H125	E131	E136	D118	E144
A/A	50 Å	46 Å	50 Å	63 Å	41 Å	44 Å	47 Å	85 Å
B	S45	E15	E15	E15	E15	E15	P18	V21
B/B	60 Å	54 Å	61 Å	66 Å	45 Å	56 Å	55 Å	28 Å
A/B	50 Å	16 Å	27 Å	41 Å	34/31 Å	16 Å	26 Å	60 Å
C	S45	D25	D25	D25	M22	N25	A25	Q28
C/C	60 Å	53 Å	56 Å	60 Å	40 Å	53 Å	53 Å	20 Å
A/C	50 Å	32 Å	38 Å	51 Å	40/37 Å	27 Å	42 Å	50 Å

Tabelle 12: Angabe der Aminosäurepositionen in OpuAA und den NBDs MalK, MJ0796, HisP und BtuD, die den Positionen A, B und C entsprechen. Distanzen zwischen den Paaren A/A, A/B und B/B bzw. A/C und C/C wurden mit Hilfe des Programms Pymol zwischen den Amidstickstoffen der jeweiligen Positionen bestimmt und für OpuAA durch FRET experimentell ermittelt.

MalK_{Tl} (Diederichs *et al.*, 2000) war das einzige NBD Dimer mit einer 170° Symmetrie und als Konsequenz wurden zwischen den Paaren A/B bzw. A/C zwei unterschiedliche Distanzen bestimmt (Tabelle 12). Diese Unterschiede wären, unter der Annahme einer ähnlichen Symmetrie im Fall von OpuAA, in den FRET-Messungen gemittelt. Ein Vergleich der Distanzen zwischen dem MalK_{Tl} und dem OpuAA Dimer zeigten maximale Distanzabweichungen von 20 Å. Damit war auch ein Modell ähnlich des MalK_{Tl} Dimers für OpuAA nicht plausibel. In der Struktur von MalK_{Tl} wiesen die regulatorischen Domänen zu entgegengesetzten Polen des MalK₂ Ellipsoids mit einer Distanz von etwa 80 Å. Damit könnte eine zweifelsfreie Unterscheidung zu einem Modell ähnlich des MalK_{Ec} Dimers, in dem die regulatorischen Domänen interagieren, durch ein weiteres D/A-Paar erfolgen in den beiden regulatorischen Domänen erfolgen. Für MalK_{Ec} (Chen *et al.*, 2003) wurde, neben der geschlossenen Konformation in Komplex mit ATP, zwei weitere Nukleotid-freie Konformationen beobachtet, die von den Autoren als offene (o.K.) und semi-offene Konformation (s.o.K.) bezeichnet wurden. Die semi-offene Konformation von MalK_{Ec} zeigte für die Paare A/A und B/B nahezu identische Distanzen, wie sie für OpuAA experimentell bestimmt wurden. Dagegen war die Distanz des Paares A/B um 23 Å zu gering. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für die NBDs von BtuCD (Locher *et al.*, 2002) erhalten. Damit schieden diese beide Strukturen als Modell für OpuAA aus, wenn die Position „B“ als Referenz genommen wurde. Wenn die Position „C“ als Referenz für die OpuAA Position 45 herangezogen wurde, wichen die gemessenen Distanzen im Fall der semi-offenen

Konformation von MalK_{E.c.} um maximal 12 Å und im Fall von BtuD um maximal 8 Å von den experimentellen Daten ab. Für die offene Konformation von MalK_{E.c.} (Chen *et al.*, 2003) gab die Verwendung der Position „C“ eine gute Übereinstimmung mit den FRET-Daten von OpuAA; einzig die Distanz des Paares A/A war um 13 Å zu groß.

Diese Analyse zeigte, dass die Struktur von BtuD als plausibles Modell für die Architektur des dimeren OpuAA im Nukleotid-freien Zustand dienen kann. Die semi-offene und offene Konformation von MalK_{E.c.} zeigt in zwei von drei Distanzen eine gute, in einer Distanz eine mäßige Übereinstimmung mit den experimentellen Daten von OpuAA. In diesen Strukturen haben die NBDs eine *head-to-tail* Orientierung, wie sie z.B. in Rad50 vorliegt (Hopfner *et al.*, 2000), wobei die Untereinheiten in unterschiedlichem Maß voneinander versetzt sind, so dass das Dimer geöffnet wird. Diese Architektur wird im Fall von MalK_{E.c.} durch die Interaktion der regulatorischen Domäne und im Fall von BtuD durch die TMD BtuC unterstützt.

In nachfolgenden Experimenten (Daten sind nicht gezeigt) wurde versucht, für OpuAA eine ATP überbrückte Dimer-Konformation zu erzeugen und diese mit Hilfe von FRET zu detektieren. Diese Experimente wurden zunächst bei niedriger Ionenstärke durchgeführt, da unter diesen Bedingungen die ATPase Aktivität gering war. Im Fall einer Zugabe von ATP/Mg²⁺ wurde jedoch in allen drei D/A-Paaren ein Anstieg der Donor-Fluoreszenz beobachtet, deren Endwert niedriger war als im Fall einer Inkubation mit ADP/Mg²⁺. Diese Daten deuten auf eine partielle Hydrolyse von ATP bzw. eine partielle Dissoziation des Dimers unter den gewählten Bedingungen hin. Anschließend wurden identische Experimente unter Hochsalzbedingungen durchgeführt, in denen einerseits die ATP Hydrolyserate des Dimers gering war und andererseits die Dimer Dissoziation verlangsamt war. Unter diesen Bedingungen nahm die Donor-Fluoreszenz ab, die jedoch unter den experimentellen Bedingungen zeitlich nicht aufgelöst werden konnte. Dies deutete auf eine Erhöhung der Transfereffizienz hin. Andererseits konnte die Fluoreszenzänderung potentiell auch andere Ursachen wie z.B. einen pH Sprung haben. Diese Untersuchungen könnten in einer „stopped flow“ Anordnung mit einer höheren zeitlichen Auflösung wiederholt werden, um diese Prozesse unterscheiden zu können.

Im Feld der Nukleotid-Bindeproteine Myosin oder F1-ATPase wurde die FRET-Methode bereits mehrfach angewendet, um Distanzen zwischen den einzelnen Untereinheiten zu bestimmen oder Nukleotid-induzierte Konformationsänderungen zu analysieren (Shih *et al.*, 2000; Yasunaga *et al.*, 2000; Yasuda *et al.*, 2003). Dagegen fand diese Methode im Feld der ABC-Transporter bisher nur geringe Anwendung: Einzig Sharom und Mitarbeiter haben FRET angewendet, um die intramolekulare Distanz der Walker A Motive in P-gp zu bestimmen (Qu & Sharom, 2001). Dazu wurden Cysteinreste in den Walker A Motiven von

P-gp sequentiell mit Fluorophoren markiert und eine Distanz der Fluorophore von 16 Å bestimmt (Qu & Sharom, 2001). Auch die Substrat-Bindestelle in P-gp konnte mit Hilfe eines fluoreszierenden Substrates durch FRET analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass die Substrat-Bindestelle im zytosolischen Blatt der Membran lokalisiert war (Qu & Sharom, 2002). In dem eukaryotischen P-gp sind beide NBDs und TMDs fusioniert, so dass in diesem Fall ein hetero-statisches System vorliegt. Viele SBP-abhängige bakterielle ABC-Transporter repräsentieren dagegen aufgrund der Architektur und der Interaktion ihrer Untereinheiten ein homo-dynamisches Modell, auf das die in dieser Arbeit etablierte FRET-Methode angewendet werden könnte, um intermolekulare Distanzänderungen nicht nur qualitativ zu beschreiben, sondern Distanzen quantitativ zu bestimmen.

4.4 Katalytischer Zyklus von OpuAA

Im Feld der ABC-Transporter stellt sich zentrale Frage, wie die chemische Energie, die bei der Hydrolyse von ATP freigesetzt wird, für die Translokation des Substrates genutzt wird. In diesem Zusammenhang wird ein ATP überbrückter NBD Dimer, wie er in den Kristallstrukturen von MJ0796 E171Q (Smith *et al.*, 2002), MalK aus *E. coli* (Chen *et al.*, 2003) oder Rad50 (Hopfner *et al.*, 2000) beobachtet wurde, als katalytisches Intermediat im ATP-Hydrolysezyklus angenommen. Die Bildung eines solchen Dimers erlaubt eine zeitliche und räumliche Kommunikation der zwei NBDs. Hunt und Mitarbeiter postulieren dabei ein funktionales Wechselspiel zwischen katalytischem Zustand und Oligomerisierungsgrad der NBD (Smith *et al.*, 2002). In diesem Modell erfolgt die ATP-Bindung durch das NBD Monomer und führt durch Komplementierung der Substrat-Bindetaste durch das andere Monomer zu einer Dimerisierung. Die Hydrolyse des ATP erfolgt in beiden NBDs des Dimer parallel und führt nachfolgend zu einer Dissoziation der NBDs. Die Dissoziation könnte ein Signal an die TMDs zur Öffnung der Translokationspore repräsentieren z.B. in einer Veränderung des Winkels der α -Helizes relativ zur Membran (Chang & Roth, 2001).

4.4.1 Monomer-Dimer Gleichgewicht im Nukleotid-freien Zustand

Die Analyse des Oligomerisierungsgrades von OpuAA im Nukleotid-freien Zustand zeigte ein Monomer-Dimer Gleichgewicht mit einem K_D -Wert von 6 μM , und im Einklang damit wurde in GPC Experimenten ein OpuAA Dimer detektiert. Dieses Ergebnis war für isolierte Nukleotid-Bindeproteine von ABC-Transporten neu. Für die NBD MJ0796 E171Q wurde ein K_D -Wert im Nukleotid-freien Zustand bestimmt und war um das 35 fache größer ($K_D = 210 \mu\text{M}$) (Moody *et al.*, 2002). Als eine Konsequenz war das Monomer für diese, aber auch andere NBDs (Nikaido *et al.*, 1997; Janas *et al.*, 2003; Verdon *et al.*, 2003,b) im Nukleotid-

freien Zustand die dominierende oligomere Spezies. Interessanterweise wurde für MalK, der NBD des Maltose-Transporters, eine Dimerisierung *in vivo* und *in vitro* durch Präzipitationsexperimente demonstriert und als initialer Schritt in der Assemblierung des Maltose-Transporters aus *E. coli* postuliert (Kennedy & Traxler, 1999). Es stellte sich daher die Frage, warum sich OpuAA und MalK im Bezug auf die Dimerisierung ähnlich verhielten.

