

Untersuchung von Funktion, Dynamik und strukturellen Änderungen des Maltose-ABC-Transporters mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzdepolarisation

Boris Alexander Repen

2. April 2013

im Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin eingereichte
Dissertation

Erstgutachterin: Prof. Dr. Ulrike Alexiev

Zweitgutachter: Prof. Dr. Karsten Heyne

Datum der Disputation: 15. Mai 2013

Abstract

Adenosine triphosphate (ATP)-Binding-Cassette (ABC) membrane transporters convert energy from ATP binding and hydrolysis into conformational changes of the transporter to allow translocation of substrates across the membrane against the concentration gradient. Canonical ABC import systems require a substrate binding protein that functions as a receptor to capture the substrate and interact with the extra-cytoplasmic loop regions of the transporter to initiate transport. Despite the large amount of structural, biochemical and biophysical data it is not clear how the dynamical interplay between receptor and transporter is regulated by the availability of ATP and substrate. Fluorescence anisotropy decay measurements in combination with site-directed fluorescence labeling was used in this work to study the dynamics of the periplasmic surface of the *Echerichia coli/Salmonella typhimurium* maltose transporter MalFGK₂ and its periplasmic maltose binding protein MalE.

A labeling protocol for MalFGK₂ and MalE with fluorescein was optimized to yield fluorescently labeled proteins. The activity of the fluorescently labeled membrane transporter which together with MalE was then studied using ATP hydrolysis as an indicator. In order to quantify the liberated phosphate upon ATP hydrolysis, a commercially available malachite green assay was used. However, strong variations in phosphate concentration were measured when using the supplier's handling protocol. The protocol was therefore optimized by taking into account the effects mediated by glycerol, SDS, and fluorescent the label on the sample. As a result, highly reproducible phosphate concentration values under conditions optimal for solubilized membrane proteins were obtained.

Time-resolved fluorescence depolarization was used to study the dynamics and interaction of the large P2-loop in the transmembrane subunit MalF, as well as of the P1-loop and the P3-loop (scoop loop) in subunit MalG. The results were correlated with the dynamical changes in the two lobes of MalE. It was found that the P2-loop dynamics is fully decoupled from the transmembrane domain in the inward facing resting state of the transporter. MalE is able to interact with the transporter independent of ATP and maltose. Binding of ATP to the transporter and maltose binding to MalE induce specific and differential conformational changes in the two lobes of MalE. Strikingly, an immobilization of the P2-loop in the presence of unliganded MalE and absence of ATP, as well as in the presence of ATP and liganded MalE, was observed.

Kurzfassung

Adenosine triphosphate (ATP)-*Binding-Cassette* (ABC-)Transporter sind Membranproteine, die durch ATP-Hydrolyse und den damit verbundenen Konformationsänderungen den Transport von verschiedenen Substraten gegen ihren jeweiligen Konzentrationsgradienten ermöglichen. Kanonische ABC-Importer benötigen ein Substrat-Bindeprotein, welches als Rezeptor zum Einfangen des Substrats und zur Interaktion mit den extra-cytoplasmischen Loop-Regionen der transmembranen Domäne für die Initiierung des Transports benötigt wird. Trotz der hohen Anzahl an Struktur-, biochemischen und biophysikalischen Daten ist nicht eindeutig geklärt, wie die Regulation der Wechselwirkungen zwischen dem Substrat-Bindeprotein und dem Transporter durch die Verfügbarkeit von ATP und Substrat funktioniert. Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie-Zerfallsmessung in Kombination mit ortsspezifischem Fluoreszenz-Labeling wurde verwendet, um die Dynamik der periplasmatischen Oberfläche des Maltosetransporters MalFGK₂ und seinem periplasmatischen Maltose-Bindeproteins MalE von *Echerichia coli*/*Salmonella typhimurium* im Pikosekunden- und Nanosekundenbereich zu erforschen.

Hierzu wurde ein Labeling-Protokoll für die Fluoreszenzmarkierung von MalFGK₂ und MalE optimiert und die Aktivität des gelabelten Transporters über die ATP-Hydrolysefähigkeit getestet. Dafür wurde ein Malachitgrün-Assay zur Quantifizierung des durch die ATP-Hydrolyse freigesetzten Phosphats benutzt. Allerdings wurden hohe Variationen der Phosphatkonzentration bei Nutzung des Anwendungsprotokolls des Herstellers gemessen. Das Proktoll wurde deshalb unter Beachtung der Effekte, welche z. B. durch Glycerin, SDS und den Fluorszenzmarker verursacht werden, optimiert. Als Ergebnis konnten hoch reproduzierbare Phosphat-Konzentrationswerte unter optimalen Bedingungen für solubiliserte Membranproteine erzielt werden.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzdepolarisation wurde benutzt, um Informationen über die Dynamik und Interaktion des großen P2-Loops der transmembranen Untereinheit MalF, des P1-Loop und des P3-Loop (*scoop loop*) von der transmembranen Untereinheit MalG zu erhalten. Die Ergebnisse wurden dann mit den Dynamik-Veränderungen der beiden Bereiche von MalE korreliert. Dabei hat sich gezeigt, dass die Bewegung des P2-Loops im Grundzustand (*resting state*) von der Transmembrandomäne vollständig entkoppelt ist. Insbesondere wurde die Immobilisierung des P2-Loops in Anwesenheit von unbeladenen MalE und in Abwesenheit von ATP wie auch in der Anwesenheit von ATP und dem dem beladenen MalE beobachtet. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass MalE in der Lage ist mit dem Transporter unabhängig von ATP und Maltose zu interagieren. Darüber hinaus konnte eine differentielle Bindungsaffinität von MalE an den Transporter in Abhängigkeit von der Vefügbarkeit von Maltose über die Immobilisierung des P2-Loops detektiert werden. Bindung von ATP an den Transporter und Bindung von Maltose an MalE führt zu unterschiedlichen Konformationsänderungen in den beiden Segmenten von MalE.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	5
Kurzfassung	7
I. Grundlagen und Methoden	15
1. Einleitung	17
1.1. Zielsetzung und Lösungsansatz	18
1.1.1. Zeitaufgelöste Fluoreszenzdepolarisation	18
1.1.2. Ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung	19
1.1.3. Aktivitätstest für fluoreszenzmarkierte ABC-Transporter und das Maltose-Bindeprotein	19
2. Grundlagen	21
2.1. Biologische und biophysikalische Grundlagen	21
2.1.1. Transporterproteine	21
2.1.1.1. Substrat-Bindeproteine	23
2.1.2. ABC-Maltesetransporter	25
2.1.2.1. Substrat-Bindeprotein MalE	25
2.1.2.2. Transmembran-Domänen MalF und MalG	27
2.1.2.3. Nukleotid-Bindedomäne MalK-Dimer	27
2.1.3. Transportprozess des ABC-Maltesetransporters	28
2.1.3.1. Modell aus den gelösten Kristallstrukturen	28
2.1.3.2. Weitere Erkenntnisse aus biophysikalischen und bioche- mischen Verfahren	28
2.1.3.3. Erweitertes Transportmodell	30
2.2. Physikalische Grundlagen	32
2.2.1. Absorption	32
2.2.2. Fluoreszenz	34
2.2.3. Fluoreszenzlebensdauer	35

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.	Anisotropie	36
2.2.4.1.	Zeitabhängiger Anisotropiezerfall	38
2.2.5.	<i>Cone in a cone</i> Modell	41
3.	Material und Methoden	43
3.1.	Absorptionsspektroskopie	43
3.2.	Fluoreszenzspektroskopie	43
3.3.	Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung	43
3.4.	Messaufbau für die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	44
3.5.	Auswertung der zeitaufgelösten Fluoreszenz	47
3.6.	Probenpräparation	48
3.7.	Labeling der Cystein-Mutanten	49
3.8.	Aktivitätstest	49
3.8.1.	Standard-Bedingungen des Aktivitätstests mit Komplex in Detergens	50
3.8.2.	Standard-Bedingungen des Aktivitätstests mit Komplex in Proteoliposomen	50
3.9.	Herstellung von Proteoliposomen	51
II.	Ergebnisse	53
4.	Fluoreszenzmarkierung der Mutanten von MalE und MalFGK₂	55
4.1.	Fluorescein	55
4.2.	Labeling von MalF-T177C	56
4.3.	Labeling von weiteren MalFGK ₂ - und MalE-Mutanten	58
5.	Aktivitätsbestimmung von MalFGK₂	61
5.1.	ATPase-Aktivitätstests	61
5.2.	Malachitgrün-Verfahren: Kalibrierkurve	63
5.3.	Optimierung des Malachitgrün-Verfahrens für die Aktivitätsbestimmung des ABC-Transporters	65
5.4.	Kontrollmessungen	70
5.5.	Bestimmung der Transporter-Aktivität	72
5.5.1.	Übersicht der Aktivitätstests für die Transporter-Komplexvarianten	73
5.5.2.	Übersicht der Aktivitätstests für die MalE-Varianten	74

Inhaltsverzeichnis

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter	77
6.1. Messungen an der periplasmatischen Oberfläche	77
6.1.1. Vergleich der Anisotropie-Zerfallskurven in den verschiedenen Positionen im Grundzustand des Transportzyklus	80
6.1.2. Dynamik des P2-Loops (MalF) im Grundzustand des Transportzyklus	84
6.1.3. Dynamik des P2-Loops von MalF unter Transportbedingungen . .	85
6.1.3.1. Bindung von MalE/Dynamik des MalF-P2-Loops im MalE-gebundenen Zustand	85
6.1.3.2. MalF-P2-Loopdynamik bei der ATP-Hydrolyse	89
6.1.4. Dynamik des P1-Loops (MalG) unter Transportbedingungen . . .	91
6.1.5. Dynamik des P3-Loops der MalG Untereinheit unter Transportbedingungen	91
6.2. Messungen am Maltose-Bindeprotein MalE	93
7. Diskussion	99
7.1. Fluoreszenzmarkierung der Mutanten von MalE und MalFGK ₂	99
7.2. Aktivitätsbestimmung von MalFGK ₂	100
7.3. Proteindynamik und ihre Änderungen während des Transportprozesses . .	100
8. Zusammenfassung	109
Anhang	111
Publikationen und Veranstaltungen	115
Literaturverzeichnis	117
Selbstständigkeitserklärung	127
Danksagung	129

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-Binding-Cassette
ADC	Analog to Digital Converter
CFD	Constant Fraction Discriminator
DDM	n-Dodecyl- β -D-Maltosid
ATP	Adenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ESR	Elektronenspinresonanz
FWHM	Full Width at Half Maximum
IAF	Iodoacetamidofluorescein
IC	Internal Conversion
IRF	Instrument Response Functions
MCP	Multichannel-Plate-Photomultiplier-Tube
MD	Molekulardynamik
MDR	Multi Drug Resistance
NBD	Nukleotidbindedomäne
ND	Neutraldichte
OD	Optische Dichte
SBP	Substratbindeproteine
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAC	Time to Amplitude-Converter

Inhaltsverzeichnis

TCSPC	Time-Correlated Single Photon Counting
TMD	Transmembrandomänen
TRAP	tripartite ATP-independent transporter
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettstrahlung
VR	Vibrational Relaxation
wt	Wildtyp

Teil I.

Grundlagen und Methoden

1. Einleitung

ABC-Transporter sind Membranproteine, die für den aktiven Transport von verschiedenen Substraten über die Zellmembran zuständig sind. Sie existieren in Pro- und Eukaryoten und sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt. Zusätzlich zu den Transportaufgaben gehören noch die Kanalregulierung (Inagaki et al., 1995), Chromatin-Organisation (Hirano, 2006) und DNA-Reparatur (Hopfner et al., 2000; Davidson et al., 2008) zu ihren Funktionen. Die ABC-Transporter werden aufgrund ihrer gemeinsamen Struktur trotz unterschiedlicher Aufgaben einer Familie zugeordnet. Alle ABC-Transporter besitzen einen gemeinsamen Aufbau aus zwei Transmembrandomänen (TMD) und zwei Nukleotidbindedomänen (NBD). Die NBD werden auch als ATP-Bindungs-Kassette bezeichnet und sind für die ATP-Hydrolyse zuständig, welche die Energie für den Transportvorgang liefert.

Das Verständnis über die Funktionsweise und den Aufbau von ABC-Transportern ist nicht nur für die biologische Grundlagenforschung, sondern auch für verschiedene Aspekte der Medizinforschung relevant. Hierzu gehören die Forschung über Erbkrankheiten wie Mukoviszidose, Adrenoleukodystrophie oder Stargardtsche Makuladegeneration (Linton, 2007; Dean et al., 2001), sowie die Bekämpfung der Multi Drug Resistance (MDR) (Wu et al., 2011; Lage, 2003; Dawson and Locher, 2006). An all diesen Krankheiten sind ABC-Transporter direkt beteiligt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der strukturellen Dynamik und der daraus resultierenden Funktionsbeziehung des ABC-Maltesetransporters von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*, der als ein Modellsystem für ABC-Transporter gesehen wird und zu den meist erforschten ABC-Transportern gehört. Der ABC-Maltesetransporter besteht aus den Untereinheiten MalF und MalG für die TMD und dem MalK-Dimer für die NBD. Alle vier Untereinheiten bilden zusammen den MalFGK₂-Komplex. Zusätzlich gibt es ein im Periplasma frei bewegliches Substrat-Bindeproteine (SBP), welches aus der Untereinheit MalE besteht.

Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit liegt auf den Konformationsänderungen und der Dynamik der einzelnen Proteinsegmente an der Membranoberfläche. An der periplasmatischen Membranoberfläche findet die Bindung des mit Maltose beladenen SBP statt und über die Konformationsänderungen und die Dynamik der einzelnen Segmente an der Oberfläche können Rückschlüsse auf den Mechanismus des Transportvorgangs gezogen werden. Die Methoden der Biophysik ermöglichen eine Analyse von Proteindy-

1. Einleitung

namiken und Konformationsänderungen, und es ist von großem Interesse, diese während des Transportprozesses zu verstehen und daraus ein Modell für den Transportvorgang erstellen zu können.

Mit Hilfe verschiedener experimenteller Methoden konnten in vorangegangenen Arbeiten bereits Kenntnisse über den Vorgang und die Funktion verschiedener ABC-Transporter gewonnen werden. Zunächst ist hierbei die Kristallographie zu nennen. Gelöste Kristallstrukturen verschiedener ABC-Transporter in unterschiedlichen Transportzuständen konnten zum Verständnis der Funktionsweise beitragen. Insbesondere die Kristallstrukturen des ABC-Maltosetransporters gehören dazu (Oldham et al., 2007). Des Weiteren kommen noch Abstandsmessungen mit Hilfe von Elektronenspinresonanz (ESR)- und Cross-Linking-Experimenten hinzu (Daus et al., 2007a, 2009; Grote et al., 2009; Samanta et al., 2003; Orelle et al., 2008). All diese Methoden liefern in erster Linie Momentaufnahmen; Erkenntnisse über die Dynamik der einzelnen Segmente werden dabei nicht gewonnen. Die Fluoreszenzspektroskopie, insbesondere die zeitaufgelöste Fluoreszenzdepolarisation, ermöglicht eine genaue Analyse der Dynamik einzelner Proteinsegmente. Gerade die Kombination der bisher gewonnenen strukturellen Informationen und die neuen Kenntnisse über die Proteindynamik bringen ein besseres Verständnis der Funktionsweise des ABC-Maltosetransporters.

1.1. Zielsetzung und Lösungsansatz

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt, in Echtzeit die Dynamik des ABC-Maltosetransporters an jeder gewünschten Stelle an der Proteinoberfläche zu untersuchen und mit der Funktion des Transporters zu korrelieren. Speziell sollen die periplasmatische Oberfläche des ABC-Maltosetransporters und das SBP MalE untersucht werden. Dabei ist besonders die Bewegung und die Konformationsflexibilität der interhelikalen extramembranen Loops von Interesse, da sie eine entscheidende Rolle bei der Protein-Protein-Interaktion spielen. Es wurden die Änderungen in der Segmentdynamik des P2-Loops von MalF und die ebenfalls im Transportzyklus wichtigen Loops P1 und P3 von MalG und mehrerer Segmente von MalE während des gesamten Transportzyklus untersucht, das heißt in Anwesenheit von MalE, ATP und Maltose.