Durch einen Vergleich der Aminosäuresequenz von OpuAA mit MalK und anderen NBDs zeigte sich, dass OpuAA eine zusätzliche Erweiterung von ungefähr 200 AS am C-Terminus von OpuAA enthielt. Eine solche C-terminale Erweiterung wurde auch für MalK aus *T. litoralis* oder *E. coli* beschrieben, wo sie als Regulationsdomäne (RD) fungiert (Bohm *et al.*, 2002). Die RD ist an der Interaktion mit MalT, einem spezifischen Transkriptionsaktivator des *mal* Operons, und dem Enzym IIA^{glc}, einem löslichen Enzym des Glukose-Phosphotransferase-Systems, beteiligt (Boos & Shuman, 1998). IIA^{glc} inhibiert den Maltose-Transport in Gegenwart von Glukose, einen Mechanismus der in der Literatur als „*inducer exclusion*“ bezeichnet wird (Boos & Shuman, 1998). Solche Regulatoren wurden für den OpuA-Transporter aus *B. subtilis* bisher noch nicht identifiziert. Daher ist die Funktion der potentiellen RD von OpuAA noch unklar.

Die Kristallstrukturen von MalK aus *T. litoralis* und *E. coli* wurden kürzlich beschrieben (Diederichs *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003). Obwohl die Aminosäuresequenzen der RD aus MalK_{T.l.} und MalK_{E.c.} eine Identität von nur 26 % aufwiesen, zeigten die RD eine nahezu identische β -Faltung (Chen *et al.*, 2003) und gaben MalK eine stäbchenförmige Gestalt. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass auch für OpuAA eine ähnliche Faltung der RD angenommen werden kann. Dies mag als Erklärung für die apparent höheren Massen des OpuAA Monomers oder Dimers in der GPC dienen. MalK_{T.l.} und MalK_{E.c.} zeigten in ihrer Kristallstruktur einen Dimer. Die Faltung der katalytischen- und Signaldomäne, die im Folgenden als ABC-Domäne bezeichnet werden, war analog zu HisP (Hung *et al.*, 1998). Die Orientierungen der Monomere im Dimer zeigten jedoch Unterschiede: In MalK_{T.l.} war das Dimer durch die katalytischen Domänen einerseits und der Signaldomänen andererseits, mit der RD an entgegengesetzten Polen, assoziiert und wies eine *head-to-head* Orientierung auf (Diederichs *et al.*, 2000). In MalK_{E.c.} wurde das Dimer im ATP gebundenen Zustand über drei Kontaktflächen stabilisiert: Assoziation der ABC-Domäne in einer Orientierung, die Rad50 (Hopfner *et al.*, 2000) bzw. einer *head-to-tail* Orientierung entsprach, sowie eine Interaktion der RDs untereinander (Chen *et al.*, 2003). Im Nukleotid-freien Zustand war MalK_{E.c.} in einer offenen Konformation und das Dimer war hier alleine über Kontakte der RD stabil assoziiert (Chen *et al.*, 2003). Diese Interaktion wurde auch biochemisch durch Cystein-Vernetzung der RD von MalK im intakten Maltose-Transporter demonstriert (Samanta *et al.*, 2003).

Die Interaktion der RDs in MalK_{E.c.} bot ein Erklärungsmodell für die Existenz eines OpuAA Dimers im Nukleotid-freien Zustand, denn eine solche Architektur würde einen OpuAA Dimer in Lösung stabilisieren. Andererseits wurde für GlcV, der NBD eines Glukose ABC-Importers aus *S. sulfatericus*, weder in Lösung (Verdon *et al.*, 2003,b) noch in der Kristallstruktur (Verdon *et al.*, 2003,a) eine Dimerisierung im Nukleotid-freien Zustand beobachtet, obwohl GlcV ebenfalls eine RD aufwies. Mehrere experimentelle Befunde implizierten die Existenz weiterer Wechselwirkungen im OpuAA Dimer zusätzlich zu der potentiellen Interaktion der RDs. Die Monomer-Dimer Umwandlung von OpuAA wurde durch Ionenstärke beeinflusst und deutete auf eine potentielle Bedeutung von elektrostatischen Interaktionen im Assoziations- und Dissoziationsprozess von OpuAA hin. In Einklang damit wurde auch für die NBD MJ0796 E171Q eine kritische Rolle elektrostatischer Interaktionen auf die Dimer Assoziation der ABC-Domäne berichtet (Moody *et al.*, 2002), obwohl diese NBD keine RD besitzt. Ein Vergleich des OpuAA Monomers und Dimers bezüglich ATPase Aktivität zeigte signifikante Unterschiede (Kapitel 4.2). Die Affinität des OpuAA F19W Monomers oder Dimers gegenüber ATP/Mg²⁺ unterschied sich um das 3,5 fache und gegenüber ADP/Mg²⁺ um das 2 fache. Diese Daten implizierten eine unterschiedliche Architektur der Nukleotid-Bindetasche beider oligomeren Spezies. Die offene Form des MalK_{E.c.} Dimers zeigte jedoch keine Kontakte der ABC-Domäne beider Monomere und ähnelte der Architektur der Nukleotid-Bindetasche eines Monomers. Eine weitere offene Fragestellung ergab sich aus der Tatsache, dass die Gegenwart von Nukleotiden das Monomer-Dimer Gleichgewicht veränderte und insbesondere ADP/Mg²⁺ eine Dissoziation des OpuAA Dimers bewirkte. Eine minder plausible Hypothese in diesem Zusammenhang war eine von Nukleotiden verursachte Konformationsänderung im OpuAA, die einen Einfluss auf die Interaktion der RDs hatte.

Alternativ könnte der OpuAA Dimer zusätzlich zu der potentiellen Interaktion der RDs auch Kontakte der ABC-Domäne aufweisen, die durch Nukleotide beeinflusst werden. Eine solche Dimer Architektur würde eine Asymmetrie der Nukleotid-Bindetasche von Monomer und Dimer erklären und wurde beispielsweise in der semi-offenen Struktur von MalK_{E.c.} ersichtlich (Chen *et al.*, 2003). Die physiologische Relevanz dieser Struktur wird allerdings kontrovers diskutiert, da sie auch durch Kristallkontakte hervorgerufen sein könnte. Andererseits wurde auch in der Kristallstruktur von BtuCD eine solche semi-offene Konformation der NBD im Nukleotid-freien Zustand beobachtet (Locher *et al.*, 2002). Hier war die Distanz zwischen Walker A Motiv und der C-Schleufe im Vergleich zu der Rad50/ATP Kristallstruktur (Hopfner *et al.*, 2000), die einen geschlossenen ATP überbrückten Dimer zeigte, erweitert. Die beiden BtuD Untereinheiten standen über Aminosäurereste des Walker A Motivs, der H-Schleufe und der D-Schleufe mit einer Dimer-Interaktionsfläche von 740 Å² in Wechselwirkung. Dieser Wert ist für eine Protein/Protein

Kontaktfläche gering und einer rein strukturbioologischen Argumentationslinie zufolge ist es daher plausibel, dass diese Konformation durch die Interaktion von BtuD mit BtuC induziert bzw. stabilisiert wird. Eine solche hypothetische Dimer Struktur von OpuAA wurde durch die in diese Arbeit durchgeführten FRET-Experimente unterstützt (Kapitel 4.3).

Der in Lösung beobachtete K_D -Wert des dynamischen Monomer-Dimer Gleichgewichtes von OpuAA im mikromolaren Bereich entspricht einer mäßig starken Wechselwirkung. Eine Übertragung des BtuCD Szenarios auf den OpuA Transporter impliziert andererseits eine zusätzliche Stabilisierung des OpuAA Dimers durch das dimere OpuAB, die in Lösung für das isolierte OpuAA nicht existent war. Im Hinblick auf die diskutierten Aspekte bezüglich der Dimer-Interaktionsfläche wäre das TMD-gebundene OpuAA-(Monomer) nicht isoliert, sondern stände in Kontakt mit seinem benachbarten Monomer. Als Konsequenz würde im Nukleotid-freien Zustand ein OpuAA Dimer vorliegen z. B. in einer semi-offenen Form und ATP binden. Dieses Modell widerspricht dem von Hunt und Mitarbeiter vorgeschlagen Modell, bei dem das NBD Monomer für die ATP Bindung verantwortlich ist (Smith *et al.*, 2002). Im Fall von OpuAA konnte jedoch eine ATP-Bindung des Dimers in stöchiometrischem Verhältnis und mit mikromolarer Affinität gezeigt werden.

4.4.2 Nukleotid-induzierte Modulation der Dimer-Interaktionsfläche von OpuAA

Das für OpuAA beobachtete Monomer-Dimer (M-D) Gleichgewicht war Nukleotid-abhängig. Alternativ zu den Ergebnissen aus GPC Experimenten konnte der K_D -Wert des Gleichgewichtes aufgrund der Affinitäten des monomeren oder dimeren OpuAA/Nukleotid Komplex mit Hilfe des Prinzips der mikroskopischen Reversibilität berechnet werden. Die K_D -Werte der individuellen oligomeren OpuAA Spezies im Komplex mit ATP waren ähnlich. Aus diesen Werten wurde ein K_D -Wert von 10 μM für das M-D Gleichgewicht von OpuAA in seiner ATP gebundenen Form berechnet, der in Übereinstimmung mit dem apparenten K_D -Wert des M-D Gleichgewichtes in Gegenwart von 10 mM ATP war (27 μM). Dieser Wert war im Vergleich zu dem für die NBD 0796 E171Q aus *M. janaschii* bestimmten Wert in Gegenwart von 2 mM ATP um einen Faktor 100 größer (Moody *et al.*, 2002). Die native NBD zeigte jedoch in Gegenwart von ATP keine Bildung eines Dimers. Die Zugabe von Mg^{2+} erhöhte den apparenten K_D -Wert des OpuAA Gleichgewichtes M-D auf $49 \pm 4 \mu\text{M}$. In Übereinstimmung damit, unterschieden sich die K_D -Werte von OpuAA/ATP/ Mg^{2+} Monomer oder Dimer Komplexen um den Faktor 4 und ergaben einen K_D -Wert des M-D Gleichgewichtes von OpuAA in seiner ATP/ Mg^{2+} gebundenen Form von 96 μM . Damit beeinflusste Mg^{2+} den K_D -Wert des M-D Gleichgewichtes von OpuAA/ATP um den Faktor 4 - 5. Ein möglicher Grund könnte eine unterschiedliche Ladungsverteilung in der Nukleotid-Bindetasche des Monomer und Dimers sein (siehe Kapitel 4.2). Ein ähnlicher Effekt wurde

im Fall der NBD 0796 E171Q aus *M. janaschii* beobachtet (Moody *et al.*, 2002). Auch die NBD GlcV mit den Mutationen E166Q oder E166A aus dem Glukose-Transporter von *S. sulfatericus* zeigte in Gegenwart von ATP oder ATP/Mg²⁺ ein schnelles M-D Gleichgewicht (Verdon *et al.*, 2003,b).

Welche Bedeutung hat ein solches Nukleotid-abhängiges M-D Gleichgewicht von OpuAA für die Situation *in vivo*, wenn OpuAA an OpuAB gebunden ist? Die unterschiedlichen K_D-Werte spiegeln eine variierende Affinität der OpuAA Monomere zueinander wider. Für ein TMD-gebundenes Dimer mit Kontakten in der ABC-Domäne impliziert dies eine Modulation der Dimer-Interaktionsfläche durch attraktive und repulsive Kräfte. Eine solche Modulation der Dimer-Interaktionsfläche kann beispielsweise durch Nukleotid-induzierte Konformationsänderungen hervorgerufen werden (Kapitel 4.4.3). Dies entspräche dem von Rees und Mitarbeitern postulierten Modell, das auf Grundlage der Struktur von BtuCD formuliert wurde (Locher *et al.*, 2002). Dabei bilden die NBDs, aufgrund der Interaktion mit der TMD und der räumlichen Nähe an der Membran, einen „permanenten“ Dimer, dessen Dimer-Kontaktfläche in Abhängigkeit von dem katalytischen Zustand der NBD spezifisch verändert wird. Dieses Modell ist in Übereinstimmung mit Elektronen-mikroskopischen Projektionsstrukturen von MDR1 in Gegenwart von ATP, ADP/P_i oder in Abwesenheit von Nukleotid, bei denen keine signifikante Assoziation oder Dissoziation der NBDs beobachtet wurde (Rosenberg *et al.*, 2001).

Die Möglichkeit eines Nukleotid-induzierten Konformationswechsels in der NBD wurde mit Hilfe von TNP-Nukleotiden untersucht. TNP-Nukleotide verändern ihre Fluoreszenzeigenschaften mit der molekularen Umgebung der Nukleotid-Bindetasche. Dieser Effekt wird durch den Fluoreszenzerhöhungsfaktor ΔF quantifiziert. Die Fluoreszenz von OpuAA/TNP-ADP/Mg²⁺ Komplexen war, im Vergleich zu OpuAA/TNP-ATP/Mg²⁺ oder OpuAA/TNP-ADP Komplexen, mehrfach erhöht. Im Einklang mit dieser Beobachtung wurden für diese Zustände unterschiedliche ΔF -Werte bestimmt (OpuAA/TNP-ADP/Mg²⁺ Komplexe: $\Delta F = 40$; OpuAA/TNP-ATP/Mg²⁺ Komplexe: $\Delta F = 5,7$). Dies impliziert einen konformellen Wechsel im OpuAA vom ATP/Mg²⁺ zum ADP/Mg²⁺ gebundenen Zustand. Ein Konformationswechsel dieser Zustände wurde auch durch Überlagerung der Kristallstrukturen von MJ1267/ADP/Mg²⁺ und HisP/ATP gezeigt (Karpowich *et al.*, 2001). Die Überlagerung der Strukturen zeigte eine ca. 15° Rotation der Signaldomäne um das Walker B Motiv zur katalytischen Domäne hin und resultierte in einer Reorientierung der Q-Schleife zum γ -Phosphat des ATP. Die Zugabe von monomerem OpuAA zu TNP-ADP/Mg²⁺ resultierte in einer spontanen Fluoreszenzerhöhung die experimentell nicht aufgelöst werden konnte (< 5 sec). Dies impliziert eine schnelle Bindung des TNP-Nukleotids an OpuAA. Dagegen war die Fluoreszenzerhöhung graduell und entsprach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung, wenn das OpuAA Dimer zu

TNP-ADP/Mg²⁺ gegeben wurde. Diese Beobachtung kann durch eine schnelle Bindung des TNP-ADP/Mg²⁺ an OpuAA erklärt werden, der dann eine langsame Isomerisierungsreaktion folgt. Eine solche potentielle Isomerisierung muss die Nukleotid-Bindetasche des Dimers beeinflussen und so eine Fluoreszenzerhöhung bewirken. Für das Dimer entsprach der Endwert der graduellen Fluoreszenzerhöhung dem Wert der spontanen Fluoreszenzerhöhung des Monomers. Andererseits führte die Zugabe von ADP/Mg²⁺ zu dem OpuAA Dimer zu einer Dissoziation. In Übereinstimmung war der K_D-Wert des M-D Gleichgewichtes in Gegenwart von ADP/Mg²⁺ größer als 300 µM und das OpuAA Monomer die vorherrschende oligomere Spezies. Als eine Hypothese bewirkte demnach die potentielle ADP/Mg²⁺ induzierte Isomerisierung einen Zerfall des OpuAA Dimers, in dem sie die Dimer-Interaktionsfläche moduliert und z.B. repulsive Kräfte generiert. Für das Maltose Transport System wurde durch Inkorporation von ADP/Mg²⁺/Vanadat, zur Fixierung des potentiell dimeren Übergangszustandes, eine Veränderung in der Emissionswellenlänge von Fluorophor-markierten Komplexen detektiert (Mannering *et al.*, 2001). Dieser Effekt wurde mit einem Konformationswechsel des Grundzustandes zum Übergangszustand assoziiert. Eine Überprüfung dieser Hypothese durch strukturelle Daten ist nicht möglich, da die Struktur eines NBD/ADP/Mg²⁺ Dimers nicht verfügbar ist. Dies spricht andererseits für die thermodynamische Instabilität dieser Spezies. Die Halbwertszeit des OpuAA Zerfalls betrug 50 ± 10 min. In FRET Experimenten wurden ähnliche Werte erhalten (10 - 20 min). Die Kinetik des Zerfalls kann *in vivo*, d.h. in Gegenwart der kognativen TMDs, um mehrere Größenordnungen beschleunigt werden (Axelrod & Wang, 1994). Diese Daten implizieren jedoch, dass die beobachteten thermodynamischen Abläufe bereits in den isolierten NBDs vorhanden sind.

4.4.3 Energetische Betrachtung und Modell für die *in vivo* Situation

Das in Kapitel 4.4.2 beschriebene Szenario impliziert, dass das OpuAA/ADP/Mg²⁺ Dimer eine thermodynamisch instabile Konformation besitzt. Die Differenz der freien Enthalpie zwischen dem OpuAA/ATP/Mg²⁺ und OpuAA/ADP/Mg²⁺ Dimer konnten abgeschätzt werden, da die beiden Komplexe über einen Nukleotid-freien Zustand miteinander im Gleichgewicht stehen. Dabei wurden die K_D-Werte der beteiligten Gleichgewichte berücksichtigt und angenommen, dass die (zytosolische) *in vivo* ATP-Konzentration 1000 fach höher ist als die von ADP (Gleichung 19). Die nach Gleichung 19 vorgenommene Abschätzung der freien Enthalpiedifferenz zwischen dem OpuAA/ATP/Mg²⁺ und OpuAA/ADP/Mg²⁺ Dimer ergab bei 295 K einen Wert von +27 kJ/mol. Der berechnete Wert entspricht z.B. etwa der freien Standardenthalpie für die Hydrolyse von ATP und zeigt, dass die Konformation des OpuAA/ADP/Mg²⁺ Dimer im Vergleich zum OpuAA/ATP/Mg²⁺ Dimer eine höhere freie

Enthalpie aufweist. Diese theoretische Berechnung eröffnet die Überlegung, dass ein Teil der durch ATP Hydrolyse gewonnenen freien Enthalpie in einer hochenergetischen Konformation des OpuAA/ADP/Mg²⁺ Dimers gespeichert werden kann.

$$\begin{aligned} \Delta G_{D \rightarrow ATP_2 \rightarrow D \rightarrow ADP_2} &= -RT \ln \frac{D \cdot ADP_2}{D \cdot ATP_2} \\ &= RT \ln \left[\frac{M \cdot ADP^2}{D \cdot ADP_2} \cdot \frac{M \cdot ADP}{M \cdot ADP} \cdot \frac{D}{M^2} \cdot \frac{D \cdot ATP_2}{D \cdot ATP^2} \cdot \frac{ATP^2}{ADP^2} \right] \end{aligned} \quad \text{Gleichung 19}$$

Im Hinblick auf die diskutierten Aspekte ist ein OpuAA Dimer plausibel, der über die RD und die ABC-Domäne beider Monomere überbrückt ist. Die Interaktion von OpuAA mit seiner kognativen TMD, (OpuAB)₂, stabilisiert das Dimer zusätzlich, so dass im Nukleotid-freien Zustand ein semi-offener OpuAA Dimer vorliegt. Das in Lösung an der isolierten NBD OpuAA beobachtete Nukleotid-abhängige Monomer-Dimer Gleichgewicht reflektiert so eine Modulation der Dimer-Interaktionsfläche der ABC-Domänen. Dabei modulieren Nukleotid-induzierte Konformationsänderungen attraktive und repulsive Kräfte der Interaktion. Ein dramatischer Verlust an attraktiven Kräfte in Gegenwart von ADP/Mg²⁺ führt zu einer Reorientierung der NBDs an der TMD z. B. durch eine Öffnung des OpuAA Dimers. Dies könnte ein Signal zum Import des Substrates repräsentieren. Ein solcher Mechanismus wurde beispielsweise für BtuCD postuliert, bei dem NBD und TMD über die L-Schleufe und die Q-Schleufe miteinander in Wechselwirkung stehen und damit Veränderungen der Dimer-Interaktionsfläche von BtuD direkt an BtuC weitergeleitet werden (Locher *et al.*, 2002).