1.1.1. Zeitaufgelöste Fluoreszenzdepolarisation

Um die Dynamik von Protein-Oberflächensegmenten zu untersuchen, wird die Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzdepolarisation in Kombination mit ortsspezifischer Fluoreszenzmarkierung gewählt. Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie-Zerfallsmessungen sind zur Untersuchung von lokalen Dynamiken interhelikaler Loop-Domänen im Pikosekunden- und Nanosekundenbereich besonders geeignet (Kim et al., 2012). Diese Methode liefert

1. Einleitung

Informationen über die Bewegung und den Konformationsraum des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs (Munro et al., 1979; Juszczak et al., 1997; Alexiev et al., 2003), welcher von der Bewegung des Proteinsegments beeinflusst wird. Über die Anisotropiezerfallskurve lassen sich sowohl Informationen über globale und lokale Proteindynamiken als auch über die Proteinstrukturen und Konformationsänderungen gewinnen.

1.1.2. Ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung

Die Spezifität für ein gewünschtes Oberflächensegment (z. B. Loop, der zwei Transmembranhelices verbindet) wird durch ortsspezifisches Fluoreszenzlabeling erzielt. Dieses beinhaltet die Methode der zielgerichteten Mutagenese, bei der vorab ausgewählte Aminosäuren im Protein ersetzt werden. Diese Methode ermöglicht nicht nur die Funktionalität einzelner Sequenzabschnitte mit ihren Aminosäuren zu untersuchen, sondern auch Aminosäuren einzubauen, an denen ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden werden kann. Das Cystein ist eine solche Aminosäure, mit der es über die reaktive Thiolgruppe der Aminosäureseitenkette möglich ist, einen Fluoreszenzfarbstoff zu kovalent binden.

Die in dieser Arbeit für die fluoreszenzspektroskopischen Messungen verwendeten Mutanten des MalFGK₂-Komplexes und des SBP MalE wurden in der Arbeitsgruppe von Professor Schneider (Bakterienphysiologie) an der Humboldt-Universität zu Berlin hergestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die periplasmatischen Loops der TMD des Transporters und verschiedene ausgewählte Positionen an MalE zur Untersuchung der Dynamik des heteromeren ABC-Maltosetransporters und seiner Interaktion mit dem SBP MalE fluoreszenzmarkiert.

1.1.3. Aktivitätstest für fluoreszenzmarkierte ABC-Transporter und das Maltose-Bindeprotein

Eine Voraussetzung für die Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung des Transportvorgangs beim ABC-Transporter ist, dass seine Funktionalität durch die Fluoreszenzmarkierung nicht beeinträchtigt wird. Die funktionelle Aktivität des ABC-Transporters wird durch die Fähigkeit der ATP-Bindungs-Kassette unter Transportbedingungen ATP zu hydrolysieren, d. h. in Anwesenheit von Maltose und MalE, bestimmt (Daus et al., 2006; Nikaido et al., 1997). Die gängigen Verfahren zur Bestimmung der ATPase-Aktivität beruhen auf Farbttests, welche möglicherweise mit dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff interferieren können. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, um die ATPase-Aktivität von fluoreszenzmarkierten ABC-Transportern nachzuweisen. Dieses Verfahren wurde auf die Mutanten im markierten und nicht-markierten Zustand angewendet.

2. Grundlagen

2.1. Biologische und biophysikalische Grundlagen

2.1.1. Transporterproteine

Jede biologische Zelle wird von einer Zellmembran, die das innere Milieu der Zelle schützt, umschlossen. Transportproteine befinden sich in der Zellmembran und ermöglichen einen passiven oder aktiven Transport durch die Membran. Zu ihren Funktionen für die biologische Zelle gehören in erster Linie die Nahrungsaufnahme und die Entgiftung. Sie sind somit für das Überleben der biologischen Zelle essentiell.

Es wird zwischen dem passiven Transport durch Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten, wie z. B. bei Ionenkanälen und Aquaporinen, und dem aktiven Transport durch direkten oder indirekten Energieverbrauch gegen den Diffusionsgradienten, wie z. B. bei ABC-Transportern und Ionenpumpen, unterschieden. Bei dem passiven Transport handelt es sich um einen Spezialfall der Diffusion. Kanäle und passive Transporter erleichtern oder ermöglichen die Diffusion durch die Zellmembran. Somit können auch größere und geladene Moleküle wie Ionen, Aminosäuren, Zucker oder Nukleotide die Zellmembran entlang des Diffusionsgradienten durchdringen. Der aktive Transport hingegen erfolgt durch Energie, die von außen auf unterschiedliche Weise bereitgestellt wird. Bei der bereitgestellten Energie kann es sich um chemische Bindungsenergie (Hydrolyse von ATP oder Phosphoenolbrenztraubensäure) oder um elektrochemische Energie durch den Abbau des Ladungsgradienten über der Membran handeln (Krämer, 1994).

Transportproteine werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Primärstrukturen in verschiedene Familien untergliedert. Eine dieser Familien wird durch die ABC-Transporter gebildet (Hyde et al., 1990). Sie gehört zu einer der größten Proteinfamilien, wobei die Anzahl der identifizierten ABC-Transporter weiter zunimmt (Higgins, 1992).

ABC-Transporter können unter ATP-Hydrolyse den Transport von verschiedenen Stoffen wie zum Beispiel Ionen (Vergani et al., 2005), Zucker (Davidson et al., 1996), Steroiden (Swain et al., 2012), Aminosäuren (Ames et al., 2001), Lipiden (Quazi and Molday, 2011), Medikamenten (Di Pietro et al., 2002) und ganzen Proteinen (Holland et al., 1990) durchführen. Dabei können ABC-Transporter extrem selektiv und spezifisch sein oder auch ein diverses Substratspektrum besitzen (Deeley and Cole, 2006; Borst et al., 2006).

Es gibt zusätzlich noch Angehörige der Familie der ABC-Transporterkomplexe, die keine

2. Grundlagen

aktiven Transporter sind. Statt der Transportaufgaben können sie beispielsweise Kanäle regulieren (Inagaki et al., 1995), die Chromatin-Organisation (Hirano, 2006) oder Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Reparatur (Hopfner et al., 2000) übernehmen.

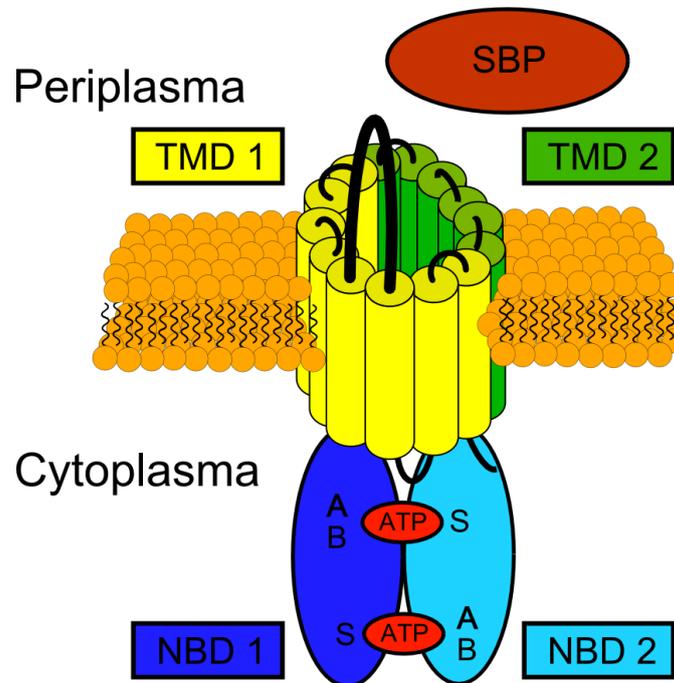


Abbildung 2.1.: **ABC-Maltesetransporter-Struktur** mit den TMD 1: MalF (gelb) und TMD 2: MalG (grün) in der Lipidmembran (orange), den NBD 1 und 2: MalK-Dimer (blau, cyan) im Cytoplasma sowie dem im Periplasma befindlichen SBP: MalE (braunrot). Acht α -helikale Segmente von MalF und sechs α -helikale Segmente von MalG durchspannen die Membran. Charakteristisch für den ABC-Maltesetransporter ist der große P2-Loop (schwarz) von MalF. Im MalK-Dimer befinden sich das Walker A-(A), Walker B-(B) und das Struktur-Motiv (S), die für die ATP-Bindung (rot) bedeutend sind.

Trotz ihrer unterschiedlichen Funktionen ähneln sich ABC-Transporter in ihrer Struktur, weshalb sie einer Familie zuzurechnen sind. Unabhängig von ihrer jeweiligen Aufgabe sind ABC-Transporter in den meisten Fällen durch vier Proteindomänen gekennzeichnet (Abbildung 2.1). Die zwei Membrandomänen, TMDs, bilden einen Translokationspfad durch die Membran. Die beiden weiteren Domänen (NBD) sind hydrophil, cytoplasmatisch assoziiert und sorgen durch ATP-Hydrolyse für die Konformationsänderung des Transporters (Higgins, 1992). In eukariotischen ABC-Transportern wurden bisher ausschließlich Exportsysteme gefunden; wohingegen sich in Prokaryoten auch Importsysteme befinden können, die allerdings ein zusätzliches Substrat-Bindeprotein für den Transport benötigen (Eitinger et al., 2011; Davidson et al., 2008). ABC-Importer können in zwei Unterkategorien des Typ 1 und Typ 2 eingeteilt werden (Locher, 2009). Ersterer beinhaltet

2. Grundlagen

kleinere Importer, wie den Maltose- oder den Molybdat-Transporter, welche im transmembralen Bereich 10-14 Helices besitzen. Dem zweiten Typ dagegen gehören größere Importer an, die TMDs mit bis zu 20 Helices besitzen und z. B. auf den Transport von Häm, Metallchelate und Vitamin B₁₂ spezialisiert sind (Davidson et al., 2008; Bordignon et al., 2010).

Bei beiden Typen bestehen SBP generell aus zwei symmetrischen Domänen, die durch eine gelenkartige Region verbunden sind. SBP werden seit Neuestem basierend auf ihrer dreidimensionalen Struktur in sechs Cluster klassifiziert (Berntsson et al., 2010). Eine detailliertere Darstellung dieser Einteilung erfolgt im nächsten Abschnitt.

2.1.1.1. Substrat-Bindeproteine

Die SBP existieren nur in bakteriellen ABC-Importern und sind für jedes Transportsystem spezifisch. Sie gehören zu den ersten Komponenten von ABC-Transportern, die identifiziert werden konnten und kristallographisch untersucht wurden (Pardee, 1968). Neben der Funktion, extrazelluläre Substrate zu binden und den Transportvorgang durch den Kontakt mit dem membranassoziierten Transportkomplex einzuleiten (Quiocho and Ledvina, 1996), sind Bindeproteine auch für die Signalerkennung bei der Chemotaxis von Bedeutung (McCleary et al., 1993). Die SBP von gram-negativen Bakterien liegen häufiger gelöst im Periplasma als gebunden an den Komplex vor (van der Heide and Poolman, 2002). Bei gram-positiven Bakterien und Archaea sind die über Lipid-Anker oder Transmembran-Peptide (bei Archea) mit dem Komplex verbunden (Gilson et al., 1988; Elferink et al., 2001).

Seit Berntsson et al. (2010) werden die SBP aufgrund ihrer Struktur in sechs verschiedene Cluster, wie sie in Abbildung 2.2 dargestellt sind, eingeteilt. Die SBP, die zu Cluster A gehören, spielen eine Rolle bei der Metallbindung und besitzen eine α -Helix (in Abbildung 2.2 A orange markiert), welche als unflexibles Gelenk zwischen beiden Domänen des SBP fungiert. Diese Verbindung gewährleistet eine starre Gesamtstruktur des Cluster A SBP. Zum Beispiel rotiert die offene Struktur von BtuF, dem SBP von BtuCD, einem ABC-Transporter für Vitamin B₁₂ aus *Escherichia coli*, nur um 4° vom offenen zum geschlossenen Zustand (Hvorup et al., 2007).

Cluster B beinhaltet SBP, die sowohl mit ABC-Transportern als auch mit *two-component histidine-sensory complexes* und *guanylate cyclase-atrial natriuretic peptide receptors* agieren können. Sie zeichnen sich durch drei Gelenke, welche die beiden Regionen des SBP verbinden, aus. Diese wurden in Abbildung 2.2 B orange hervorgehoben (Berntsson et al., 2010). Dieses Cluster ist von besonderem Interesse, da das in dieser Arbeit behandelte SBP MalE diesem Cluster zuzuordnen ist.

Zu Cluster C werden SBP gezählt, die mit 55 bis 70 kDa relativ groß im Vergleich zu anderen SBP sind und sehr unterschiedliche Liganden, wie z. B. Di- und Oligopeptide,

2. Grundlagen

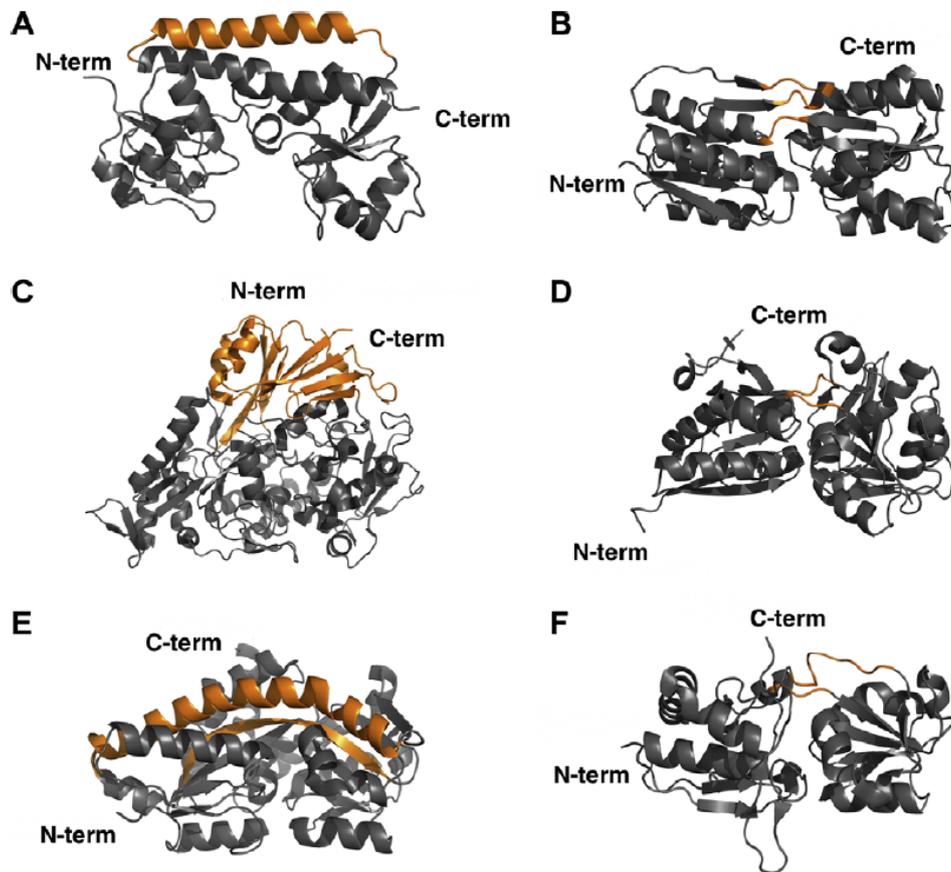


Abbildung 2.2.: Die verschiedenen Cluster der SBP mit ihren unterschiedlichen Merkmalen in Orange markiert. A) Cluster A beinhaltet Proteine mit einer einzelnen starren Helix als Verbindung der beiden Domänen. B) Cluster B beinhaltet SBP mit drei Verbindungssegmenten zwischen den beiden Domänen. C) Cluster C gehören SBP an, welche wesentlich größer sind als andere SBP und eine extra Domäne besitzen. D) Cluster D umfasst SBP mit zwei relativ kurzen Gelenken. E) Cluster E beinhaltet SBP zugehörig zu TRAP-Transportern, von denen alle eine große Helix als Gelenkregion besitzen. F) Zu Cluster F gehören SBP mit zwei Gelenken ähnlich wie bei Cluster D, allerdings haben diese Gelenke annähernd die doppelte Länge und erzeugen somit eine wesentlich höhere Flexibilität in den SBP. Folgende Proteine wurden verwendet um die Cluster A-F zu veranschaulichen: BtuF (PDB: 1N2Z), RBP (PDB: 1DRJ), OppA (PDB: 3DRF), ModA (PDB: 1ONR), UehA (PDB: 3FXB) und HisJ (PDB: 1HSL). Abbildung entnommen aus Berntsson et al. (2010).