Ein weiteres Beispiel für eine solche Interaktion von Membran-gebundenen Komponenten ist die Erkennung des T-Zell Rezeptors mit MHC Klasse II Molekülen (Matsui *et al.*, 1991). In diesem Fall war der K_D-Wert des Komplexes ebenfalls im niederen mikromolaren Bereich und ausreichend für eine Interaktion der Komponenten, die anschließend eine Signaltransduktion auslöst.

5 Ausblick

Das Ziel nachfolgender strukturbiochemischer und biochemischer Untersuchungen des osmoreaktiven ABC-Transporters OpuA aus *B. subtilis* sollte eine weitergehende Aufklärung seines Transportmechanismus sein. Damit könnte OpuA neben der Histidin-Permease und dem Maltose-Transporter als weitere Blaupause zum Verständnis von Substrat-Bindeprotein (SBP) abhängiger bakterieller ABC-Transporter dienen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Ermittlung der Kristallstruktur von OpuAC im Komplex mit seinen Substraten eine erste Grundlage für ein strukturelles Verständnis des OpuA-Transporters gelegt (Kapitel 3.6). Die Bestimmung der Kristallstrukturen der weiteren Komponenten des OpuA Transporters, dem Nukleotid-Bindeprotein (NBD) OpuAA und dem Transmembranprotein OpuAB, in isolierter Form oder als assemblierter Komplex sind daher die nächsten Ziele strukturbiochemischer Arbeiten. In diesem Zusammenhang ist die Architektur der Interaktionsfläche des dimeren OpuAA eine überaus interessante Frage. Die proteinchemischen Grundlagen für eine erfolgreiche Kristallisation wie z.B. Überexpression und Isolierung der Proteine (Kapitel 3.2), sowie Studien zu ihrer oligomeren Homogenität (Kapitel 3.3) wurden im Rahmen dieser Arbeit geleistet. Mit Hilfe dieser Informationen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Jenewein, 2003) bereits Kristallisationsbedingungen für OpuAA in Gegenwart von ADP/Mg²⁺ gefunden.

Auch Untersuchungen zur Interaktion der Komponenten des OpuA Transporters können zum weiteren Verständnis des katalytischen Mechanismus beitragen. So ist es noch unklar, ob OpuAA und OpuAB permanent assoziiert sind oder sich erst bei hyperosmolarem Stress assemblieren. Auch die Interaktion von OpuAC mit OpuAB, die den initialen Schritt im Translokationsprozess darstellt, bedarf genauerer Untersuchungen, da sie wahrscheinlich ein Signal zur Hydrolyse von ATP übermittelt. Für solche Untersuchungen eignen sich Methoden wie z.B. ELISA oder Oberflächen-Plasmonenresonanz (SPR), bei denen eine der Komponenten an einer Oberfläche immobilisiert ist, während der Interaktionspartner über die Oberfläche geleitet wird. In SPR Experimenten können das rekombinante OpuAA oder OpuAB mit Hilfe des Polyhistidin-tags am N- oder C-Terminus spezifisch und mit gewählter Orientierung auf eine Ni/NTA-Oberfläche immobilisiert werden. Andererseits eignet sich das Strep-tag zum immunchemischen Nachweis in ELISA Experimenten. Im Rahmen dieser Arbeit und einer Diplomarbeit (Jenewein, 2003) wurden diesbezüglich erste Vorarbeiten unternommen. In diesen Studien zeigte sich jedoch, dass eine unspezifische Wechselwirkung der Komponenten mit der jeweiligen Matrix aufgrund eines verstärkten Aggregationsverhaltens das Haupthindernis für eine quantitative Analyse war. Eine weitere Problematik in diesen Ansatz stellte die Gegenwart der Detergenzmizelle dar, die, wie auch

in ATPase Experimenten (Kapitel 3.4.) gezeigt wurde, einen Einfluss auf die Interaktion der Komponenten hat. Es erscheint daher für weitere Untersuchungen sinnvoll, OpuAB in Liposomen zu rekonstituieren und diese anschließend auf einer Oberfläche abzulagern, um die Wechselwirkung mit OpuAA oder OpuAC zu untersuchen. Solche Vorarbeiten zur Rekonstitution von OpuAB in Liposomen wurden bereits unternommen, und es gelang OpuAB in Detergenz-destabilisierte Liposomen zu inkorporieren, die erhaltenen Proteoliposomen mit Hilfe einer Sukroседichte-zentrifugation zu isolieren und OpuAB anschließend im *Western Blot* nachzuweisen. Mit Hilfe solcher Proteoliposomen kann die Transportaktivität des rekonstituierten Komplexes untersucht werden. Daraus können Parameter abgeleitet werden, die den Transport aktivieren und Rückschlüsse auf den Mechanismus erlauben. Andererseits können solche Untersuchungen interessante Fragestellungen wie Stöchiometrie von transportiertem Substrat zu verbrauchtem ATP oder Kinetik des Transportprozess adressieren.

Für die isolierte NBD OpuAA wurden im Rahmen dieser Arbeit Methoden etabliert, die es gestatteten Distanzänderungen zu detektieren oder die Nukleotidbindung an OpuAA zu analysieren. Damit wurde ein funktionales Wechselspiel zwischen Oligomerisierungsgrad und katalytischem Zustand der NBD nachgewiesen und Affinitäten von OpuAA/Nukleotid Komplexen bestimmt. Im Rahmen einer Kooperation mit J. Reinstein (MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund) wurde die Trp-Mutante des OpuAA darüber hinaus zur kinetischen Analyse, d.h. Bestimmung von Assoziationsratenkonstanten, der Bindung von ATP oder ADP mit Hilfe von „stopped flow“ Experimenten genutzt. In einem nächsten Schritt könnten diese Untersuchungen an dem intakten Transporter erfolgen, wobei die Hypothese besteht, dass die Gegenwart von OpuAB nicht nur das dimere OpuAA stabilisiert, sondern auch die Kinetik dieser Prozesse nachhaltig beeinflusst. Aber nicht nur die Interaktion der NBD während des Transportzyklus bietet interessante Aspekte: Auch die TMDs könnten z.B. mit Hilfe von FRET Untersuchungen auf potentielle Konformationsänderungen während der Translokation untersucht werden. Alternativ können Fluoreszenz-Sonden an TMD und NBD gekoppelt werden, um die Interaktion dieser beiden Untereinheiten und deren Signalübertragung während des Transportprozesses zu untersuchen.

Untersuchungen zur physiologischen Relevanz der potentiellen regulatorischen Domäne (RD) des OpuAA sind ein weiterer wichtiger Aspekt zukünftiger Arbeiten, und es ist in diesem Zusammenhang interessant, ob ein Interaktionspartner, analog zu der MalK-MalT Interaktion, identifiziert werden kann. Hierzu könnte man OpuAA mit Hilfe des N-terminalen His₆-tags immobilisieren und ein *B. subtilis* Zelllysate auf potentielle Interaktionspartner untersuchen. Andererseits könnte der Einfluss der RD auf das Oligomerisierungsverhalten von OpuAA durch Deletion der RD und nachfolgender Analyse des Monomer-Dimer Gleichgewichtes von OpuAA untersucht werden.

6 Appendix

Bindungsexperimente von OpuAA mit TNP-ATP:

In Gleichgewichtsbindungsexperimenten des OpuAA Monomers oder Dimers mit TNP-ATP setzte sich die Gesamtkonzentration des OpuAA (P_0) oder des TNP-ATP (L_0) jeweils aus der ungebundenen (freien) Spezies (P_{frei} and L_{frei}) und aus OpuAA/TNP-ATP Komplexen (PL_N) zusammen. Die Ligandenzahl (N) repräsentierte die Stöchiometrie der OpuAA/TNP-Nukleotid Komplexe (Gleichung Ia and Ib).

$$L_0 = L_{\text{frei}} + N \cdot PL_N \quad \text{Ia}$$

$$P_0 = P_{\text{frei}} + PL_N \quad \text{Ib}$$

Die Gesamtfluoreszenz des TNP-ATP (F_{total}) setzte sich aus der jeweiligen Fluoreszenz des ungebundenen TNP-ATP ($F_{L,\text{frei}}$) und aus OpuAA/TNP-ATP Komplexen (F_{PL_N}) gemäß Gleichung II zusammen.

$$F_{\text{total}} = F_{PL_N} + F_{L,\text{frei}} \quad \text{II}$$

Um konzentrationsabhängigen inneren Filtereffekten des TNP-ATP bei Konzentrationen $L_0 > 6 \mu\text{M}$ Rechnung zu tragen, wurden die spezifischen Fluoreszenzkonstanten Q_1 und Q_2 eingeführt. Die Fluoreszenz von OpuAA/TNP-ATP Komplexen (F_{PL_N}) wird im Vergleich zu ungebundenem TNP-ATP mehrfach erhöht und kann mit einem Fluoreszenz-erhöhungsfaktor \square beschrieben werden (Gleichungen IIIa and IIIb).

$$F_{L,\text{frei}} = L_{\text{frei}} \cdot Q_1 + L_{\text{frei}}^2 \cdot Q_2 \quad \text{IIIa}$$

$$F_{PL_N} = N \cdot PL_N \cdot Q_1 \cdot \square \quad \text{IIIb}$$

Die Gleichungen Ia, II, IIIa und IIIb wurden kombiniert und ergaben Gleichung IV.

$$F_{\text{total}} = L_0 \cdot Q_1 + L_0^2 \cdot Q_2 + N \cdot PL_N \cdot (Q_1 \cdot (\square \square 1) \square 2 \cdot L_0 \cdot Q_2) \quad \text{IV}$$

Die Konzentration der OpuAA/TNP-ATP Komplexe (PL_N) konnte gemäß des Massenwirkungsgesetzes mit Hilfe der Dissoziationskonstanten (K_{DL}) berechnet werden. Dabei wurde eine nicht-kooperative Bindung, d. h. eine gleiche Affinität der Bindungsstellen für TNP-ATP, angenommen (Gleichung V oder VI).

$$K_{DL} = \frac{L_{\text{frei}} \cdot P_{\text{frei}}}{PL_N} = \frac{(L_0 \square N \cdot PL_N) \cdot (P_0 \square PL_N)}{PL_N} \quad \text{V}$$

$$N \cdot PL_N = \frac{1}{2} \left[(K_{DL} + L_0 + N \cdot P_0) \square \sqrt{(K_{DL} + L_0 + N \cdot P_0)^2 \square 4 \cdot N \cdot P_0 \cdot L_0} \right] \quad \text{VI}$$

Die Gleichungen VI und IV wurden kombiniert und ergaben Gleichung 8 (siehe Material und Methoden), die zur Analyse der Fluoreszenztitration des OpuAA mit TNP-ATP genutzt wurde.

Kompetitionsexperimente:

Zur Auswertung der Competitionsexperimente von OpuAA/TNP-ATP Komplexen mit AXP wurden zwei unabhängige Gleichgewichte angenommen (Gleichungen VIIa und VIIb).

$$K_{D_L} = \frac{(L_0 - N \cdot PL_N) \cdot (P_0 - PL_N)}{PL_N}, [AXP] = 0 \quad \text{V}$$

$$K_{D_L} = \frac{(L_0 - N \cdot PL_N) \cdot (P_0 - PL_N - PAXP)}{PL_N}, [AXP] \neq 0 \quad \text{VIIa}$$

$$K_{D_{AXP}} = \frac{AXP_0 \cdot (P_0 - PL_N - PAXP)}{PAXP}, [AXP] \neq 0, \text{ da } [AXP]_0 \gg P_0 \quad \text{VIIb}$$

Die Gleichungen V, VIIa und VIIb wurden kombiniert und ergaben Gleichung 10 (siehe Material und Methoden). Die Gleichung 10 wurde mit der Annahme von Gleichung VIII zur Analyse der normalisierten Fluoreszenzdaten der Competitionsexperimente benutzt.

$$\frac{F_{PL_N, AXP \neq 0}}{F_{PL_N, AXP = 0}} = \frac{F_{tot, AXP \neq 0} - F_{buffer, AXP \neq 0}}{F_{tot, AXP = 0} - F_{buffer, AXP = 0}} \quad \text{VIII}$$

Zerfall des OpuAA Dimers:

Der Zerfall des dimeren OpuAA ([D]) bei 150 mM NaCl wurde gemäß des kinetischen Modells einer bimolekularen Gleichgewichtsreaktion analysiert (Gleichung IX). Die Integration ergab Gleichung 3a (siehe Kapitel 2.4.1.5).

$$\frac{d[D]}{dt} = -k_{off} \cdot [D] + k_{on} \cdot [M]^2; c_0 = 2 \cdot [D] + [M] \quad \text{IX}$$

Einfluss der Ionenstärke auf die K_D -Werte von Protein/Ligand Komplexen (PL), wenn sowohl Protein (P), als auch Ligand (L) eine geladene Spezies ist:

Die Aktivität einer Spezies i (a_i) ist das Produkt aus der Konzentration $[i]$ und dem Aktivitätskoeffizient (γ). Damit kann die Dissoziationskonstante (K_D) gemäß dem Massenwirkungsgesetz nach Gleichung X formuliert werden (Robinson & Stokes, 1970).

$$K_D = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]} = \frac{a_P \cdot a_L}{a_{PL}} \cdot \frac{\gamma_{PL}}{\gamma_P \cdot \gamma_L} = K_0 \cdot \frac{\gamma_{PL}}{\gamma_P \cdot \gamma_L} \quad \text{X}$$

Der Aktivitätskoeffizient der Spezies i (γ_i) ist gemäß dem Debye-Hückel Grenzgesetz (Debye & Hückel, 1923) von seiner Ladung (z_i) und der Ionenstärke (I) abhängig (Gleichung XI). Gleichung X und XI können zu Gleichung XII vereint werden.

$$\log \gamma_i = -0,508 \cdot \sqrt{\frac{I}{\text{mol}}} \cdot z_i^2 \cdot \sqrt{I}, \text{ mit } i = P, L, PL \quad \text{XI}$$

$$\log \frac{K_D}{K_0} = -0,5 \sqrt{\frac{I}{\text{mol}}} \cdot (z_{PL}^2 - z_P^2 - z_L^2) \cdot \sqrt{I} \quad \text{XII}$$

Es gilt ferner, dass die Ladung des Protein/Ligand Komplexes (z_{PL}) näherungsweise gleich der Summe aus der Ladung von Ligand (z_L) und Protein (z_P) ist. Damit kann Gleichung XII zu Gleichung XIII vereinfacht werden.

$$\log \frac{K_D}{K_0} \approx -z_P \cdot z_L \cdot \sqrt{I} \quad \text{XIII}$$

7 Literatur

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., *et al.* (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**, 621-628.
- Aguilar-Bryan, L., Clement, J.P.T., Gonzalez, G., *et al.* (1998) Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. *Physiol. Rev.*, **78**, 227-245.
- Aleksandrov, L., Aleksandrov, A.A., Chang, X.B., *et al.* (2002) The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover. *J. Biol. Chem.*, **277**, 15419-15425.
- Allikmets, R., Shroyer, N.F., Singh, N., *et al.* (1997) Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science*, **277**, 1805-1807.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., *et al.* (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402.
- Ames, G.F., Mimura, C.S., Holbrook, S.R., *et al.* (1992) Traffic ATPases: a superfamily of transport proteins operating from *Escherichia coli* to humans. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **65**, 1-47.
- Ames, G.F.-L. (1992) Bacterial periplasmic permeases as a model system for the superfamily of traffic ATPases, including the multidrug resistance protein and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Int. Rev. Cytol.*, **137A**, 1-35.
- Axelrod, D. & Wang, M.D. (1994) Reduction-of-dimensionality kinetics at reaction-limited cell surface receptors. *Biophys. J.*, **66**, 588-600.
- Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., *et al.* (1994) PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2206-2214.
- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**, 411-421.
- Baneyx, F. & Georgiou, G. (1990) *In vivo* degradation of secreted fusion proteins by the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J. Bacteriol.*, **172**, 491-494.
- Bass, R.B., Strop, P., Barclay, M., *et al.* (2002) Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science*, **298**, 1582-1587.
- Bastiaens, P.I., van Hoek, A., Benen, J.A., *et al.* (1992) Conformational dynamics and intersubunit energy transfer in wild-type and mutant lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. A multidimensional time-resolved polarized fluorescence study. *Biophys. J.*, **63**, 839-853.
- Benabdelhak, H., Kiontke, S., Horn, C., *et al.* (2003) A specific interaction between the NBD of the ABC-transporter HlyB and a C-terminal fragment of its transport substrate haemolysin A. *J. Mol. Biol.*, **327**, 1169-1179.
- Benabdelhak, H., Schmitt, L., Horn, C., *et al.* (2004) The ABC-ATPase domain of HlyB *in vitro* displays activity with positive cooperativity, but dimers appear highly unstable. submitted.
- Bhairi, S.M. (1979) A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry. La Jolla, Calbiochem.
- Biemans-Oldehinkel, E. & Poolman, B. (2003) On the role of the two extracytoplasmic substrate-binding domains in the ABC transporter OpuA. *EMBO J.*, **22**, 5983-5993.

- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Bishop, L., Agbayani, R., Jr., Ambudkar, S.V., *et al.* (1989) Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6953-6957.
- Bjorkman, A.J., Binnie, R.A., Zhang, H., *et al.* (1994) Probing protein-protein interactions. The ribose-binding protein in bacterial transport and chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 30206-30211.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J., *et al.* (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.*, **136**, 175-179.
- Bohm, A., Diez, J., Diederichs, K., *et al.* (2002) Structural model of MalK, the ABC subunit of the maltose transporter of *Escherichia coli*: implications for mal gene regulation, inducer exclusion, and subunit assembly. *J. Biol. Chem.*, **277**, 3708-3717.
- Boos, W. & Shuman, H. (1998) Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 204-229.
- Borths, E.L., Locher, K.P., Lee, A.T., *et al.* (2002) The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16642-16647.
- Bouvier, J., Bordes, P., Romeo, Y., *et al.* (2000) Characterization of OpuA, a glycine-betaine uptake system of *Lactococcus lactis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **2**, 199-205.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., *et al.* (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.*, **22**, 336-345.
- Brown, A.D. (1976) Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.*, **40**, 803-846.
- Brown, A.D. (1978) Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.*, **17**, 181-242.
- 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., Adams, P.D., Clore, G.M., *et al.* (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D*, **54**, 905-921.
- Chang, G. & 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.
- Chang, G., Spencer, R.H., Lee, A.T., *et al.* (1998) Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science*, **282**, 2220-2226.
- Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., *et al.* (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, **47**, 381-389.
- Chen, J., Lu, G., Lin, J., *et al.* (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., Quioco, F.A., *et al.* (2001) Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1525-1530.
- Chen, J.H., Chang, X.B., Aleksandrov, A.A., *et al.* (2002) CFTR is a monomer: biochemical and functional evidence. *J. Membr. Biol.*, **188**, 55-71.
- Clarke, T.E., Ku, S.Y., Dougan, D.R., *et al.* (2000) The structure of the ferric siderophore binding protein FhuD complexed with gallichrome. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 287-291.