Arginine, Nickel Ionen und Cellobiose, transportieren. Bezeichnend für diese SBP ist eine extra Domäne, die in Abbildung 2.2 D orange dargestellt wurde.

Die Strukturen der SBP aus Cluster D können ein breites Spektrum an Substraten binden und zeichnen sich durch zwei kurze, aus vier bis fünf Aminosäuren zusammengesetzten β -Faltblattstrukturen bestehende Gelenkregion aus (Berntsson et al., 2010).

Cluster E besteht nur aus SBP, die zur Familie der *tripartite ATP-independent trans-*

2. Grundlagen

porter (*TRAP*) gehören. Im Gegensatz zu den ABC-Transportern wird die benötigte Energie über den elektrochemischen Gradienten von H^+ oder Na^+ und nicht durch ATP bereitgestellt. Bezeichnend für die Struktur der TRAP SBP ist ein langes β -Faltblatt, welches zu der fünffachen β -Faltblattstruktur der Domäne gehört (orange markiert in Abbildung 2.2 E) (Berntsson et al., 2010).

Zu Cluster F gehören SBP mit zwei 8-10 Aminosäuren langen β -Faltblattstrukturen, die die Gelenkregion bilden (Abbildung 2.2 F) (Berntsson et al., 2010).

2.1.2. ABC-Maltosetransporter

Der ABC-Maltosetransporter ist ein sehr gut untersuchtes ABC-Transportersystem, an dem seit über drei Jahrzehnten geforscht wird und welches als Modellsystem für andere ABC-Transporter angesehen wird (Bordignon et al., 2010; Davidson and Maloney, 2007). Der Transporter dient der Aufnahme von Maltose- und Maltodextrin (bis zu sieben Glucoseeinheiten, welche über eine α - 1,4 -glycosidische Bindung miteinander gekoppelt sind) bei Enterobakterien z. B. *E.coli* und *Salmonella typhimurium* (Boos and Shuman, 1998; Davidson and Chen, 2004). Er besteht aus fünf Untereinheiten: den beiden Transmembrandomänen MalF und MalG, dem MalK-Dimer als katalytische Domäne und dem SBP MalE (Abbildung 2.1 und 2.3).

Es existieren mittlerweile mehrere Kristallstrukturanalysen des Transporters in unterschiedlichen Transportstadien, hinzu kommen insbesondere ESR-Messungen und biochemische Methoden, wie z. B. Cross-Linking-Experimente, die Aufschluss über die Struktur und den Transportablauf des ABC-Maltosetransporters geben. Allerdings gibt es nur wenig Informationen über die Dynamik des Systems, da die hier genannten Methoden in erster Linie Momentaufnahmen wiedergeben. Informationen über die Proteindynamik kann unter anderem die zeit- und polarisationsaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie liefern, die in dieser Arbeit verwendet wurde.

2.1.2.1. Substrat-Bindeprotein MalE

Das SBP MalE, welches auch als Maltose-Bindeprotein bezeichnet wird, initiiert die Aufnahme der Maltose oder des Maltodextrins durch eine Bindung an den Transportkomplex MalFGK₂. Des Weiteren kommuniziert MalE die Maltosekonzentration an den Chemorezeptor Tar (Zhang et al., 1999) und bewirkt eine Chemotaxis. MalE hat eine molekulare Masse von 40.7 kDa und wird dem Cluster B der SBP zugeordnet (Berntsson et al., 2010). MalE weist typisch für SBP des Cluster B drei Verbindungselemente im Gelenk auf, welche eine Bewegung von 30° ermöglichen. Das Maltose-Bindeprotein MalE kann sich so von einer offenen Konformation bei gleichzeitiger Aufnahme der Maltose oder des Maltodextrin zu einer geschlossenen Konformation hin bewegen. Die Maltose wird hierbei

2. Grundlagen

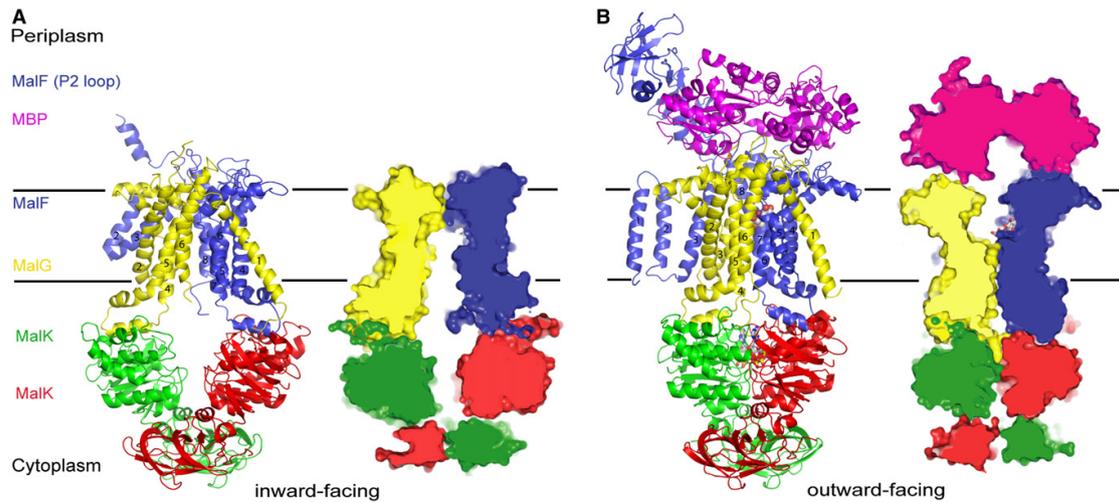


Abbildung 2.3.: Kristallstruktur des ABC-Maltosetransporters mit MalF (blau), MalG (gelb), MalK-Dimer (grün/rot) und dem SBP MalE (violett) im *inward-facing* (PDB: 3FH6, A) und im *outward-facing* (PDB: 2R6G, B) Zustand. Abbildung entnommen aus Khare et al. (2009).

durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen an das Maltose-Bindeprotein gebunden und durch eine Salzbrücke, die wie ein Riegel zwischen Position Glutamat 111 und Lysin 15 das Maltose-Bindeprotein in der geschlossenen Form hält, eingeschlossen (Stockner et al., 2005). Die Bindungsaffinität des Maltose-Bindeprotein wird durch die hier beschriebene Aufnahme der Maltose um ein Fünffaches im Verhältnis zum Apoprotein erhöht (Merino et al., 1995). Ohne Maltose liegt die geschlossene Form des Maltose-Bindeprotein genauso häufig vor wie die offene Form. Allerdings ist die geschlossene Form ohne Maltose instabil und wird erst durch die gebundene Maltose stabil in seiner Konformation gehalten.

Das Maltose-Bindeprotein ist essentiell für den Maltosetransport, da der membranständige Teil des Transporters das Substrat nicht aufnehmen kann. Dies erfolgt nur, wenn Maltose in MalE komplexiert vorliegt. Der Kenntnisstand über das Maltose-Bindeprotein ist sehr hoch, da dieses als gelöste Kristallstruktur in der offenen und geschlossenen Form mit und ohne Maltose gelöst vorliegt (Spurlino et al., 1991; Sharff et al., 1993; Quiocho et al., 1997; Duan and Quiocho, 2002), und zahlreiche Messungen mit ESR und Cross-Linking-Experimente in Verbindung mit dem membranständigen Teil des MalFGK₂-Transporters durchgeführt wurden (Austermuhle et al., 2004; Tang et al., 2007; Daus et al., 2007a, 2009). Die vorliegende Arbeit geht darüber hinaus, indem sie Kenntnisse über die Dynamik von MalE während der verschiedenen Transportzustände liefert.

2. Grundlagen

2.1.2.2. Transmembran-Domänen MalF und MalG

Die TMD bilden den Translokationsweg für Substrate durch die Membran. Sie können als Homo- oder Hetero-Dimere organisiert sein (Chang and Roth, 2001; Locher et al., 2002). Beim ABC-Maltosetransporter bestehen die TMD aus den Proteinen MalF und MalG. Aus Kristallstrukturdaten ist bekannt, dass die TMD des ABC-Maltosetransporters mindestens zwei verschiedene Konformationen einnehmen können (Abbildung 2.3). Die eine zeigt einen geöffneten Translokationskanal zur extrazellulären Seite der Membran *inward-facing*, wogegen die andere Konformation eine Öffnung zur cytoplasmatischen Seite der Membran aufweist (*outward-facing*) (Oldham et al., 2008).

MalF gehört mit einer Masse von 57 kDa zu den größten Bindeprotein-gekoppelten Membranproteinen und besitzt acht α -helikale Segmente, die die Membran durchdringen und mit beiden Termini im Cytoplasma liegen. Einzigartig und besonders hervorzuheben ist der P2-Loop, welcher sich zwischen der dritten und vierten Helix befindet. Bei dem P2-Loop handelt es sich mit 183 Aminosäuren und einer Masse von 20.44 kDa um einen ungewöhnlich großen Loop. Bisher ist es lediglich gelungen, diesen Loop im *outward-facing*-Zustand in einer Kristallstruktur aufzulösen. Für den *inward-facing*-Zustand konnte die Kristallstruktur des P2 nicht gelöst werden, was z. B. an einer hohen Beweglichkeit des P2-Loops liegen kann.

MalG hat eine Masse von 32 kDa und besitzt sechs Helices, die ebenfalls die Membran durchdringen und ihre Termini im Cytoplasma haben. Von MalG konnten die Loopregionen in den Kristallstrukturen im *outward-facing*-Zustand wie auch im *inward-facing*-Zustand vollständig gelöst werden.

2.1.2.3. Nukleotid-Bindedomäne MalK-Dimer

Der MalK-Dimer bildet die NBD und stellt durch seine ATPase-Aktivität die Energie für den Transport zur Verfügung (Schneider and Hunke, 1998; Dawson and Locher, 2007; Davidson and Chen, 2004). Das einzelne MalK hat eine Masse von 40.7 kDa und seine Kristallstruktur wurde bisher in zwei (nukleotidfreien) offenen Apozuständen, einem semi-offenen und einer geschlossenen Konformation aufgenommen (Chen et al., 2003; Lu et al., 2005).

Regionen mit hoher Bedeutung bei den NBD sind die *Walker A-Site*, die *Walker B-Site*, das *H-Motiv*, das *Signatur-Motiv* und der *Q-Loop* (Abbildung 2.1). An die Walker A-Site bindet das ATP, welches unter Energiefreisetzung in ADP und Phosphat gespalten wird. Dagegen wird an der Walker B-Site über eine Wasserstoffbrückenbindung ein Kontakt zum Mg^{2+} hergestellt, ohne den die ATP-Hydrolyse nicht möglich wäre. Der Kontakt zum γ -Phosphat wird über das H-Motiv hergestellt. Das *Struktur-Motiv* (S-Motiv), auch *LSGGQ-Motiv* genannt, ist erforderlich bei der ATP-Bindung (Wen and Tajkhorshid,

2. Grundlagen

2008). Der Q-Loop hat mehrere Aufgaben. Zum einen sorgt er für den Kontakt zur TMD, zum anderen bringt er eine Stabilisierung des Mg^{2+} mit sich. Des Weiteren bindet er H_2O (Smith et al., 2002).

Durch ATP-Bindung findet eine Konformationsänderung des MalK-Dimers statt (Chen et al., 2003; Schneider et al., 1994). Diese Änderung wird in Chen et al. (2003) als *tweezers-like*, also pinzettenartig beschrieben. Der C-terminale Bereich verändert sich nahezu nicht und wird somit als *handle* (Griff) und der N-terminale Bereich mit den *Q-Loops*, die ihren gemeinsamen Abstand von 9 Å auf 25 Å verändern, als *tips* (Spitzen) gesehen. Die *Q-Loops* sind hierbei im Kontakt mit den TMD.

2.1.3. Transportprozess des ABC-Maltosetransporters

2.1.3.1. Modell aus den gelösten Kristallstrukturen

Es gibt vom ABC-Maltosetransporter eine gelöste Kristallstruktur im Apozustand (Grundzustand) und im ATP-gebundenen Zustand (Oldham et al., 2007; Khare et al., 2009). Diese beiden Momentaufnahmen ermöglichen die Aufstellung eines einfachen Transportmodells. Wie in Abbildung 2.4 dargestellt, befindet sich der Transporter zunächst in der *inward-facing* Konformation des Apozustandes mit dem MalK-Dimer in der geöffneten Form. Der Transporter geht in die *outward-facing* Konformation des katalytischen Intermediatzustandes mit einem geschlossenen MalK-Dimer über. Zwischen diesen beiden Zuständen wird ATP aufgenommen, hydrolysiert und als ADP wieder abgegeben. An der periplasmatischen Seite dockt das MalE an und ermöglicht so den Transport der Maltose. Inwiefern der Andockprozess im beladenen und unbeladenen Zustand stattfindet und welche Konsequenzen sich daraus für den Transportvorgang ergeben, ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Bao and Duong, 2012a; Bordignon et al., 2010). Dieses Modell bietet eine gute Basis und kann durch weitere biochemische und biophysikalische Methoden ergänzt werden.

2.1.3.2. Weitere Erkenntnisse aus biophysikalischen und biochemischen Verfahren

Die Kristallstruktur des Apozustandes ist lediglich in einer geringen Auflösung von 4.5 Å und nur teilweise mit periplasmatischen Regionen vorhanden (Khare et al., 2009). Der P2-Loop von MalF fehlt gänzlich in der Kristallstruktur. Es konnten drei Zustände des P2-Loops über ESR-Messungen identifiziert werden. Diese Zustände korrelieren mit dem Auftreten der offenen, halb-offenen und der geschlossenen Form des MalK-Dimers während des Transportzyklus (Grote et al., 2009). Es wird vermutet, dass der P2-Loop eine tragende Rolle in der Kommunikation und dem Bindungsprozess von MalE an die periplasmatische Seite des Transporters spielt (Bordignon et al., 2010).

2. Grundlagen

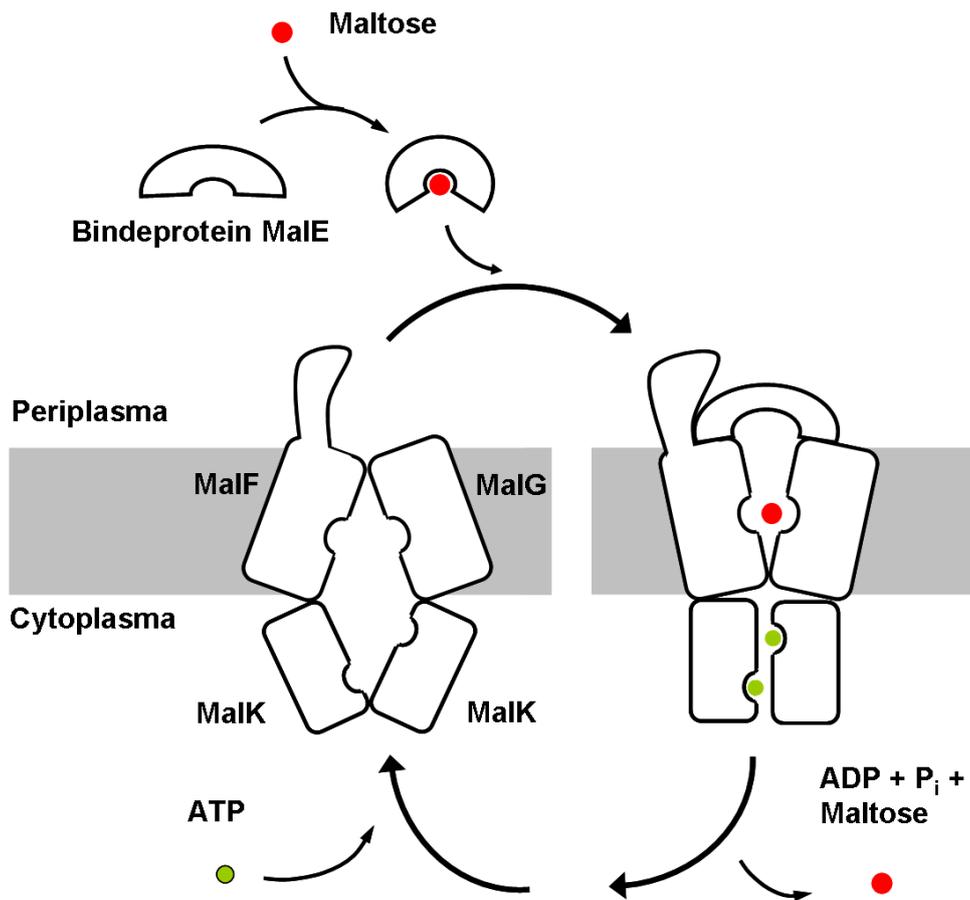


Abbildung 2.4.: **Transportmodell des ABC-Maltosetransporters.** Das Maltose-Bindeprotein MalE nimmt Maltose auf und nimmt dabei seine geschlossene Form an. An den MalK-Dimer wird ATP gebunden und das holo MalE bindet an die periplasmatische Seite des Transporters. Durch ATPase wird der Transport der Maltose durchgeführt und ADP, Phosphat und die Maltose werden ins Cytoplasma abgegeben.