- Cohen, S.N., Chang, A.C. & Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2110-2114.
- Cornish, V.W., Benson, D.R., Altenbach, C.A., *et al.* (1994) Site-specific incorporation of biophysical probes into proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2910.
- Dassa, E. & Hofnung, M. (1985) Sequence of gene *malG* in *E. coli* K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. *EMBO J.*, **4**, 2287-2293.
- Davidson, A.L. (2002) Mechanism of coupling of transport to hydrolysis in bacterial ATP-binding cassette transporters. *J. Bacteriol.*, **184**, 1225-1233.
- Davidson, A.L., Laghaeian, S.S. & Mannering, D.E. (1996) The maltose transport system of *Escherichia coli* displays positive cooperativity in ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, **271**, 4858-4863.
- Davidson, A.L. & Nikaido, H. (1990) Overproduction, solubilization, and reconstitution of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 4254-4260.
- Davidson, A.L. & Sharma, S. (1997) Mutation of a single MalK subunit severely impairs maltose transport activity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **179**, 5458-5464.
- Davidson, A.L., Shuman, H.A. & Nikaido, H. (1992) Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2360-2364.
- Dean, D.A., Hor, L.I., Shuman, H.A., *et al.* (1992) Interaction between maltose-binding protein and the membrane-associated maltose transporter complex in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **6**, 2033-2040.
- Dean, M., Rzhetsky, A. & Allikmets, R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.*, **11**, 1156-1166.
- Debye, P. & Hückel, E. (1923) Zur Theorie der Elektrolyte. I. Gefrierpunktserniedrigung und verwandte Erscheinungen. *Physik. Z.*, **24**, 185-208.
- Dick, L.R., Moomaw, C.R., Pramanik, B.C., *et al.* (1992) Identification and localization of a cysteinyl residue critical for the trypsin-like catalytic activity of the proteasome. *Biochemistry*, **31**, 7347-7355.
- Diederichs, K., Diez, J., Greller, G., *et al.* (2000) Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *EMBO J.*, **19**, 5951-5961.
- Doublet, S. (1997) Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods Enzymol.*, **276**, 523-530.
- Drenth, J. (1999) Principles of Protein X-Ray Crystallography. New York, Springer.
- Faller, L.D. (1989) Competitive binding of ATP and the fluorescent substrate analogue 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)cyclohexadienylidene adenosine 5'-triphosphate to the gastric H⁺,K⁺-ATPase: evidence for two classes of nucleotide sites. *Biochemistry*, **28**, 6771-6778.
- Fetsch, E.E. & Davidson, A.L. (2003) Maltose transport through the inner membrane of *E. coli*. *Front. Biosci.*, **8**, 652-660.
- Finean, J.B., Coleman, R. und Michell, R.H. (1984) Membranes and Their Cellular Functions, Blackwell.
- Fling, S.P. & 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.
- Förster, T. (1948) Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.*, **2**, 55-75.

- Galinski, E.A. (1995) Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, **37**, 272-328.
- Gaudet, R. & Wiley, D.C. (2001) Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J.*, **20**, 4964-4972.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326.
- Gottesman, M.M. & Ambudkar, S.V. (2001) Overview: ABC transporters and human disease. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 453-458.
- Gottesman, M.M., Pastan, I. & Ambudkar, S.V. (1996) P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **6**, 610-617.
- Green, W.N. & Andersen, O.S. (1991) Surface charges and ion channel function. *Annu. Rev. Physiol.*, **53**, 341-359.
- Greller, G., Horlacher, R., DiRuggiero, J., *et al.* (1999) Molecular and biochemical analysis of MalK, the ATP-hydrolyzing subunit of the trehalose/maltose transport system of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20259-20264.
- Greller, G., Riek, R. & Boos, W. (2001) Purification and characterization of the heterologously expressed trehalose/maltose ABC transporter complex of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 4011-4018.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., *et al.* (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J. Bacteriol.*, **177**, 4121-4130.
- Haardt, M., Kempf, B., Faatz, E., *et al.* (1995) The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.*, **246**, 783-786.
- Heidecker, M., Yan-Marriott, Y. & Marriott, G. (1995) Proximity relationships and structural dynamics of the phalloidin binding site of actin filaments in solution and on single actin filaments on heavy meromyosin. *Biochemistry*, **34**, 11017-11025.
- Hendrickson, W.A., Smith, J.L., Phizackerley, R.P., *et al.* (1988) Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation. *Proteins*, **4**, 77-88.
- Higgins, C.F. (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview. *Res. Microbiol.*, **152**, 205-210.
- Higgins, C.F., Haag, P.D., Nikaido, K., *et al.* (1982) Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature*, **298**, 723-727.
- Hochuli, E. (1988) Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J. Chromatogr.*, **444**, 293-302.
- Holland, I.B. & 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.
- Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D.S., *et al.* (2000) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell*, **101**, 789-800.
- Hor, L.I. & Shuman, H.A. (1993) Genetic analysis of periplasmic binding protein dependent transport in *Escherichia coli*. Each lobe of maltose-binding protein interacts with a different subunit of the MalFGK₂ membrane transport complex. *J. Mol. Biol.*, **233**, 659-670.

- Hou, Y.X., Cui, L., Riordan, J.R., *et al.* (2002) ATP binding to the first nucleotide-binding domain of multidrug resistance protein MRP1 increases binding and hydrolysis of ATP and trapping of ADP at the second domain. *J. Biol. Chem.*, **277**, 5110-5119.
- Hsiao, C.D., Sun, Y.J., Rose, J., *et al.* (1996) The crystal structure of glutamine-binding protein from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **262**, 225-242.
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., *et al.* (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, **396**, 703-707.
- Hunke, S., Mourez, M., Jehanno, M., *et al.* (2000) ATP modulates subunit-subunit interactions in an ATP-binding cassette transporter (MalFGK₂) determined by site-directed chemical cross-linking. *J. Biol. Chem.*, **275**, 15526-15534.
- Janas, E., Hofacker, M., Chen, M., *et al.* (2003) The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ABC transporter Mdl1p. *J. Biol. Chem.*, **278**, 26862-26869.
- Jenewein, S. (2003) Biophysikalische Untersuchungen der Nukleotid-Bindedomäne des osmoregulierten ABC-Transporters OpuA aus *Bacillus subtilis*. *Diplomarbeit, J. W. Goethe Universität Frankfurt*.
- Johnson, D.A., Leathers, V.L., Martinez, A.M., *et al.* (1993) Fluorescence resonance energy transfer within a heterochromatic cAMP-dependent protein kinase holoenzyme under equilibrium conditions: new insights into the conformational changes that result in cAMP-dependent activation. *Biochemistry*, **32**, 6402-6410.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., *et al.* (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A*, **47**, 110-119.
- Jung, K., Hamann, K. & Revermann, A. (2001) K⁺ stimulates specifically the autokinase activity of purified and reconstituted EnvZ of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 40896-40902.
- Jung, K., Veen, M. & Altendorf, K. (2000) K⁺ and ionic strength directly influence the autophosphorylation activity of the putative turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 40142-40147.
- Kaback, H.R. (1986) Active transport in *Escherichia coli*: passage to permease. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **15**, 279-319.
- Kappes, R.M., Kempf, B. & Bremer, E. (1996) Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J. Bacteriol.*, **178**, 5071-5079.
- Kappes, R.M., Kempf, B., Kneip, S., *et al.* (1999) Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **32**, 203-216.
- Karle, J. (1989) Direct methods in protein crystallography. *Acta Crystallogr. A*, **45**, 765-781.
- Karpowich, N., Martsinkevich, O., Millen, L., *et al.* (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., *et al.* (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.
- Kellermann, O.K.a.F., T. (1982) *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press.
- Kempf, B. & Bremer, E. (1995) OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16701-16713.

- Kempf, B. & Bremer, E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.*, **170**, 319-330.
- Kempf, B., Gade, J. & Bremer, E. (1997) Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *J. Bacteriol.*, **179**, 6213-6220.
- Kennedy, K.A. & Traxler, B. (1999) MalK forms a dimer independent of its assembly into the MalFGK₂ ATP-binding cassette transporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 6259-6264.
- Korndorfer, I.P., Beste, G. & Skerra, A. (2003) Crystallographic analysis of an "anticalin" with tailored specificity for fluorescein reveals high structural plasticity of the lipocalin loop region. *Proteins*, **53**, 121-129.
- Koronakis, V., Hughes, C. & Koronakis, E. (1993) ATPase activity and ATP/ADP-induced conformational change in the soluble domain of the bacterial protein translocator HlyB. *Mol. Microbiol.*, **8**, 1163-1175.
- Kraut, J. (1988) How do enzymes work? *Science*, **242**, 533-540.
- Kundig, W., Ghosh, S. & Roseman, S. (1964) Phosphate Bound to Histidine in a Protein as an Intermediate in a Novel Phospho-Transferase System. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **52**, 1067-1074.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, **390**, 249-256.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lakowicz, J.R. (1999) Principles of fluorescence spectroscopy. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Lane, R.J. & Watmough, N.J. (1984) Measurement of phosphate concentration in the presence of very labile phosphate esters. *Anal. Biochem.*, **140**, 424-427.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., *et al.* (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.*, **26**, 283-291.
- le Maire, M., Champeil, P. & Moller, J.V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1508**, 86-111.
- Ledvina, P.S., Tsai, A.L., Wang, Z., *et al.* (1998) Dominant role of local dipolar interactions in phosphate binding to a receptor cleft with an electronegative charge surface: equilibrium, kinetic, and crystallographic studies. *Protein Sci.*, **7**, 2550-2559.
- Lewis, H.A., Buchanan, S.G., Burley, S.K., *et al.* (2004) Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J.*, **23**, 282-293.
- Li, A.J. & 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.
- Lien, L., Ananda, P., Seneviratne, K., *et al.* (2002) Site-Specific biosynthetic incorporation of a fluorescent tag into proteins via cysteine-tRNA(Cys). *Anal. Biochem.*, **307**, 252-257.
- Linton, K.J. & Higgins, C.F. (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol.*, **28**, 5-13.
- Liu, C.E. & Ames, G.F. (1997,b) Characterization of transport through the periplasmic histidine permease using proteoliposomes reconstituted by dialysis. *J. Biol. Chem.*, **272**, 859-866.

- Liu, C.E., Liu, P.Q. & Ames, G.F. (1997,a) Characterization of the adenosine triphosphatase activity of the periplasmic histidine permease, a traffic ATPase (ABC transporter). *J. Biol. Chem.*, **272**, 21883-21891.
- Liu, C.E., Liu, P.Q., Wolf, A., *et al.* (1999,a) Both lobes of the soluble receptor of the periplasmic histidine permease, an ABC transporter (traffic ATPase), interact with the membrane-bound complex. Effect of different ligands and consequences for the mechanism of action. *J. Biol. Chem.*, **274**, 739-747.
- Liu, P.Q., Liu, C.E. & Ames, G.F. (1999,b) Modulation of ATPase activity by physical disengagement of the ATP-binding domains of an ABC transporter, the histidine permease. *J. Biol. Chem.*, **274**, 18310-18318.
- Llopis, J., Westin, S., Ricote, M., *et al.* (2000) Ligand-dependent interactions of coactivators steroid receptor coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor binding protein with nuclear hormone receptors can be imaged in live cells and are required for transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4363-4368.
- Locher, K.P., Lee, A.T. & Rees, D.C. (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**, 1091-1098.
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., *et al.* (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, **108**, 1-6.
- Mannering, D.E., Sharma, S. & Davidson, A.L. (2001) Demonstration of conformational changes associated with activation of the maltose transport complex. *J. Biol. Chem.*, **276**, 12362-12368.
- Mao, B., Pear, M.R., McCammon, J.A., *et al.* (1982) Hinge-bending in L-arabinose-binding protein. The "Venus's-flytrap" model. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1131-1133.
- Martineau, P., Szmelcman, S., Spurlino, J.C., *et al.* (1990) Genetic approach to the role of tryptophan residues in the activities and fluorescence of a bacterial periplasmic maltose-binding protein. *J. Mol. Biol.*, **214**, 337-352.
- Matsui, K., Boniface, J.J., Reay, P.A., *et al.* (1991) Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science*, **254**, 1788-1791.
- Matthew, J.B. (1985) Electrostatic effects in proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **14**, 387-417.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T., *et al.* (1994) Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1911-1917.
- Milburn, M.V., Prive, G.G., Milligan, D.L., *et al.* (1991) Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science*, **254**, 1342-1347.
- Miller, D.M., 3rd, Olson, J.S., Pflugrath, J.W., *et al.* (1983) Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, **258**, 13665-13672.
- Mimura, C.S., Holbrook, S.R. & Ames, G.F. (1991) Structural model of the nucleotide-binding conserved component of periplasmic permeases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 84-88.
- Miroux, B. & Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.*, **260**, 289-298.
- Mitchell, P. (1990) Osmochemistry of solute translocation. *Res. Microbiol.*, **141**, 286-289.
- Momburg, F., Armandola, E.A., Post, M., *et al.* (1996) Residues in TAP2 peptide transporters controlling substrate specificity. *J. Immunol.*, **156**, 1756-1763.

- Moody, J.E., Millen, L., Binns, D., *et al.* (2002) Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J. Biol. Chem.*, **277**, 21111-21114.
- Morbach, S., Tebbe, S. & Schneider, E. (1993) The ATP-binding cassette (ABC) transporter for maltose/maltodextrins of *Salmonella typhimurium*. Characterization of the ATPase activity associated with the purified MalK subunit. *J. Biol. Chem.*, **268**, 18617-18621.
- Mourez, M., Hofnung, M. & 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.
- Mowbray, S.L. & Cole, L.B. (1992) 1.7 Å X-ray structure of the periplasmic ribose receptor from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **225**, 155-175.
- Mowbray, S.L. & Petsko, G.A. (1983) The X-ray structure of the periplasmic galactose binding protein from *Salmonella typhimurium* at 3.0 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **258**, 7991-7997.
- Murshudov, G.M., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. (1997) Refinement of Macromolecular structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallogr. D*, **53**.
- Murthy, H.M., Hendrickson, W.A., Orme-Johnson, W.H., *et al.* (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) *Acta Crystallogr. A*, **50**, 157-163.
- Nikaido, K. & Ames, G.F. (1999) One intact ATP-binding subunit is sufficient to support ATP hydrolysis and translocation in an ABC transporter, the histidine permease. *J. Biol. Chem.*, **274**, 26727-26735.
- Nikaido, K., Liu, P.Q. & Ames, G.F. (1997) Purification and characterization of HisP, the ATP-binding subunit of a traffic ATPase (ABC transporter), the histidine permease of *Salmonella typhimurium*. Solubility, dimerization, and ATPase activity. *J. Biol. Chem.*, **272**, 27745-27752.
- Norby, J.G. & Esmann, M. (1997) The effect of ionic strength and specific anions on substrate binding and hydrolytic activities of Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Gen. Physiol.*, **109**, 555-570.
- Oren, A., Haldal, M., Norland, S., *et al.* (2002) Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*, **6**, 491-498.
- Otto, H., Lamparter, T., Borucki, B., *et al.* (2003) Dimerization and Inter-Chromophore Distances of Cph1 Phytochrome from *Synechocystis*, as monitored by Fluorescence Homo and Hetero Energy Transfer. *Biochemistry*, **42**, 5885-5895.
- Otwinowski, Z.M., W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. London, Academic Press.
- Patzlaff, J.S., van der Heide, T. & Poolman, B. (2003) The ATP/substrate stoichiometry of the ATP-binding cassette (ABC) transporter OpuA. *J. Biol. Chem.*, **278**, 29546-29551.
- Paulusma, C.C., Bosma, P.J., Zaman, G.J., *et al.* (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science*, **271**, 1126-1128.
- Peter, H., Burkovski, A. & Kramer, R. (1998) Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 2567-2574.
- Petronilli, V. & Ames, G.F. (1991) Binding protein-independent histidine permease mutants. Uncoupling of ATP hydrolysis from transmembrane signaling. *J. Biol. Chem.*, **266**, 16293-16296.

- Pflugrath, J.W. & Quioco, F.A. (1988) The 2 Å resolution structure of the sulfate-binding protein involved in active transport in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.*, **200**, 163-180.
- Poolman, B., Blount, P., Folgering, J.H., *et al.* (2002) How do membrane proteins sense water stress? *Mol. Microbiol.*, **44**, 889-902.
- Powis, S.H., Mockridge, I., Kelly, A., *et al.* (1992) Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1463-1467.
- Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B., *et al.* (1992) Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, **256**, 385-387.
- Qu, Q. & Sharom, F.J. (2001) FRET analysis indicates that the two ATPase active sites of the P-glycoprotein multidrug transporter are closely associated. *Biochemistry*, **40**, 1413-1422.
- Qu, Q. & Sharom, F.J. (2002) Proximity of bound Hoechst 33342 to the ATPase catalytic sites places the drug binding site of P-glycoprotein within the cytoplasmic membrane leaflet. *Biochemistry*, **41**, 4744-4752.
- Quioco, F.A. & Ledvina, P.S. (1996) Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.*, **20**, 17-25.
- Record, M.T., Jr., Anderson, C.F. & Lohman, T.M. (1978) Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity. *Q. Rev. Biophys.*, **11**, 103-178.
- Record, M.T., Jr., Courtenay, E.S., Cayley, D.S., *et al.* (1998,b) Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 143-148.
- Record, M.T., Jr., Courtenay, E.S., Cayley, S., *et al.* (1998,a) Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 190-194.
- Reich-Slotky, R., Panagiotidis, C., Reyes, M., *et al.* (2000) The detergent-soluble maltose transporter is activated by maltose binding protein and verapamil. *J. Bacteriol.*, **182**, 993-1000.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, **245**, 1066-1073.
- Robinson, R.A. & Stokes, R.H. (1970) Elektrolyte solutions. London, Butterworth.
- Rosenberg, M.F., Velarde, G., Ford, R.C., *et al.* (2001) Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *EMBO J.*, **20**, 5615-5625.
- Rubenhagen, R., Morbach, S. & Kramer, R. (2001) The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K⁺. *EMBO J.*, **20**, 5412-5420.
- Saier, M.H., Jr. (1977) Bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems: structural, functional, and evolutionary interrelationships. *Bacteriol. Rev.*, **41**, 856-871.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., *et al.* (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Samanta, S., Ayvaz, T., Reyes, M., *et al.* (2003) Disulfide cross-linking reveals a site of stable interaction between C-terminal regulatory domains of the two MalK subunits in the maltose transport complex. *J. Biol. Chem.*, **278**, 35265-35271.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis t. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual".
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Sauna, Z.E. & Ambudkar, S.V. (2000) Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2515-2520.
- Savage, D.F., Egea, P.F., Robles-Colmenares, Y., *et al.* (2003) Architecture and Selectivity in Aquaporins: 2.5 Å X-Ray Structure of Aquaporin Z. *PLoS Biol.*, **1**, E72.
- Scheibner, K.A., Zhang, Z. & Cole, P.A. (2003) Merging fluorescence resonance energy transfer and expressed protein ligation to analyze protein-protein interactions. *Ann. Biochem.*, **317**, 226-232.
- Schiefner, A., Breed, J., Bösser, L., *et al.* (2003) 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.
- Schmees, G., Stein, A., Hunke, S., *et al.* (1999) Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein MalK. *Eur. J. Biochem.*, **266**, 420-430.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng.*, **6**, 109-122.
- Schmitt, L., Benabdelhak, H., Blight, M.A., *et al.* (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. & Tampe, R. (2000) Affinity, specificity, diversity: a challenge for the ABC transporter TAP in cellular immunity. *Chembiochem*, **1**, 16-35.
- Schmitt, L. & Tampe, R. (2002) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 754-760.
- Schneider, E., Wilken, S. & Schmid, R. (1994) Nucleotide-induced conformational changes of MalK, a bacterial ATP binding cassette transporter protein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20456-20461.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., *et al.* (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3381-3385.
- Senior, A.E., al-Shawi, M.K. & Urbatsch, I.L. (1998) ATPase activity of Chinese hamster P-glycoprotein. *Methods Enzymol.*, **292**, 514-523.
- Shani, N. & Valle, D. (1998) Peroxisomal ABC transporters. *Methods Enzymol.*, **292**, 753-576.
- Shapiro, A.B. & Ling, V. (1998) Stoichiometry of coupling of rhodamine 123 transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *Eur. J. Biochem.*, **254**, 189-193.
- Sharma, S. & Davidson, A.L. (2000) Vanadate-induced trapping of nucleotides by purified maltose transport complex requires ATP hydrolysis. *J. Bacteriol.*, **182**, 6570-6576.
- Sheldrick, G.M., Dauter, Z., Wilson, K.S., *et al.* (1993) *Acta Crystallogr. D*, **49**, 18-23.
- Shih, W.M., Gryczynski, Z., Lakowicz, J.R., *et al.* (2000) A FRET-based sensor reveals large ATP hydrolysis-induced conformational changes and three distinct states of the molecular motor myosin. *Cell*, **102**, 683-94.
- Singer, S.J. & Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.