Um die MalE gebundene Form des Transporters im katalytischen Zustand zu kristallisieren, wurde dieser Zustand mit Hilfe von gebundenem Vanadat bzw. durch geeignete Mutationen eingefangen (Oldham et al., 2007; Chen et al., 2001). Eine Bindung von beladenem MalE zum Apozustand des Transporters konnte nachgewiesen werden (Austermuhle et al., 2004; Daus et al., 2009). Hierbei konnte mit Cross-Linking-Experimenten ein naher Kontakt des P2-Loops zu MalE in beiden Transportzuständen gezeigt werden (Daus et al., 2009). Eine Bindung von apo-MalE an den Transporter, welche sich durch den geringen stimulatorischen Effekt bei der ATPase durch unbeladenes MalE andeutet (Davidson et al., 1992), konnte mit ESR-Messungen bestätigt werden (Austermuhle et al., 2004). Die geringe Bindungsaffinität von MalE an den Transporter wird sehr wahrscheinlich durch den 30- bis 50-fachen Überschuss an MalE im Verhältnis zum Trans-

2. Grundlagen

portkomplex kompensiert (Daus et al., 2007a). Eine entscheidende Rolle bei dem Kontakt der periplasmatischen Seite des Transporters mit dem Maltose-Bindeprotein MalE spielt der sogenannte *scoop-loop*, bei dem es sich um den dritten periplasmatischen Loop von MalG handelt (Oldham et al., 2007). Dieser ermöglicht ein Loslösen der Maltose vom MalE nach dem Andocken des MPB an den Transportkomplex.

Es bestehen verschiedene Kontaktstellen der TMD zur NBD. Doch trotz mehrerer Experimente mit ESR und Cross-Linking-Experimenten konnte der genaue Interaktionsmechanismus bislang nicht geklärt werden. Als wichtige Position konnte die Salzbrücke zwischen der Stelle Arg-47 der einzelnen MalK-Monomeren mit dem EAA-Motiv (MalF, Glu-401; MalG, Glu-190) identifiziert werden (Bordignon et al., 2010).

Das *tweezers-like*-Modell wird sowohl durch die Kristallstrukturen des isolierten MalK-Dimers gestützt als auch durch die Kristallstrukturen des gesamten Transporters. Auch durch Molekulardynamik (MD)-Simulationen konnte die pinzettenartige Bewegung nachvollzogen werden (Oloo et al., 2006). Hierbei zeigt sich, dass sich der MalK-Dimer von einer offenen Form zu einer halboffenen Form verändert, bevor er durch die Bindung von $MgCl_2$ und ATP in die geschlossene Form übergeht. Dies konnte ebenfalls durch ESR-Messungen bestätigt werden (Orelle et al., 2008; Grote et al., 2009).

2.1.3.3. Erweitertes Transportmodell

Das aktuelle Transportmodell nach Bordignon et al. (2010) beinhaltet die gewonnenen Kenntnisse aus den im letzten Abschnitt beschriebenen Experimenten.

Das unbeladene und ungebundene Maltose-Bindeprotein MalE befindet sich in einem Gleichgewichtszustand zwischen offener und geschlossener Form. Erst mit der Anwesenheit von Maltose verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten des geschlossenen Zustands.

MalE in beiden Zuständen (offen/geschlossen) besitzt eine Affinität zur periplasmatischen Oberfläche der TMD und kann eine vollständige hydrolytische Aktivität bei dem Transporter induzieren (Tang et al., 2007; Gould and Shilton, 2010; Bordignon et al., 2010).

Beim Andockprozess des mit Maltose beladenen MalE an die TMD befindet sich der Transporter in dem *inward-facing*-Zustand. Durch die Anwesenheit von ATP wechselt die Konformation in den *outward-facing*-Zustand, das ATP wird zu ADP und freiem Phosphat gespalten und der MalK-Dimer öffnet sich zur cytoplasmatischen Seite, die Maltose geht ins Cytoplasma über, und das Maltose-Bindeprotein kann sich teilweise bis vollständig von der TMD lösen. Jetzt kann entweder neue Maltose an das nicht gelöste Maltose-Bindeprotein andocken oder ATP an den Transporter ohne Maltose-Bindeprotein binden. In beiden Fällen geht mit Anwesenheit von ATP bzw. dem mit Maltose beladenen Maltose-Bindeprotein der Transporter wieder in den *outward-facing*-Zustand. Das Modell berücksichtigt zusätzlich den ungekoppelten Zustand des ATP-gebundenen Trans-

2. Grundlagen

porters, den man in Detergens beobachten kann. Im Gegensatz zur nativen Lipidumgebung besitzt der Transporter in Detergenz-Mizellen auch ohne Maltose-Bindeprotein eine ATPase-Aktivität.

2.2. Physikalische Grundlagen

2.2.1. Absorption

Elektromagnetische Strahlung wird beim Durchdringen von Materie absorbiert. Durch die Wechselwirkung der Strahlung mit der Materie wird die Energie, meist in Wärme, umgewandelt. Die Abnahme der Strahlungsintensität wird als linearer Zusammenhang

$$dI = -\alpha I dx \quad (2.1)$$

geschrieben. Dabei stellt x die Schichtdicke dar und α den Absorptionskoeffizienten. Bei letzterem handelt es sich um eine Stoffkonstante mit der Dimension einer reziproken Länge. Durch Integration der Gleichung 2.1 folgt für die Intensität

$$I(d) = I(0)e^{-\alpha d} \quad (2.2)$$

Diese Beziehung wird als Gesetz von Lambert-Beer bezeichnet. Darin ist $I(0)$ die Intensität vor dem Eindringen der Strahlung. Bei gelösten Stoffen in lichtdurchlässigen Lösemitteln ist es mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten möglich, die Konzentration des Stoffes zu bestimmen, wobei

$$\alpha = \varepsilon c \quad (2.3)$$

gilt. Der molare Extinktionskoeffizienten ε wird in den Einheiten $\text{molL}^{-1}\text{cm}^{-1}$ oder auch $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ angegeben.

Die Absorbanz

$$A = -\log\left(\frac{I(d)}{I(0)}\right) = \varepsilon cd \quad (2.4)$$

wird bei einer photometrischen Messung bestimmt. Die Absorbanz A wird auch Extinktion, „Optische Dichte“ (OD) oder einfach als Absorption bezeichnet und ist, wie man an Formel 2.4 erkennen kann, linear abhängig von der Konzentration c , dem Extinktionskoeffizienten ε und der Schichtdicke d . Die Absorbanz ist einheitenlos, wird allerdings häufig mit OD angegeben.

Das Jablonskidiagramm (Abbildung 2.5) stellt schematisch die Prozesse dar, die nach der Absorption eines Photons in einem Molekül stattfinden. Die Energiezustände werden durch horizontale Linien abgebildet, wobei der Grundzustand S_0 und die angeregten Zustände die Singulettzustände S_1 , S_2 usw. sind. Die Übergänge erfolgen im Diagramm vertikal und sind instantan. Jeder Zustand besteht aus mehreren höherenergetischen Zwischenzuständen, die sich aus den verschiedenen Schwingungsquantenzahlen ergeben. Das Relaxieren der Elektronen in niedrigere Schwingungsniveaus wird als Schwingungsrelaxation (*Vibrational Relaxation* (VR)) bezeichnet, wogegen die strahlungslose Relaxation innerhalb der Singulettzustände als innere Umwandlung (*Internal Conversion* (IC)) be-

2. Grundlagen

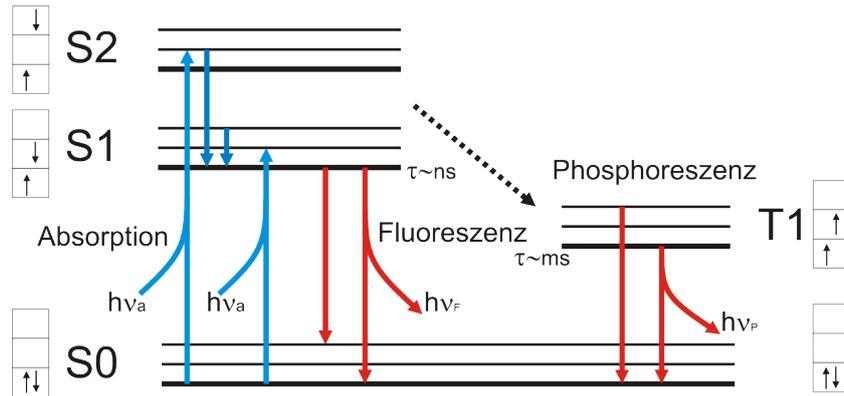


Abbildung 2.5.: Vereinfachtes Jablonskidiagramm zur Darstellung von Absorptions- und Lumineszenzvorgängen. Durch die Absorption von Photonen (blaue Pfeile) werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gebracht. Relaxationsprozesse sammeln Elektronen im metastabilen Singulettzustand S_1 , von welchem aus die Elektronen unter Abgabe von Fluoreszenzphotonen in den Grundzustand S_0 relaxieren. Bei Übergang in den Triplettzustand T_1 (*Intersystem Crossing*) erfolgt eine Spinumkehr. Eine Relaxation in den Grundzustand S_0 ist quantenmechanisch verboten und hat damit eine um eine Größenordnung längere Lebensdauer von T_1 als der von S_1 .

zeichnet wird. Die Lebensdauer der Singulettzustände über dem S_1 Zustand liegt im Bereich von $\leq 10^{-11}$ s, während die Lebensdauer des niedrigsten S_1 Zustandes im Nanosekundenbereich liegt. Vom S_1 Zustand erfolgt der Übergang in den Grundzustand. Bei Übergängen innerhalb von Singulettzuständen bleibt der Spin der Elektronen erhalten, wogegen beim Übergang in einen Triplettzustand, welcher strahlungslos ist, eine Spinumkehr des Elektrons stattfindet (*Intersystem Crossing*).

Das Franck-Condon-Prinzip ermöglicht eine Berechnung der Intensität von verschiedenen Schwingungszuständen eines Moleküls (Gleichung 2.6). Das Prinzip beruht auf der gleichen Annahme wie bei der Born-Oppenheimer Näherung; dass eine Separation der Kern- und Elektronbewegung aufgrund ihrer stark unterschiedlichen Masse durchgeführt werden kann. Beim Übergang des Elektrons verändert sich der Kernabstand nicht, so dass, wie in Abbildung 2.6 dargestellt, die Übergänge jeweils vertikal verlaufen. Dadurch können die Wellenfunktionen der Vibrations- und der elektronischen Zustände separiert werden: $\psi = \psi_e \psi_v$. Quantenmechanisch wird der Übergang durch den Dipoloperator μ beschrieben, der sich in einen Elektronen- (μ_e) und einen Kernanteil (μ_k) zerlegen lässt. Die Übergangswahrscheinlichkeit P von ψ nach ψ^* kann geschrieben werden, so dass

$$P = \langle \psi^* | \mu | \psi \rangle \quad (2.5)$$

$$= \langle \psi_e^* \psi_v^* | \mu_e + \mu_k | \psi_e \psi_v \rangle \quad (2.6)$$

$$= \langle \psi_e^* \psi_v^* | \mu_e | \psi_e \psi_v \rangle + \langle \psi_e^* \psi_v^* | \mu_k | \psi_e \psi_v \rangle \quad (2.7)$$

2. Grundlagen

gilt. Die Anwendung der Condon-Näherung $\langle \psi_e^* \psi_v^* | \mathbf{p}_e | \psi_e \psi_v \rangle \approx \langle \psi_v^* | \psi_v \rangle \cdot \langle \psi_e^* | \mathbf{p}_e | \psi_e \rangle$ ergibt die Übergangswahrscheinlichkeit

$$P \approx \langle \psi_v^* | \psi_v \rangle \cdot \langle \psi_e^* | \mathbf{p}_e | \psi_e \rangle + \langle \psi_e^* | \psi_e \rangle \cdot \langle \psi_v^* | \mathbf{p}_k | \psi_v \rangle. \quad (2.8)$$

Da $\langle \psi_e^* | \psi_e \rangle = 0$ gilt, folgt

$$P = \langle \psi_v^* | \psi_v \rangle \cdot \langle \psi_e^* | \mathbf{p}_e | \psi_e \rangle. \quad (2.9)$$

Das Quadrat des Terms $\langle \psi_v^* | \psi_v \rangle$ ist der Franck-Condon-Faktor und gibt das Überlappintegral zwischen den beiden Vibrationszuständen wieder. Der Term $\langle \psi_e^* | \mathbf{p}_e | \psi_e \rangle$ ist die Wahrscheinlichkeitsamplitude. Diese wird über die Orbitalauswahlregel bestimmt.

Die Übergangswahrscheinlichkeit von den verschiedenen Vibrationszuständen kann durch das Franck-Condon-Integral

$$\int \chi_\nu(R) \chi_{\nu'}(R) dV_{\text{Kerne}} \quad (2.10)$$

berechnet werden. Hierbei handelt es sich um ein Überlappungsintegral mit dem Vibrationszustand $\chi_{\nu'}$ des Grundzustands E' und dem Vibrationszustand χ_ν des angeregten Zustands E . Die Integration erfolgt über das gesamte Volumen des Moleküls, wobei R den Kernabstand angibt.

2.2.2. Fluoreszenz

Ein elektronisch angeregtes System kann unter Abgabe eines Photons von einem höheren Zustand in einen niedrigeren Zustand übergehen. Dies bezeichnet man als Fluoreszenz oder Phosphoreszenz, abhängig von dem angeregten Zustand. Im Falle der Fluoreszenz ist der Spin des angeregten Elektrons entgegengesetzt zum gepaarten Elektron im Grundzustand, was zu einer schnellen Rückkehr mit einer Emissionsrate von 10^8 bis 10^9 s^{-1} in den Grundzustand unter Abgabe eines Photons führt. Bei der Phosphoreszenz dagegen liegt die Lebensdauer der Elektronen im angeregten Zustand im Bereich von Millisekunden bis zu mehreren Sekunden. Dies liegt daran, dass vor der Phosphoreszenz das Elektron in einen Triplettzustand übergeht (*Intersystem Crossing*). Aufgrund des gleichen Spins zum Grundzustand ist der Übergang eine quantenmechanisch verbotene Interkombination mit einer geringen Wahrscheinlichkeit (Abbildung 2.5).

Das Fluoreszenzspektrum eines Fluorophors ist in der Regel rotverschoben gegenüber seinem Absorptionsspektrum, was als Stokesverschiebung bezeichnet wird. Dies liegt einerseits an strahlungslosen Prozessen, wie der VR und IC, bevor der fluoreszierende Übergang in den Grundzustand stattfindet, und andererseits an der Lösungsmittelrelaxation. Fluoreszenzmoleküle treten aufgrund ihrer Polarität in Wechselwirkung mit den

2. Grundlagen

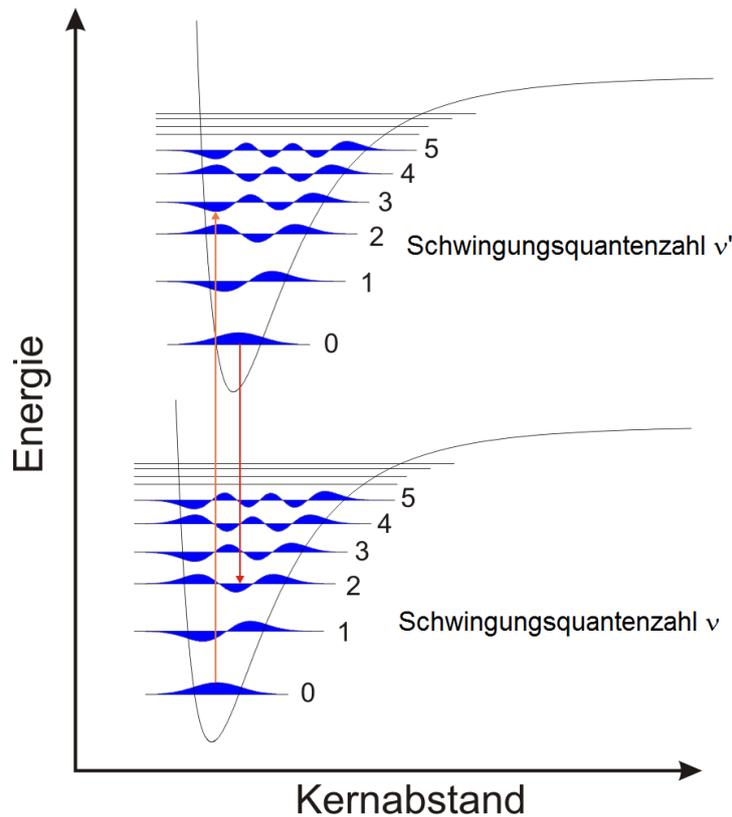


Abbildung 2.6.: **Franck-Condon-Prinzip.** Schematische Darstellung des Übergangs zwischen zwei verschiedenen Zuständen. Der überlappende Teil der Wellenfunktion (blau) gibt die Übergangswahrscheinlichkeit wieder. Die Übergänge zwischen zwei Zuständen werden durch Pfeile dargestellt.

Lösungsmittelmolekülen. Bei der Absorption eines Photons ändert sich die Polarität der Fluoreszenzmoleküle, und die angrenzenden Lösungsmittelmoleküle (Solvathülle) reorganisieren sich zu einem stabilen Energieminimum. Der angeregte Zustand hat dadurch eine geringere und der Grundzustand eine höhere Energie. Aufgrund dieser geringeren Energiedifferenz erhöht sich die Wellenlänge der emittierten Photonen. Der Lösungsmittelfeffekt ist abhängig von der Polarität des Lösungsmittels.

2.2.3. Fluoreszenzlebensdauer

Der Zerfall von I_0 angeregten Molekülen lässt sich mit der Übergangsrate k angeben

$$\frac{dI(t)}{dt} = -k \cdot I(t). \quad (2.11)$$

Durch Integration über die Zeit t folgt

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-t/\tau}. \quad (2.12)$$

2. Grundlagen

Hierbei ist $\tau = k^{-1}$ die Lebensdauer des Moleküls im angeregten Zustand. Im Falle von N unterschiedlichen Zerfallsprozessen kann der Fluoreszenzzerfall mit

$$I(t) = I_0 \cdot \sum_{i=1}^N \alpha_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (2.13)$$

beschrieben werden. Der Vorfaktor α_i (Amplitude) gibt den Anteil der zeitabhängigen Fluoreszenzzerfallskomponente an der Gesamtintensität an. τ_i ist die dazugehörige Zerfallskonstante.

2.2.4. Anisotropie

Die Fluoreszenz eines Moleküls ist ebenfalls durch ihre Polarisationsrichtung, das heißt die Richtung des elektrischen Feldvektors der Fluoreszenzstrahlung, charakterisiert. Die Polarisation der Fluoreszenzstrahlung ist von der Orientierung des Emissionsübergangsdipolmoments des Moleküls abhängig. Als quantitatives Maß für die Polarisation der Strahlung definiert man die Anisotropie

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}}, \quad (2.14)$$

die sich bei polarisierter Anregung der Fluorophore aus der emittierten Fluoreszenzstrahlung der Komponenten der Fluoreszenzintensität parallel (I_{\parallel}) und senkrecht (I_{\perp}) zum Anregungsstrahl zusammensetzt.

Ein Fluorophor hat je ein Dipolmoment für die Absorption und für die Emission von Licht, welche im Folgenden zur Vereinfachung gleich gesetzt werden. Durch die Projektion des elektrischen Feldes des strahlenden Dipols auf die Z-Achse erhält man: $E_{\parallel}(\theta, \phi) = \cos(\theta)$, durch die Projektion auf die Y-Achse dagegen: $E_{\perp}(\theta, \phi) = \sin(\theta) \sin(\phi)$. Die Intensität I des elektrischen Feldes E des strahlenden Dipols ist proportional zu E^2 . Es gilt (Abbildung 2.7a):

$$I_{\parallel}(\theta, \phi) = \cos^2(\theta) \quad (2.15)$$

und

$$I_{\perp}(\theta, \phi) = \sin^2(\theta) \sin^2(\phi). \quad (2.16)$$

Die Fluorophore sind im Experiment isotrop in der Lösung verteilt. Erfolgt eine Anregung durch parallel zur Z-Achse linear polarisiertes Licht, so werden aufgrund der Rotations-symmetrie alle Moleküle, die ihr Übergangsdipolmoment mit dem Winkel θ zur Z-Achse haben (Abbildung 2.7) mit gleicher Wahrscheinlichkeit angeregt. Das heißt die angeregten Fluorophore sind symmetrisch um die Z-Achse verteilt. Damit kann die ϕ -Abhängigkeit

2. Grundlagen

aus Gleichung 2.16 eliminiert werden. Über den Mittelwert von

$$\langle \sin^2(\phi) \rangle = \frac{\int_0^{2\pi} \sin^2(\phi) d\phi}{\int_0^{2\pi} d\phi} = \frac{1}{2} \quad (2.17)$$

vereinfacht sich Gleichung 2.16 zu

$$I_{\perp}(\theta) = \frac{1}{2} \sin^2(\theta) \quad (2.18)$$

Für ein Ensemble von isotrop angeordneten Fluorophoren folgen die parallelen und senkrechten Anteile der Intensität mit

$$I_{\parallel}(\theta) = \int_0^{\pi/2} f(\theta) \cos^2(\theta) d\theta = \langle \cos^2(\theta) \rangle \quad (2.19)$$

und

$$I_{\perp}(\theta) = \frac{1}{2} \int_0^{\pi/2} f(\theta) \sin^2(\theta) d\theta = \frac{1}{2} \langle \sin^2(\theta) \rangle \quad (2.20)$$

Hierbei ist $f(\theta)$ die Verteilungsfunktion der Fluorophore. Einsetzen in die Formel 2.14 ergibt mit der Relation $\sin^2(\theta) = 1 - \cos^2(\theta)$

$$r = \frac{3\langle \cos^2(\theta) \rangle - 1}{2} \quad (2.21)$$

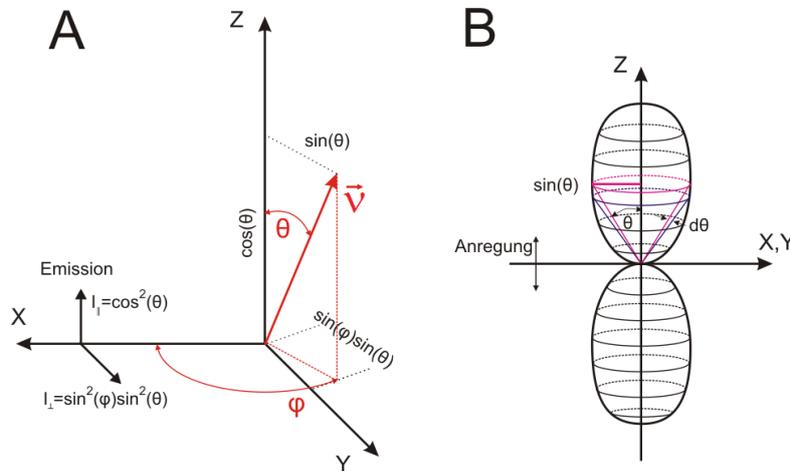


Abbildung 2.7.: **A:** Emissionsübergangsdipolmoment \vec{v} . Detektierte Fluoreszenzemissionsanteile parallel (I_{\parallel}) und horizontal (I_{\perp}) zur Anregung. **B:** Schematische Darstellung der Verteilung der durch einen vertikal polarisierten Anregungspuls angeregten Fluoreszenzfarbstoffe.

Fluorophore besitzen ein Absorptionsdipolübergangsmoment, über das sie angeregt werden können. Dies ist bei linear polarisiertem Licht nur möglich, wenn das Dipol-

2. Grundlagen

moment eine parallele Komponente zum E-Feldvektor des anregenden Lichts besitzt. Bei der Photoelektronen werden mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Winkel zur Polarisationssebene in einer Flüssigkeit isotrop verteilte Moleküle angeregt. Der maximale Wert für die Anisotropie r für ein Ensemble isotrop verteilter Farbstoffe bei vertikal polarisierter Anregung ergibt sich über die Verteilungsfunktion der Gleichungen 2.21 und 2.19. Fluorophore werden mit einer Wahrscheinlichkeit $\cos^2(\theta)$ abhängig vom Einstrahlungswinkel θ des polarisierten Lichts angeregt. Die Anzahl der Farbstoffe in einem Raumsegment $[\theta, \theta + d\theta]$ verhält sich bei isotroper Verteilung der Farbstoffe mit $\sin(\theta)d\theta$. Die Verteilungsfunktion $f(\theta)$ erhält man aus dem Produkt der Verteilung und der Anregungswahrscheinlichkeit

$$f(\theta)d\theta = \cos^2(\theta) \sin(\theta)d\theta. \quad (2.22)$$

Werden diese in 2.19 und 2.21 eingesetzt, so ergibt sich als maximale Anisotropie bei parallelen Dipolmomenten für Anregung und Emission $r = 0.4$. Im Allgemeinen besitzen jedoch Anregungs- und Emissionsdipol eine unterschiedliche Richtung im Molekül. Der Winkel zwischen diesen beiden Richtungsvektoren wird als Winkel ω bezeichnet. Dadurch wird die theoretisch maximale Anisotropie

$$r_0 := r(0) = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2(\omega) - 1}{2} \right) \quad (2.23)$$

verringert. Gleichung 2.23 kann auch mit Hilfe des Legendrepolynoms 2. Ordnung (P_2) formuliert werden.

$$r_0 = \frac{2}{5} P_2(\cos^2(\omega)) \quad (2.24)$$

2.2.4.1. Zeitabhängiger Anisotropiezerfall

Die Emission depolarisiert mit der Zeit aufgrund der Rotationsdiffusion der Farbstoffe. Die daraus resultierenden Rotationskorrelationszeiten ϕ sind abhängig unter anderem von Viskosität des Mediums, Größe und Form des Farbstoffs. Durch die ortsspezifische Markierung von Proteinen können über die Anisotropie Informationen über das Protein gewonnen werden, wenn Farbstoff- und Segmentbewegung nicht entkoppelt sind. Hierzu gehören lokale Informationen über die Dynamik des markierten Proteinsegments und globale Informationen über die Gesamtrrotationskorrelationszeit.

Für die Messung der Anisotropie werden Proben mit vertikal polarisiertem Licht angeregt und die Emission $I_{\parallel}(t)$ durch einen weiteren Polarisator vertikal (parallel) und für $I_{\perp}(t)$ horizontal dazu (senkrecht) detektiert.

Es gilt für die zeitabhängige Anisotropie wie beim zeitunabhängigen Fall mit der For-

2. Grundlagen

mel 2.14:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I(t)} = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2 \cdot I_{\perp}(t)} \quad (2.25)$$

Mit Hilfe der Gleichung 2.21 lässt sich für den zeitabhängigen Fall schreiben:

$$r(t) = \left\langle \frac{3}{2} (\cos^2 \theta) - \frac{1}{2} \right\rangle_{(t)} = \langle P_2(\cos \theta) \rangle_{(t)} \quad (2.26)$$

P_2 ist das Legendre Polynom zweiten Grades. Für die Anisotropie kann die Mittelung des Ensembles mit P_2 und der normalisierten Verteilungsfunktion $f(\theta, \phi, t)$ durch Integration gebildet werden.

$$r(t) = \int_0^{\pi} \int_0^{2\pi} f(\theta, \phi, t) P_2(\cos \theta) d\theta d\phi \quad (2.27)$$

Die Bewegung des Ensemble lässt sich mit Hilfe der Rotationsdiffusion beschreiben. Hierfür muss die normalisierte Verteilungsfunktion dem zweiten Fickschen Gesetz bezüglich der Rotationsdiffusion entsprechen.

$$\frac{1}{D_{rot}} \frac{\partial f}{\partial t} = \nabla^2 f = \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial f}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2 f}{\partial \phi^2} \quad (2.28)$$

Mit Hilfe der Kugelflächenfunktion

$$\frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial Y_{lm}}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2 Y_{lm}}{\partial \phi^2} = -l(l+1)Y_{lm} \quad (2.29)$$

ist eine Separation der Variablen

$$f(\theta, \phi, t) = f_1(\theta, \phi) f_2(t) \quad (2.30)$$

möglich und ergibt die normalisierte Verteilungsfunktion:

$$f(\theta, \phi, t) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l C_{lm} Y_{lm}(\theta, \phi) e^{-l(l+1)D_{rot}t}, \quad (2.31)$$

die der Rotationsdiffusion entspricht. Die Separationskonstante C_{lm} ergibt sich aus der Anfangsbedingung zum Zeitpunkt $t = 0$.

$$C_{lm} = \int_0^{2\pi} \int_0^1 f(\theta, \phi, 0) Y_{lm}^* d\theta d\cos \phi \quad (2.32)$$

Durch Einsetzen der Rotationsverteilungsfunktion 2.31 in die Anisotropiegleichung 2.27 erhält man

2. Grundlagen

$$r(t) = \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l C_{lm} Y_{lm}(\theta, \phi) e^{-l(l+1)D_{rot}t} P_2(\cos \theta) d\theta d\phi. \quad (2.33)$$

Der zeitunabhängige Teil entspricht der Anfangsanisotropie $r(0)$ und der zeitabhängige Teil besteht aus einer Exponentialfunktion:

$$r(t) = \underbrace{\int_0^\pi \int_0^{2\pi} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l C_{lm} Y_{lm}(\theta, \phi) P_2(\cos \theta) d\theta d\phi}_{=r(0)} \cdot e^{-l(l+1)D_{rot}t} \quad (2.34)$$

Die Kugelflächenfunktion wird aus dem assoziierten Legendre-Polynom mit $l = 2$; $m = 0$ gebildet, welches dem Legendre Polynom zweiten Grades entspricht. Durch die Orthogonalitätsrelation der Legendre-Polynome muss $l = 2$; $m = 0$ für die Gleichung gelten. Für die einfache Form der zeitabhängigen Anisotropie im Fall eines freien kugelförmigen Rotators folgt

$$r(t) = r(0) \cdot e^{-6D_{rot}t}. \quad (2.35)$$

Die Diffusionskonstante D_{rot} ist gegeben mit

$$D_{rot} = kT/6\eta V \quad (2.36)$$

dabei ist k die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur, η die Viskosität der Lösung und V das Volumen.

Die Gleichung 2.35 gilt für den Fall der ungehinderten Bewegung eines sphärischen Rotators. Die Anisotropie geht aufgrund der Rotationsdiffusion monoexponentiell gegen Null. Wenn es mehrere Rotationsmodi gibt, wie es bei einem fluoreszenzmarkierten Biomolekül der Fall ist, ist ein Zerfall der Anisotropie $r(t)$ zu beobachten, der aus mehreren Komponenten besteht. Dies kann mit der Modellfunktion

$$r(t) = r_0 \cdot \sum_i \beta_i \cdot \exp\left(-\frac{t}{\phi_i}\right) \quad (2.37)$$

($\sum \beta_i = 1$) beschrieben werden. Hierbei ist r_0 die Anfangsanisotropie, i die Anzahl der Zerfälle, β_i die einzelne relative Amplitude und ϕ_i die dazugehörige Rotationskorrelationszeit. Aus den Rotationskorrelationszeiten kann bei Annahme einer kugelförmigen Form des Fluoreszenzmarkers über den Zusammenhang $\phi = \frac{\eta V}{RT}$, mit der Viskosität η , der Gaskonstanten R und der Temperatur T das Volumen V bestimmt werden. Wenn der Marker an einem Protein mit flexiblem Segment befestigt ist, so können auch die Dynamik des Segments und das Volumen des Proteins bei Annahme einer Kugel bestimmt

2. Grundlagen

werden (Alexiev et al., 2003; Schröder et al., 2005).