- Smith, C.K., Baker, T.A. & Sauer, R.T. (1999) Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6678-6682.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., *et al.* (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell.*, **10**, 139-149.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., *et al.* (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
- Snyder, G.H., Cennerazzo, M.J., Karalis, A.J., *et al.* (1981) Electrostatic influence of local cysteine environments on disulfide exchange kinetics. *Biochemistry*, **20**, 6509-6519.
- Spiegelhalter, F. & Bremer, E. (1998) Osmoregulation of the opuE proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress-responsive promoters. *Mol. Microbiol.*, **29**, 285-296.
- Steinfelds, E., Orelle, C., Dalmas, O., *et al.* (2002) Highly efficient over-production in *E. coli* of YvcC, a multidrug-like ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1565**, 1-5.
- Stewart, R.C., VanBruggen, R., Ellefson, D.D., *et al.* (1998) TNP-ATP and TNP-ADP as probes of the nucleotide binding site of CheA, the histidine protein kinase in the chemotaxis signal transduction pathway of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **37**, 12269-12279.
- Story, R.M. & Steitz, T.A. (1992) Structure of the RecA protein-ADP complex. *Nature*, **355**, 374-376.
- Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 819-846.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Sukharev, S., Betanzos, M., Chiang, C.S., *et al.* (2001) The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature*, **409**, 720-724.
- Sutcliffe, I.C. & Russell, R.R. (1995) Lipoproteins of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.*, **177**, 1123-1128.
- Tame, J.R., Sleight, S.H., Wilkinson, A.J., *et al.* (1996) The role of water in sequence-independent ligand binding by an oligopeptide transporter protein. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 998-1001.
- Terwilliger, T.C. & Berendzen, J. (1999) Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr. D*, **55**, 849-861.
- Thoenges, D., Amler, E., Eckert, T., *et al.* (1999) Tight binding of bulky fluorescent derivatives of adenosine to the low affinity E₂ATP site leads to inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase. Analysis of structural requirements of fluorescent ATP derivatives with a Koshland-Nemethy-Filmer model of two interacting ATP sites. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1971-1978.
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509-544.
- Ueda, K., Cornwell, M.M., Gottesman, M.M., *et al.* (1986) The mdr1 gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **141**, 956-962.
- Urbatsch, I.L., Julien, M., Carrier, I., *et al.* (2000) Mutational analysis of conserved carboxylate residues in the nucleotide binding sites of P-glycoprotein. *Biochemistry*, **39**, 14138-14149.

- van der Heide, T. & 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. USA*, **97**, 7102-7106.
- van der Heide, T. & Poolman, B. (2002) ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep.*, **3**, 938-943.
- van der Heide, T., Stuart, M.C. & Poolman, B. (2001) On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *EMBO J.*, **20**, 7022-7032.
- van Veen, H.W., Margolles, A., Muller, M., *et al.* (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., *et al.* (1996) Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10668-10672.
- Verdon, G., Albers, S.V., Dijkstra, B.W., *et al.* (2003,a) 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., *et al.* (2003,b) Formation of the productive ATP-Mg²⁺-bound dimer of GlcV, an ABC-ATPase from *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.*, **334**, 255-267.
- von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R.M., *et al.* (1997) Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol. Microbiol.*, **25**, 175-187.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., *et al.* (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.
- Wang, R.C., Seror, S.J., Blight, M., *et al.* (1991) Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator, HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins. *J. Mol. Biol.*, **217**, 441-454.
- Warshel, A. & Russell, S.T. (1984) Calculations of electrostatic interactions in biological systems and in solutions. *Q. Rev. Biophys.*, **17**, 283-422.
- Weber, G. (1954) Dependence of polarization of the fluorescence on the concentration. *Trans. Faraday Soc.*, **50**, 552-555.
- Whatmore, A.M. & Reed, R.H. (1990) Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 2521-2526.
- Woldringh, C.L. (1994) Significance of plasmolysis spaces as markers for periseptal annuli and adhesion sites. *Mol. Microbiol.*, **14**, 597-607.
- Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., *et al.* (2001) Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **130**, 437-460.
- Wood, W.B. (1966) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J. Mol. Biol.*, **16**, 118-133.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., *et al.* (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3469-3478.
- Yan, D., Ikeda, T.P., Shauger, A.E., *et al.* (1996) Glutamate is required to maintain the steady-state potassium pool in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6527-6531.

- Yasuda, R., Masaïke, T., Adachi, K., *et al.* (2003) The ATP-waiting conformation of rotating F1-ATPase revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9314-9318.
- Yasunaga, T., Suzuki, Y., Ohkura, R., *et al.* (2000) ATP-induced transconformation of myosin revealed by determining three-dimensional positions of fluorophores from fluorescence energy transfer measurements. *J. Struct. Biol.*, **132**, 6-18.
- Yuan, Y.R., Blecker, S., Martsinkevich, O., *et al.* (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.
- Zukin, R.S., Hartig, P.R. & Koshland, D.E., Jr. (1977) Use of a distant reporter group as evidence for a conformational change in a sensory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1932-1936.

8 Abkürzungen

A	Akzeptor
AAC	Anionenaustauschchromatographie
ABC	engl. <i>ATP binding cassette</i>
AS	Aminosäure
BV	Bettvolumen
AC	Affinitätschromatographie
AP	Alkalische Phosphatase
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CFTR	engl. <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Cmc	engl. critical micelle concentration
D	Donor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E _{max}	Emissionsmaximum
E _T	Transfereffizienz
FRET	Förster Resonanz Energietransfer
GPC	Gelpermeationschromatographie
IMAC	Immobilisierte Metallionen Chromatographie
K _D	Dissoziationskonstante
KDa	Kilo Dalton
KD	katalytische Domäne
Kb	Kilo Basen
KS	Konsensussequenz
LDH	Laktat Dehydrogenase
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
MAD	engl. <i>multiple anomalous diffraction</i>
MBP	Maltose-Bindeprotein
M-D	Monomer-Dimer
Msc	engl. <i>mechano sensitive channel</i>
MWCO	engl. molecular weight cut off
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
OD	optische Dichte
Opu	engl. <i>osmoprotectant uptake</i>
Ori	engl. <i>origin of replication</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>

PI	Isoelektrischer Punkt
P/O	Promotor/Operator
PK	Pyruvat Kinase
RD	regulatorische Domäne
RBS	ribosmale Bindestelle
SD	Signaldomäne
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SBP	Substrat-Bindeprotein
<i>S. sulfatericus</i>	<i>Sulfolobus sulfatericus</i>
SV	Säulenvolumen
<i>T. litoralis</i>	<i>Thermococcus litoralis</i>
TMH	Transmembranhelix
TAP	engl. <i>transporter associated with antigen processing</i>
TMD	Transmembrandomäne
U	engl. Unit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

Abkürzungen für Chemikalien sind im Chemikalienverzeichnis angegeben.

Danksagung:

Ein sehr großes Dankeschön gilt meinem „Doktorvater“ Lutz Schmitt für die großartige Betreuung während meiner Doktorarbeit. Sein fortwährendes Interesse an meiner Arbeit, seine unkonventionelle Art und seine prima Ideen haben mich sehr unterstützt und mich immer motiviert, vor allem wenn es mal nicht so rund lief.

Bei Prof. Dr. Robert Tampé möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit im Institut für Biochemie durchführen zu können. Bei Prof. Dr. Erhard Bremer möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und wertvolle Tips im „osmo-business“ bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Kollegen und Mitstreitern Nils Hanekop, Robert Ernst, Stefan Jenewein, Christine Oswald und Jelena Zaitseva aus der AG Schmitt für die gute Stimmung und Zusammenarbeit im Labor bedanken. Ein besonders herzliches Dankeschön gilt Nils, der mit seiner netten Art nicht nur im Labor, sondern auch auf diversen Pharma- und Biochemikerfeten eine tolle Stimmung verbreitet hat.

Dank gebührt auch meinen Kollegen aus der Marburger Zeit, Stefan Kiontke und László Kranitz, sowie meinen Praktikanten Alex Wiedemann und Clemens Schneeweiss, die einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit in ihrem Praktikum geleistet haben.

Bei Dr. Jakob Piehler möchte ich für viele wertvolle Diskussionen über die Wissenschaft im Besonderen und die Weltliteratur im Allgemeinen bedanken.

Bei allen weiteren Mitgliedern der Arbeitskreise AG Tampé und AG Piehler möchte ich mich für die gute Zeit im Labor und in den diversen Sommerschulen bedanken.

Last, but not least,

möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung bedanken!!

Lo más, quiero agradecer a mi novia Raquel por su paciencia, su fé en mi y su amor. te amo!

Curriculum Vitae

Name: Carsten Andreas Horn

Geburstag und Ort: 27. Juni 1973, Frankfurt am Main

Nationalität: deutsch

Dissertation:

seit 01/2000 Doktorarbeit in der Nachwuchsgruppe von Dr. L. Schmitt, Institut für Biochemie, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main
„Biophysikalische und strukturelle Charakterisierung des ABC-Transporters OpuA aus *B. subtilis*“

Universitäre Ausbildung:

10/1993 – 05/1998 Studium der Chemie, Technische Universität Darmstadt
Abschluss: Dipl. Ing., Note: sehr gut

06/1998 – 12/1998 Diplomarbeit bei Prof. Dr. A. Skerra, Institut für Biochemie, Technische Universität Darmstadt
„Struktur- und Funktionsanalyse an rekombinanten Fragmenten des neuronalen Inhibitorproteins Nogo“

03/1999 – 12/1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. A. Skerra, Fakultät für Biologische Chemie, Technische Universität München

Industrie Praktika:

07/1997 – 09/1997 Forschungspraktikum bei New England BioLabs Inc., USA
„Molekularbiologische Methoden und Genomanalyse“

Konferenzen mit Posterbeiträgen:

Biophysical Society 47th Annual Meeting, März 2003, San Antonio, USA

3th FEBS Advanced Lecture Course ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Disease; März 2001, Gosau, Österreich

Publikationen:

C. Horn, E. Bremer und L. Schmitt

„Nucleotide dependent monomer/dimer equilibrium of OpuAA, the nucleotide-binding protein of the osmotically regulated ABC transporter OpuA from *Bacillus subtilis*“

J. Mol. Biol. (2003) 334; 403-419.

H. Benabdelhak, S. Kiontke, C. Horn, R. Ernst, M. A. Blight, I. B. Holland und L. Schmitt

„A specific interaction between the NBD of the ABC-transporter HlyB and a C-terminal fragment of its transport substrate haemolysin A“

J. Mol. Biol. (2003) 327; 1169-1179.

M. Fiedler, C. Horn, C. Bandtlow, M. E. Schwab und A. Skerra

„An engineered IN-1 F(ab) fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity“

Protein Eng. (2002) 15; 931-941.

L. Kranitz, H. Benabdelhak, C. Horn, M. A. Blight, I. B. Holland und L. Schmitt

„Crystallization and preliminary X-ray analysis of the ATP-binding domain of the ABC transporter haemolysin B from *Escherichia coli*“

Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. (2002) 58; 539-541.