Wenn die Eigenbewegung eines Fluoreszenzfarbstoffs bei ortsspezifischer Markierung durch das Protein behindert ist, liegt eine sterische Einschränkung vor. In der Regel ist die Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors wesentlich kleiner als die Rotationskorrelationszeit ϕ des Proteins. Wenn die Rotationskorrelationszeit des Gesamtsystems nicht mehr im Beobachtungsfenster des jeweiligen Farbstoffs liegt, welches durch die Fluoreszenzlebensdauer gegeben ist, dann zerfällt die Anisotropie virtuell zu einem konstanten Endwert $r_\infty := r(\infty)$, welcher mit folgender Modellfunktion dargestellt werden kann:

$$r(t) = \sum_i b_i \cdot \exp\left(-\frac{t}{\phi_i}\right) + r_\infty \quad (2.38)$$

mit $b_i = \beta_i \cdot (r_0 - r_\infty)$, $\sum \beta_i = 1$ und $\sum b_i + r_\infty = r_0$ für $t = 0$. b_i sind die absoluten und β_i die relativen Amplituden.

2.2.5. Cone in a cone Modell

Das *cone in a cone* Modell (Schröder et al., 2005) ermöglicht eine Analyse des Bewegungsraums eines an ein Makromolekül kovalent gebundenen Farbstoffs. Hierbei handelt es sich um eine Erweiterung des *wobbling in a cone* Modells (Kinosita et al., 1977), welches den Bewegungsraum des Übergangdipolmoments durch eine Kegelform mit einem zu bestimmenden Kegelöffnungswinkel beschränkt (Abbildung 2.8 A). Ein kleiner Bewegungsraum mit einem kleinen Halbkegelöffnungswinkel steht für eine starke sterische Einschränkung. Wogegen ein großer Bewegungsraum mit einem großen Halbkegelöffnungswinkel für eine geringere sterische Einschränkung steht.

Die Erweiterung des *cone in a cone* Modells besteht in der Separation der Bewegung des Dipolmoments und des flexiblen Segments (Schröder et al., 2005). Es wird davon ausgegangen, dass beide Bewegungen voneinander entkoppelt sind und diese sich durch zwei Halbkegel mit jeweiligen Öffnungswinkeln darstellen lassen. Dies ermöglicht die Betrachtung der Anisotropie:

$$r(t) = r_0 \left[(1 - A_1)e^{-t/\phi_1} + A_1 \right] \left[(1 - A_2)e^{-t/\phi_2} + A_2 \right] e^{-t/\phi_G} \quad (2.39)$$

Bei r_0 handelt es sich um die Anfangsanisotropie. ϕ_i steht für die einzelnen Rotationskorrelationszeiten, wobei ϕ_G die Rotationskorrelationszeit des gesamten Proteins ist. Der Grad der sterischen Einschränkung wird durch die Amplituden A_i angegeben.

Es gilt die Relation von A_i mit dem Halbkegelöffnungswinkel θ_i :

$$A_i = \left[\frac{1}{2}(1 + \cos(\theta_i)) \cos(\theta_i) \right]^2 \quad (2.40)$$

2. Grundlagen

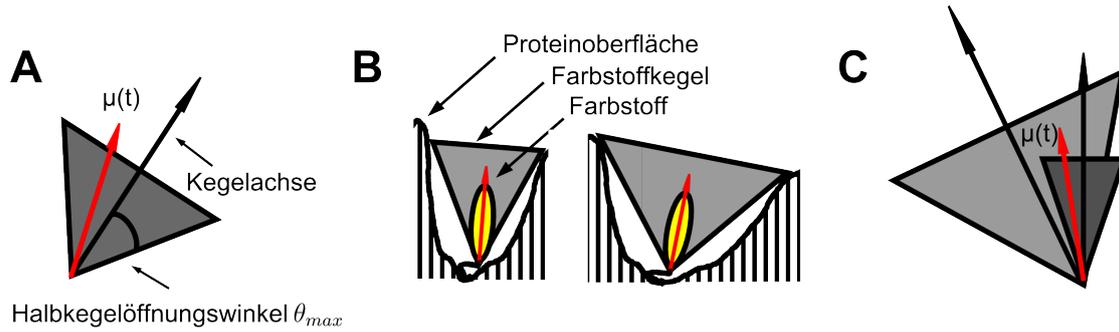


Abbildung 2.8.: **Wobbling in a cone und cone in a cone Modell.** **A:** *Wobbling in a cone* Modell nach Kinosita et al. (1977). Das Übergangsdipolmoment $\mu(t)$ des kovalent gebundenen Farbstoffs kann frei in einem Kegel mit dem Halbkegelöffnungswinkel θ_{max} diffundieren. **B:** Der Halbkegelöffnungswinkel ist durch den Bewegungsspielraum gegeben. Ein kleiner Bewegungsraum bedeutet eine hohe sterische Einschränkung und ein großer Bewegungsraum eine geringere sterische Einschränkung. **C:** *Cone in a cone* Modell nach Schröder et al. (2005). Die Bewegung des Farbstoffs und des flexiblen Proteinsegments werden separat betrachtet. Dadurch erhält man zwei entkoppelte Halbkegelöffnungswinkel.

Daraus wird eine Lösung für den Halbkegelöffnungswinkel θ_i

$$\theta_i = \arccos \left[\frac{1}{2}(-1 + \sqrt{1 + 8\sqrt{A_i}}) \right]. \quad (2.41)$$

Mit dem *cone in a cone* Modell ermöglicht somit eine separate Betrachtung des Halbkegelöffnungswinkel θ_1 und θ_2 und der sterischen Einschränkung A_1 und A_2 des Farbstoffs und des flexiblen Segments.

3. Material und Methoden

3.1. Absorptionsspektroskopie

Die Formeln und Herleitung zur Absorptionsspektroskopie sind in Abschnitt 2.2.1 dargestellt. Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgten im Rahmen dieser Arbeit mit einem UV/VIS-Doppelstrahlspektrophotometer UV-2450PC der Firma Shimadzu. Hierbei ist zu beachten, dass die Küvette und das Lösemittel, in dem sich die Probe befindet, zur Extinktion beitragen. Um diesen Beitrag zu eliminieren, wird eine Referenzküvette verwendet, die das Lösemittel ohne Probe beinhaltet. In dem verwendeten Doppelstrahlphotometer wird die Referenzküvette zur selben Zeit mit Licht gleicher Intensität zur eigentlichen Probenküvette durchstrahlt, so dass sich aus der Extinktionsdifferenz das Absorptionsspektrum der Probe berechnet.

3.2. Fluoreszenzspektroskopie

Zur Charakterisierung der einzelnen Proben wurde ein L-Format-SPEX Fluoromax-3 von Horiba Jobin Yvon verwendet. Die Messungen mit diesem Gerät wurden bei einer festen Anregungswellenlänge und der Detektion des Emissionsspektrum durchgeführt.

3.3. Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) oder auch zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung ist eine statistische Methode, mit der einzelne Photonen detektiert werden und ihre Zeit von der Aussendung an aufgezeichnet wird. Diese Methode ermöglicht die Messung der Abstände von einzelnen Lichtpulsen mit einer maximalen Auflösung von wenigen Picosekunden. Es wird hierbei nur ein Photon pro Anregungsimpuls detektiert und über mehrerer Einzelmessungen aufaddiert.

Bei TCSPC-Messungen erfolgt der Start der Einzelmessung durch den Impuls des anregenden Lasers. Das Fluoreszenzphoton liefert das Stopp-Signal und die daraus resultierende Zeitdifferenz wird in einem Histogramm aufgetragen (Abbildung 3.1). Die Anzahl der detektierten Photonen zu einem bestimmten Zeitpunkt geben die Intensität wieder. Eine Überlappung der Fluoreszenzzerfälle muss hierbei ausgeschlossen werden. Dies kann über die Repetitionsrate des anregenden Lasers erreicht werden.

3. Material und Methoden

Ein Nachteil dieser Start-Stopp Konfiguration liegt bei vielen Messaufbauten in der hohen Anzahl der Leerlaufprozesse. Auf die Mehrzahl der Start-Signale folgt kein Stopp-Signal. Dieser Nachteil kann durch einen inversen Modus ausgeschlossen werden. Dabei wird das eigentliche Start-Signal um eine fest definierte Zeit verzögert, so dass diese die Einzelmessung stoppt.

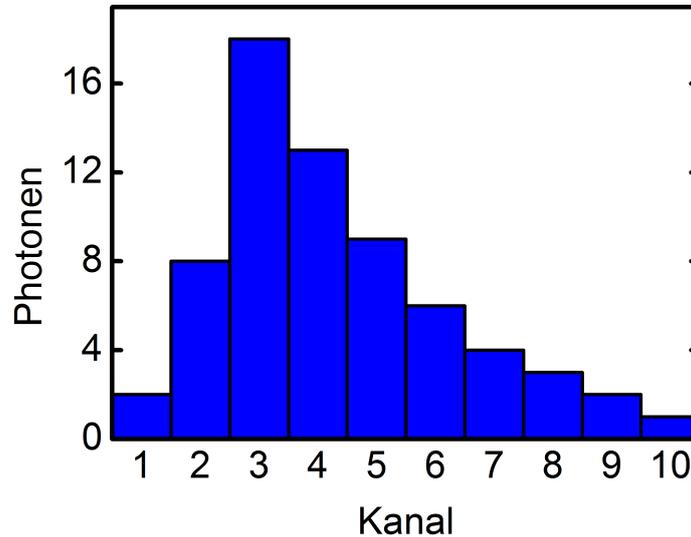


Abbildung 3.1.: **Schematische Darstellung eines TCSPC-Histogramms.** Abhängig von der Zeit wird jedes einzelne Photon einem Kanal zugeordnet und in einem Histogramm aufgetragen.

3.4. Messaufbau für die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Die Messungen der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie wurden mit folgendem TCSPC-Aufbau durchgeführt (Alexiev et al., 2003; Kim et al., 2007).

Eine schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Messaufbaus ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Ein Millennia VS cw Diodenlaser mit 5 W Leistung wird zum Pumpen des gepulsten Titan-Saphir-Lasers (TiSa-Laser, Tsunami Modell #3950, Spectra Physics) verwendet. Mit Hilfe eines Pulpickers wird die Repetitionsrate von 82 MHz auf 4 MHz reduziert. Damit ist das Intervall zwischen zwei Anregungspulsen größer als die Zerfallszeit des Fluorophors und eine Überlappung der Fluoreszenzzerfälle ausgeschlossen werden kann.

Die Wellenlänge des TiSa-Lasers liegen zwischen 710 und 1000 nm, wobei eine Wellenlänge selektiv ausgewählt wird. Für Messungen der Fluoreszenz im sichtbaren Wellenlängenbereich wird die Frequenz verdoppelt. Diese zweite Harmonische wird über einen

3. Material und Methoden

Lithiumtriborat-Kristall (LBO-Kristall Modell #3980; Spectra Physics) erzeugt. Mit dem Frequenzverdoppler lässt sich eine Wellenlänge von 355 nm bis 500 nm einstellen. Für diese Arbeit wurde ein Laserpuls mit einer Pulsbreite von 1.5 ps (*Full Width at Half Maximum* (FWHM)) und einer Wellenlänge von 484 nm erzeugt. Die mittlere Leistung bei dieser Wellenlänge beträgt 220 bis 250 μW . Der polarisierte Laserstrahl passiert einen Hochpassfilter mit einer Absorptionskante bei 640 nm, der eventuelle Anteile der Fundamentalen mit einer Wellenlänge von 986 nm entfernt. Anschließend wird die Polarisation durch einen Fresnel-Rhombus von waagrecht zu senkrecht zur Tischebene gedreht. Ein Neutraldichtefilter teilt den Strahl in zwei Richtungen auf. Ein Strahl geht über einen Neutraldichtefilter und eine Kollimatorlinse auf eine Photodiode (DET 210, Thorlabs) und andere Strahl in die Probenkammer. Das Signal der Photodiode dient als Stoppimpuls und wird durch einen 1 GHz Vorverstärker (Modell # 9369, EG&G Ortec) verstärkt und dann invertiert. Das verstärkte Signal wird ebenfalls zur visuellen Kontrolle des Laserpulses mit einem Oszilloskop genutzt. Der Stoppimpuls wird über den *Time to Amplitude Converter* (TAC) der Messkarte (Becker & Hickl SPC830) geleitet. Der TCSPC-Aufbau wird im inversen Modus betrieben, so dass eine vertauschte Start-Stopp-Konfiguration besteht, wobei das emittierte Photon vom Fluorophor am Detektor den Startimpuls erzeugt.

Vor der Probenkammer befindet sich ein zweifacher Neutraldichte-Revolver, der die Einstellung der Strahlintensität ermöglicht. In der Probenkammer passiert der Strahl einen Glan-Thompson-Polarisator, der vertikal polarisiertes Licht für die Messung durchlässt, und gelangt anschließend in die Probenküvette. Die Temperatur der Küvette kann über ein Wärme-/Kühlsystem (Modell #F20-HC, Julabo) gesteuert werden.

Das Fluoreszenzlicht wird im rechten Winkel zum Anregungslicht detektiert. Hierbei werden an der Probe gestreute Photonen des Anregungslichts von einem Tiefpassfilter (OG 515) absorbiert. Die Messung der *Instrumental Response Function*, welche zur Entfaltung der Fluoreszenzzerfallskurve dient (Abschnitt 3.5). Um den gleichen Strahlengang beizubehalten wird anstelle des Kantenfilters ein Neutraldichte (ND)-Filter eingesetzt.

Mit einer Kollimatorlinse wird ein paralleler Strahlengang erzeugt. Es folgt eine Irisblende und ein motorisiert drehbarer Polarisator (Pol. UV2, LINOS). Die Detektion der Photonen erfolgt mit einem *Multichannel-Plate-Photomultiplier-Tube* (MCP) (Modell #R3809U, Hamamatsu), der mit einer Spannung von 2.84 kV betrieben wird.

Für die Messung wird die parallele bzw. die vertikale Komponente der Fluoreszenz detektiert. Dies wird durch eine 90° Drehung des Polarisators, der vor dem Detektor steht, erreicht. Die Zeit pro Polarisationsrichtung ist variabel einstellbar und betrug für die Messungen jeweils 120 s. Das Signal des MCP wird mit einem Vorverstärker verstärkt und gelangt dann in die Messkarte (Becker & Hickl SPC830) des Messcomputers. Dort wird der genaue Zeitpunkt des elektronischen Impulses mit einem Proportionaldiskriminator (*Constant Fraction Discriminator* (CFD)) ermittelt und an den *Time to*

3. Material und Methoden

Amplitude-Converter weitergeleitet, der abhängig von der Zeit vom Start- bis zum Stoppsignal proportional einen Kondensator auflädt. Die gemessene Spannung am Kondensator entspricht der Zeit. Durch den folgenden *Analog to Digital Converter* (ADC) kann das analoge Signal in ein digitales umgewandelt werden, welches dann vom PC weiterverarbeitet wird. Die Verarbeitung der Daten wird mit dem Multikanalanalyseprogramm von Becker & Hickl vorgenommen. Die Messung erfolgt über 1024 Kanäle. Für die verwendeten Messungen wurden 20 ps bzw. 30 ps pro Kanal eingestellt.

Zur Überprüfung der Justage erfolgt nach jeder Inbetriebnahme eine Messung mit einer Fluorescein-Natriumsalz in 50 mM Tris pH 8 gelösten Probe. Die Parameter aus dieser Messung können dann mit den bekannten Werten verglichen werden. Bei einer Übereinstimmung der Parameter kann eine Fehljustage ausgeschlossen werden.

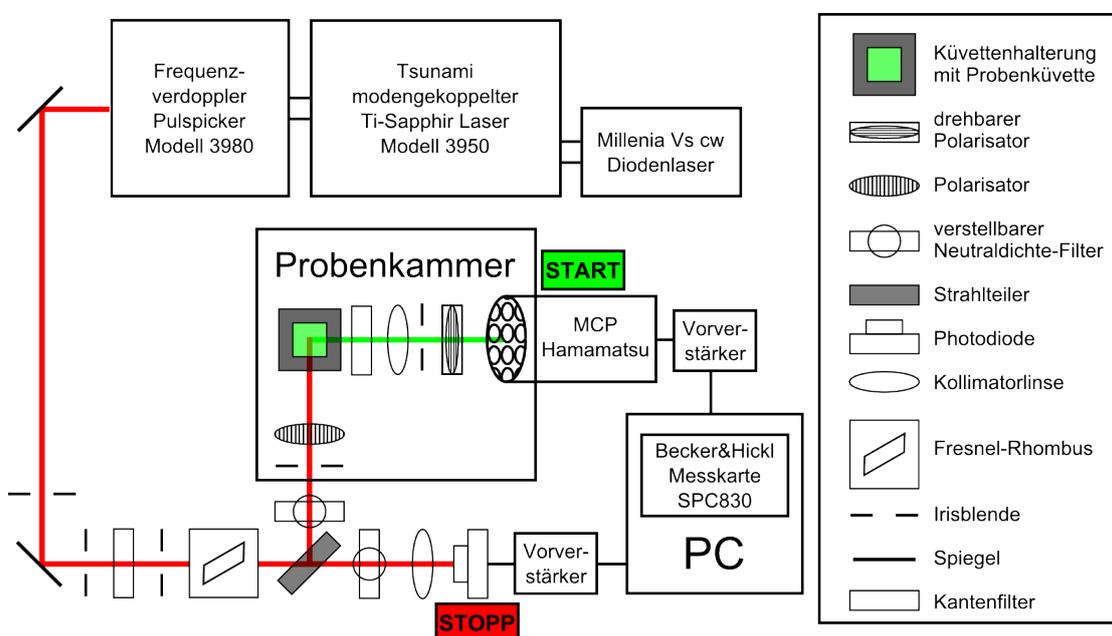


Abbildung 3.2.: **Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten TCSCP-Aufbaus** zur Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz. Der polarisierte Anregungspuls wird von einem TiSa-Laser System im Wellenbereich zwischen 350-550 nm erzeugt und in einem inversen Start-Stopp Aufbau zur Einzelphotonenzählung der emittierten Photonen des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs genutzt. Die Detektion der Photonen erfolgt über *Multichannel-Plate-Photomultiplier-Tube* (MCP). Die Fluoreszenzereignisse werden dann von der Elektronik der Messkarte SPC 830 verarbeitet und als Histogramm auf dem PC dargestellt.

3.5. Auswertung der zeitaufgelösten Fluoreszenz

Die Auswertung der Daten, die mit der im vorherigen Unterkapitel beschriebenen Messapparatur gemessen wurden, erfolgte mit dem Computerprogramm Globals Unlimited 1.2 des *Laboratory for Fluorescence Dynamics* der *University of Illinois* unter MS-DOS (Beechem, 1992). Das Programm entfaltet die gemessenen Originaldaten mit der dazugehörigen Instrumentenantwort, die über eine Streuprobe aufgenommen wurde. Die gemessene Originalkurve $O(t)$ besteht aus der gefalteten *Instrument Response Function* (IRF) $L(t)$ mit dem eigentlichen Fluoreszenzzerfall $I(t)$:

$$O(t) = \int_{-\infty}^t L(t')I(t-t')dt' \quad (3.1)$$

Der Fluoreszenzzerfall $I(t)$ kann hierbei als Summe von Exponentialfunktionen geschrieben werden:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (3.2)$$

α_i steht jeweils für die Amplitude und τ_i für die Zeitkonstante der jeweiligen Fluoreszenzzerfallskomponente.

Das Programm ist in der Lage, die zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ (Lakowicz, 2010):

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - G \cdot I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2 \cdot G \cdot I_{\perp}(t)} \quad (3.3)$$

mit den detektierten Fluoreszenzintensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} und dem dimensionslosen G -Faktor G , welcher aus der polarisationsabhängigen Detektion resultiert und im Idealfall, bei gleicher Detektion von parallel und senkrecht polarisiertem Licht, gleich eins ist:

$$G = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} \quad (3.4)$$

mit folgender Modellfunktion anzugleichen:

$$r(t) = r_0 \sum_j \beta_j e^{-t/\phi_j} \quad (3.5)$$

Die Fitgüte ergibt sich aus dem reduzierten χ_r^2 -Wert, welcher wie folgt definiert ist:

$$\chi_r^2 = \frac{\chi^2}{\nu} \quad (3.6)$$

ν ist die Anzahl der Freiheitsgrade, und ergibt sich aus:

3. Material und Methoden

$$\nu = N(i) - p - 1 \quad (3.7)$$

$N(i)$ steht für die Anzahl der gemessenen Werte (*Counts*) und p für die Fitparameter. χ^2 ist definiert mit:

$$\chi^2 = \sum_i^n \frac{[N(i) - N_f(i)]^2}{N(i)} \quad (3.8)$$

n ist die Anzahl der Kanäle, $N(i)$ steht für die Anzahl der gemessenen Werte (*Counts*) und N_f ist der gefittete Wert des i ten Kanals.

Das Analyseprogramm entfaltet die Rohdaten mit der Instrumentenantwort, passt die Kurve mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus an und gibt die erforderlichen Parameter und die reduzierten χ_r^2 -Werte aus.

Für den freien Farbstoff in 50 mM Tris Puffer pH 8.0 gelöst, erfolgte eine Angleichung mit nur einer Fluoreszenzlebensdauer und einer Rotationskorrelationszeit. Für die fluoreszenzmarkierten Transporterproteine wurden im Allgemeinen je drei Exponentialfunktionen für die Fluoreszenzlebensdauer und die verschiedenen Rotationskorrelationszeiten verwendet. Das Angleichen wurde über eine Reduzierung der χ_r^2 -Werte und über die Annahme von sinnvollen Start-Parametern für den markierten Transporter durchgeführt. Rotationskorrelationszeiten von über 100 ns können nicht mehr aufgelöst werden, da die mittlere Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffs Iodoacetamidofluorescein (IAF) bei etwa 4 ns liegt. Wenn die Rotationskorrelationszeit des Gesamtsystems nicht mehr im Beobachtungsfenster des jeweiligen Farbstoffs liegt, welches durch die Fluoreszenzlebensdauer gegeben ist, dann zerfällt die Anisotropie virtuell zu einen konstanten Endwert:

$$r_\infty = r_0 \cdot \beta_3 \quad (3.9)$$

3.6. Probenpräparation

Alle in dieser Arbeit verwendeten ABC-Maltesetransporter wurden in der AG Schneider hergestellt. Es wurden vom Komplex, der nicht markiert wurde, die cysteinfreie Variante mit den Plasmiden pMG39/pMM34 und eine Variante bei der nur an der Position C40S des MalK-Dimers jeweils das Cystein gegen ein Serin ausgetauscht wurde, mit den Plasmiden pMG31/pMM37 verwendet.

Für die markierten Komplexe wurden in den Untereinheiten MalF und MalG alle nativen Cysteine entfernt und an der gewünschten Position eine Aminosäure gegen ein Cystein ausgetauscht. Für MalK wurden die *Background*-Varianten MalK(C40S/C350M/C360S) ohne Cysteine (Plasmid pMG39) und MalK(C40S) mit zwei native Cysteine an den Positionen C350 und C360 verwendet (Plasmid pMM37). Die beiden Positionen C350

3. Material und Methoden

und C360 sind die in der Regel nicht zugänglich, da sie sich an der Grenzfläche zwischen Membrandomäne und MalK Untereinheiten befinden. Dadurch kann diese *Background*-Variante ebenfalls für ortsspezifisches Fluoreszenzlabeling benutzt werden. Der Vorteil ist eine mehr wildtypartige *Background*-Variante.

Es wurden die Mutanten MalF(T177C)GK(C40S/C350M/C360S)₂ mit den Plasmiden pMM56/pMG39, MalF(T177C)GK(C40S)₂ mit den Plasmiden pMM56/pMM37, MalF(S205C)GK(C40S)₂ mit den Plasmiden pMM37/pMM26, MalFG(P78C)K(C40S)₂ mit den Plasmiden pMM37/pDE10, und MalFG(Q256C-AF)K(C40S)₂ mit den Plasmiden pMM37/pMM58 für die markierten Komplexe benutzt.

Der MalE Wildtyp (wt) beinhaltet kein Cystein, so dass keine cysteinfreie Mutante erzeugt werden musste (Plasmid pCB6). Für die verschieden markierten MalE-Varianten wurden die Mutanten MalE(G13C) mit dem Plasmid pMM43, MalE(211C) mit dem Plasmid pMM44, MalE(T31C) mit dem Plasmid pMM55 und MalE(T179C) mit dem Plasmid pMM47 hergestellt.

Für MalFG und MalE wurden die Gene von *E.coli* und für MalK die Gene von *S.typhimurium* verwendet. Die Zellanzucht, Zellfraktionierung und Proteinpräparation des Transportkomplexes MalFGK₂ erfolgte nach dem Protokoll von Landmesser et al. (2002). MalFGK₂ wurde mit n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM) solubilisiert oder in Proteoliposomen (Abschnitt 3.9) eingebaut. Die Reinigung des Maltose-Bindeproteins MalE wurde nach dem Protokoll von Dean et al. (1992) vorgenommen. Eine Solubilisierung ist beim wasserlöslichen Maltose-Bindeproteins MalE nicht notwendig.

3.7. Labeling der Cystein-Mutanten

Der Standard-Ansatz für die Markierung der Cystein-Mutanten mit Fluorescein hatte folgende Konzentrationen: 20 μ M Komplexmutane in 20 % Glycerin, 50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) pH 8.0, 0.01 % DDM, 40 μ M Dithiothreitol (DTT) und 1.2 mM 5-Iodoacetamidofluorescein (5-IAF). Bei den Bindeproteinmutanten wurde das Glycerin und das DDM weggelassen. Die Inkubationszeit für die Reaktion betrug 2 h bei Raumtemperatur und erfolgte unter Argon und unter Lichtausschluss. Der Überschuss an Farbstoff wurde durch Chromatographie über eine Sephadex G25 (fine) - Säule, die mit 20 % Glycerin, 50 mM TRIS pH 8.0, 0.01 % DDM equilibriert wurde, abgetrennt.

3.8. Aktivitätstest

Um die Auswirkung der Mutationen und des Labelings an dem ABC-Maltosetransporter zu überprüfen, wurde ein ATPase-Test nach den Fluoreszenz-Markierungen durchgeführt. Hierbei wird die funktionelle Aktivität des ABC-Transporters durch die Fähigkeit

3. Material und Methoden

der MalK-Untereinheiten unter Transportbedingungen, d. h. in Anwesenheit von Maltose und MalE, ATP zu hydrolysieren, bestimmt (Daus et al., 2006; Nikaido et al., 1997). Die Analyse der ATP-Hydrolyse erfolgt über die Messung des freigesetzten Phosphats. Dies kann über photometrische Phosphatbestimmungsmethoden, wie z. B. Molybdänblau-, Vanadat-Molybdat und Malachitgrün-Verfahren (Fiske and Subbarow, 1925; Carter and Karl, 1982; Itaya and Ui, 1966; Gericke and Kurmies, 1952), erfolgen. Wie im Kapitel 5 genauer erläutert, wurde erst ein vorhandener Molybdänblau Assay (Chifflet et al., 1988) getestet, der allerdings unter den gegebenen Bedingungen keine eindeutigen Ergebnisse lieferte. Es wurde somit ein neuer Assay entwickelt, der auf dem Malachitgrün-Verfahren basiert (Repen et al., 2012) und eindeutige Ergebnisse erbrachte.

3.8.1. Standard-Bedingungen des Aktivitätstests mit Komplex in Detergens

Der Standard-Ansatz für den Aktivitätstest mit solubilisierten Transporterkomplex betrug 195 μl (0.013 mg/ml Komplex (MalFGK₂) $\hat{=}$ 0.074 μM , 0.416 mg/ml MalE $\hat{=}$ 9.5 μM , 10 μM Maltose, 1.92 mM ATP 9.62 mM MgCl₂, 50 mM Tris pH 8.0, 0.01 % DDM, 20 % Glycerin, 0.1 mM PMSF) .

Der Startzeitpunkt für die Bestimmung der Aktivitätszeit war die Zugabe von ATP und MgCl₂. Davor wurde der Ansatz 5 Minuten bei 37°C vortemperiert (ATP und MgCl₂ separat vortemperiert). Die Temperatur während der Aktivitätszeit betrug ebenfalls 37°C. Nach 2 Minuten, 5 Minuten und 10 Minuten wurden je 50 μl vom Ansatz entnommen und durch Zugabe von 10 μl 10 % SDS der Komplex denaturiert und dadurch die ATPase-Reaktion gestoppt. Mit der Zugabe von 180 μl MilliQ-H₂O wurde die Probe auf ein Gesamtvolumen von 240 μl für die Phosphatbestimmung verdünnt. Als Referenzwert für den Zeitpunkt Null und als Blankwert wurde eine Lösung mit der gleichen Verdünnung hergestellt (0.4 % SDS, 10 mM Tris pH 8.0, 4 % Glycerin, 0.002 % DDM, 0.02 mM PMSF). Es erfolgte eine dreifach Bestimmung der Phosphatkonzentration mit je 60 μl Probenvolumen.

Die Farbreaktion der 60 μl Probe erfolgte mit der Zugabe von 15 μl Malachit Grün Lösung und 6 μl 30 % Ammoniummolybdat Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 20°C wurden jeweils Absorptionsspektren über den Wellenlängenbereich von 600 nm bis 800 nm für die Bestimmung des freien Phosphatgehalts gemessen.

3.8.2. Standard-Bedingungen des Aktivitätstests mit Komplex in Proteoliposomen

Der Standard-Ansatz für den Aktivitätstest mit Komplex betrug 195 μl (0.031 mg/ml Komplex (MalFGK₂) eingebaut in 0.31 mg/ml Proteoliposomen, 0.416 mg/ml MalE, 10 μM

3. Material und Methoden

Maltose, 1.92 mM ATP, 3.00 mM MgCl₂, 50 mM Tris pH 8.0).

Der Startzeitpunkt für die Bestimmung der Aktivitätszeit war die Zugabe von ATP und MgCl₂. Davor wurde der Ansatz 5 Minuten bei 37°C vortemperiert (ATP und MgCl₂ separat vortemperiert). Die Temperatur während der Aktivitätszeit betrug ebenfalls 37°C. Nach 2 Minuten, 5 Minuten und 10 Minuten wurden je 50 µl vom Ansatz entnommen und durch Zugabe von 10 µl 10 % SDS der Komplex denaturiert und dadurch die ATPase-Reaktion gestoppt. Mit der Zugabe von 180 µl MilliQ-H₂O wurde die Probe auf ein Gesamtvolumen von 240 µl für die Phosphatbestimmung verdünnt. Es erfolgte eine dreifach Bestimmung der Phosphatkonzentration mit je 60 µl Probenvolumen.

Die Farbreaktion der 60 µl Probe erfolgte mit der Zugabe von 15 µl Malachit Grün Lösung und 6 µl 30 % Ammoniummolybdat. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 20°C wurden jeweils Absorptionsspektren über den Wellenlängenbereich von 600 nm bis 800 nm für die Bestimmung des freien Phosphatgehalts gemessen.

3.9. Herstellung von Proteoliposomen

Der Einbau des Transportkomplexes MalFGK₂ in die Liposomen wurde von der AG Schneider durchgeführt und erfolgte abgewandelt nach dem Protokoll von Hall et al. (1998).

Der Rekonstitutionsansatz (300 µl) enthielt 2.5 mg Lipid, 0.4 % Octyl-β-D-glucopyranosid, 250 µg gereinigten MalFGK₂-Komplex, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 und wurde über Nacht mit 100 µg Biobeads gerührt. Durch Absaugen am nächsten Morgen wurden die alten Biobeads entfernt und 100 µg neue hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation wurde der Ansatz durch Absaugen von den Biobeads getrennt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 1 Minute bei 10000 rpm und 4°C. Das Pellet wurde in 208 µl (50 mM Tris/HCl 8.0) resuspendiert. Dies ergab 375 µg Komplex mit einer Konzentration von 10 µM.

Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Anbieter
5-IAF (5-Iodoacetamidofluorescein)	Life Technologies/Invitrogen (Carlsbad, USA)
Ammoniummolybdat	Merck (Darmstadt)
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
β -DDM (n-Dodecyl- β -D-Maltosid)	Gycon Biochemicals GmbH (Luckenwalde)
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
HCl	Roth (Karlsruhe)
MgCl ₂	Roth (Karlsruhe)
Natriumarsenit	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Octyl- β -D-glucopyranosid	Gycon Biochemicals GmbH (Luckenwalde)
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Merck (Darmstadt)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth (Karlsruhe)
SensoLyte Malachit Green Colometric Assay	Anaspec (Fremont, USA)
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth (Karlsruhe)
Lipid (Escherichia Coli)	Avanit Polar-Lipids Inc. (Alabaster, USA)
Biobeads	BioRad (München)

Tabelle 3.1.: **Verwendete Chemikalien, Assays und Materialien** mit Angabe der Hersteller

Teil II.
Ergebnisse

4. Fluoreszenzmarkierung der Mutanten von MalE und MalFGK₂

Ortsspezifisches Fluoreszenz-Labeling eröffnet die Möglichkeit, an jeder beliebigen Stelle des Proteins eine Fluoreszenz-Reportergruppe kovalent zu binden. Dies erfolgt über spezifisch eingeführte Cysteine an den gewünschten Stellen im Protein.

Die Herstellung der verschiedenen Mutanten des MalFGK₂-Komplexes und des MalE erfolgte durch die AG Schneider. Das Verfahren für das Labeling mit Fluorescein wurde von der AG Alexiev optimiert und in Kooperation mit der AG Schneider als auch in der AG Alexiev durchgeführt.

4.1. Fluorescein

Bei der verwendeten Fluoreszenz-Reportergruppe handelt es sich um Fluorescein, das als 5-IAF an ein Cystein binden kann. Die Strukturformel und das typische Absorptionsspektrum und Emissionsspektrum werden in Abbildung 4.1 gezeigt. Das Absorptionsmaximum liegt bei 492 nm und das Emissionsmaximum bei 513 nm, welches bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm angeregt wurde. Zur Gewährleistung, dass Fluoreszenz-Labeling nicht die Proteinaktivität beeinträchtigt, wurde ein Aktivitätstest durchgeführt (Kapitel 5).

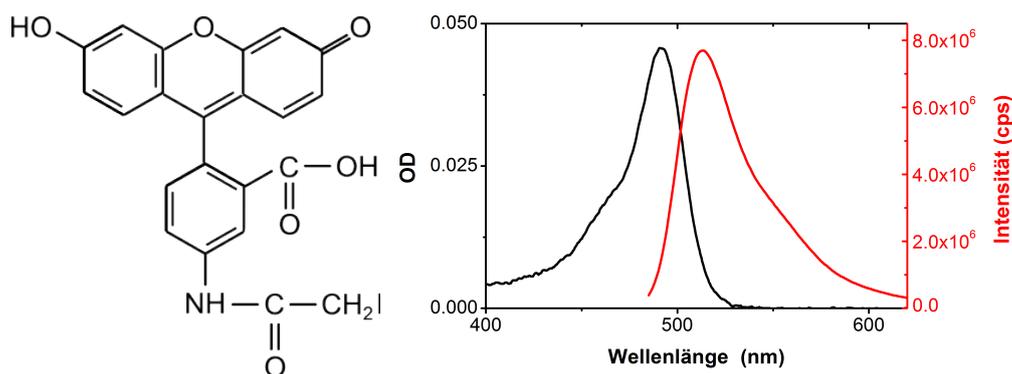


Abbildung 4.1.: Strukturformel, Absorptions- (schwarz) und Emissionsspektrum (rot) von 5-IAF. Die Probe wurde in 50 mM Tris bei pH 8.5 und bei 20°C gemessen.

4.2. Labeling von MalF-T177C

Zur Markierung des P2-Loops von MalF mit einer Fluoreszenz-Reportergruppe wurde Position T177 im MalF-P2-Loop als Labelposition ausgewählt. Position T177 befindet sich in einem kurzen helikalen Segment in der Mitte des Loops und ist nicht in direktem Kontakt mit dem gebundenen MalE. An der Stelle T177 wurde über Mutagenese ein Threonin gegen ein Cystein ausgetauscht. Das Labeling der Einzel-Cysteinmutante MalF(T177C)GK₂ mit IAF interferiert nicht mit der Transportaktivität des Komplexes, wie durch ATPase-Aktivitätstests gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 5).

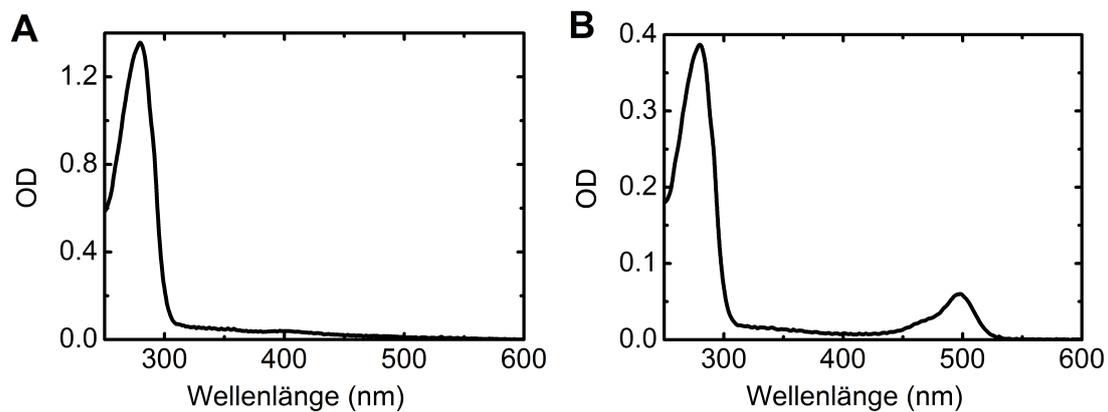


Abbildung 4.2.: **Absorptionsspektren von MalF(T177C)GK₂ und MalF(T177C-AF)GK₂** **A:** Das Spektrum der unmarkierten Mutante MalF(T177C)GK₂ mit dem charakteristischen Absorptions-Peak bei 280 nm der aromatischen Aminosäuren, mit dem sich die Konzentration des gelösten Proteins bestimmen lässt. **B:** Das Spektrum der markierten Mutante MalF(T177C-AF)GK₂ mit einem zusätzlichen Peak bei 495 nm, der charakteristisch für das gebundene Fluorescein ist. Mit Hilfe der Absorptionsmaxima bei den unterschiedlichen Wellenlängen lässt sich die Konzentration des Fluoresceins, des Proteins und daraus die Labelstöchiometrie berechnen. Beide Proben wurden in 50 mM Tris, pH 8.0, 0.01 % DDM, 20 % Glycerin, 0.1 mM PMSF bei 20°C gemessen.

Ein charakteristisches Absorptionsspektrum vor und nach Markierung mit Fluorescein findet sich in Abbildung 4.2. Der überschüssige Farbstoff, der nicht mit dem Cystein reagiert hat, wurde über ein chromatographisches Verfahren abgetrennt. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden auf Protein- und Fluoreszenzlabel-Gehalt untersucht.

Die einzelnen Fraktionen wurden in ca. 200 µl Aliquots aufgenommen und anschließend unter Ultraviolett (UV)-Licht fotografiert (Abbildung 4.3). Dies ermöglicht eine Vorsortierung der Fraktionen, die Fluorescein beinhalten. Anschließend wurden für eine genauere Bestimmung Absorptionsspektren, wie in Abbildung 4.2 dargestellt, aufgenommen. Die Proteinkonzentration ergibt sich aus Formel 2.4 aus Abschnitt 2.2.1. Die

4. Fluoreszenzmarkierung der Mutanten von MalE und MalFGK₂

Labelingstöchiometrie ergibt sich dann wie folgt:

$$\frac{c_{\text{Farbstoff}}}{c_{\text{Probe}}} = \left(\frac{\Delta A(\lambda_{\text{Farbstoff}})}{\varepsilon(\lambda_{\text{Farbstoff}})} \right) \cdot \left(\frac{\varepsilon(\lambda_{\text{Protein}})}{A(\lambda_{\text{Protein}})} \right) \quad (4.1)$$

Hierbei geben $c_{\text{Farbstoff/Protein}}$ jeweils die Konzentrationen des Farbstoffs bzw. der Probe wieder. $\Delta A(\lambda_{\text{Farbstoff}})$ ist die Absorption des Farbstoffes, welche für Fluorescein bei $\lambda = 492 \text{ nm}$ ermittelt wurde. Der dazu gehörige Extinktionskoeffizient ε beträgt $\varepsilon = 77000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. $A(\lambda_{\text{Protein}})$ bezieht sich auf den Absorptionswert des Proteins bei 280 nm. Der molare Extinktionskoeffizient von MalFGK₂ ist $\varepsilon = 196070 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und von MalE $\varepsilon = 66350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Wenn $\frac{c_{\text{Farbstoff}}}{c_{\text{Protein}}} > 1$ ist, bedeutet dies, dass sich noch freier Farbstoff in der Lösung befindet. Durch eine weitere Säulenchromatographie kann der überschüssige Farbstoff entfernt werden.

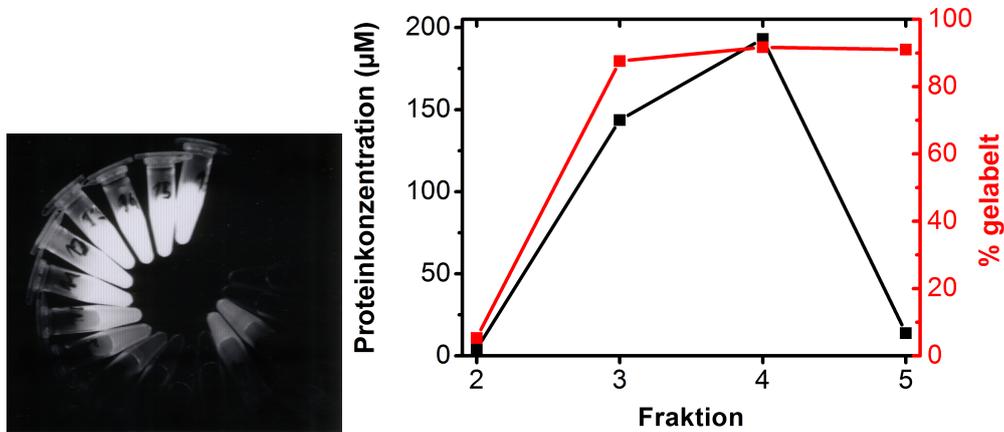


Abbildung 4.3.: **Foto der Fraktionen unter UV-Licht und Graph über die jeweiligen Proteinkonzentrationen und Labelingstöchiometrien.** Die von der Säule aufgenommenen Fraktionen wurden nummeriert und nach einer ersten Sichtung unter UV-Licht ihre Proteinkonzentration und Labelingstöchiometrie ($c_F/c_{\text{Probe}} = 1 \hat{=} 100\%$ markiert) die bestimmt.

Die einzelnen Fraktionen wurden mit ihren dazugehörigen Proteinkonzentrationen und Labelstöchiometrien wie in Abbildung 4.3 aufgetragen, was eine schnelle und übersichtliche Auswahl der zu verwendenden Proben ermöglicht. Zur weiteren Verwendungen wurden bei Bedarf einzelne Fraktionen zusammengemischt und/oder aufkonzentriert. Für die Fluoreszenzmessungen ist es von großer Bedeutung, dass sich kein freier Farbstoff in der Lösung befindet, da dieser die Ergebnisse verfälscht. Für die Aktivitätstest ist es wichtig, dass eine Labelstöchiometrie von annähernd 1 vorhanden ist, um eine Überlagerung mit der Aktivität von unmarkierten Proteinen auszuschließen. Nach der Labelingprozedur wurde das Protein nach Schockfrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Des Weiteren konnte beim Labeling kein Unterschied zwischen den Mutanten MalF-

4. Fluoreszenzmarkierung der Mutanten von MalE und MalFGK₂

(T177C)GK(C40S/C350M/C360S)₂ und MalF(T177C)GK(C40S)₂ festgestellt werden. Die Cysteine an den Position C350 und C360 im MalK-Dimer von MalF(T177C)GK(C40S)₂ sind für das 5-IAF unzugänglich. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird deshalb in der Regel die kürzere Form MalF(T177C)GK₂ als Bezeichnung für beide Mutanten verwendet.

Ein charakteristisches Emissionsspektrum von der mit Fluorescein markierten Mutante MalF(T177C-AF)GK₂ befindet sich in Abbildung 4.4. Das Spektrum wurde mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_E = 480$ nm aufgenommen und es zeigt ein Emissionsmaximum bei 518 nm. Eine kleine Rotverschiebung des Emissionsspektrums gegenüber freien Fluorescein ($\lambda = 513$ nm) zeigt eine marginale Beeinflussung des Fluorophores durch die Proteinumgebung.

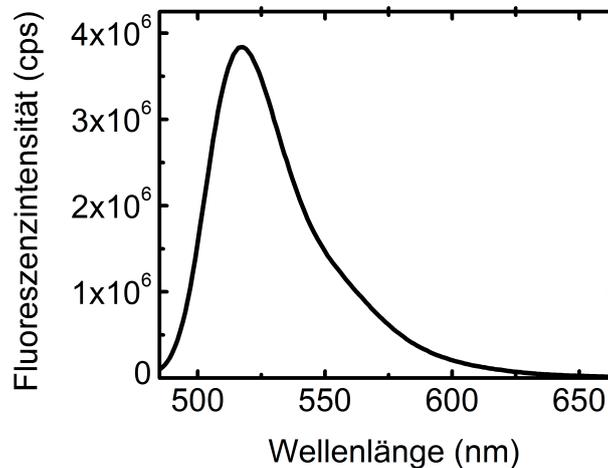


Abbildung 4.4.: **Emissionsspektrum von MalF(T177C-AF)GK₂** bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_E = 480$ nm. Das Fluorescein ist an ein Cystein an der Position 177 von MalF gebunden. Das Emissionsmaximum liegt bei 518 nm. Diese Probe wurde in 50 mM Tris, pH 8,0, 0,01 % DDM, 20 % Glycerin, 0,1 mM PMSF bei 20°C gemessen.

4.3. Labeling von weiteren MalFGK₂ - und MalE-Mutanten

Das Labeling von den weiteren Mutanten wurde wie im Abschnitt 4.2 beschrieben durchgeführt. Bei den Varianten von MalE wurde kein Glycerin und auch kein DDM im Puffer verwendet, da MalE kein Membranprotein sondern ein wasserlösliches Protein ist.

In der Tabelle 4.1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Mutanten aufgelistet. Die ersten Proben wurden von der AG Schneider markiert. Im Verlauf dieser Arbeit wurde dann das Verfahren zum Labeling optimiert, um eine höhere Labelingstöchiometrie und einen geringeren Proteinverlust zu erreichen. Diese Arbeiten wurden in der AG Alexiev

4. Fluoreszenzmarkierung der Mutanten von MalE und MalFGK₂

durchgeführt.

Datum	Probe	LS
	Fluoresceinmarkierte Mutanten in MalF	
09.07.2008*	MalF(T177C-AF)GK(C40S) ₂	53 %
17.12.2008*	MalF(T177C-AF)GK(C40S) ₂	38 %
12.03.2010	MalF(T177C-AF)GK(C40S) ₂	92 %
22.03.2010	MalF(T177C-AF)GK(C40S) ₂	100 %
04.05.2010	MalF(T177C-AF)GK(C40S/C350M/C360S) ₂	67 %
13.08.2010	MalF(T177C-AF)GK(C40S/C350M/C360S) ₂	100 %
27.08.2010	MalF(T177C-AF)GK(C40S) ₂	95 %
28.07.2011	MalF(S205C-AF)GK(C40S) ₂	100 %
	Fluoresceinmarkierte Mutanten in MalG	
17.12.2008*	MalFG(P78C-AF)K(C40S) ₂	14 %
17.12.2008*	MalFG(Q256C-AF)K(C40S) ₂	58 %
	Fluoresceinmarkierte Mutanten in MalE	
02.10.2009*	MalE(G13C-AF)	24 %
12.03.2010	MalE(G13C-AF)	68 %
13.08.2010	MalE(G13C-AF)	93 %
10.08.2011	MalE(G13C-AF)	100 %
09.12.2011	MalE(G13C-AF)	82 %
16.12.2011	MalE(G13C-AF)	81 %
02.10.2009*	MalE(T31C-AF)	2.3 %
02.10.2009*	MalE(E211C-AF)	18 %

Tabelle 4.1.: **Fluorescein markierte (LS) Mutanten** mit Herstellungs- bzw. Übergabedatum und Labelingstöchiometrie. Die mit * versehenen Proben wurden von der AG Schneider fluoreszenzmarkiert. Das Datum entspricht dann der Übergabe an die AG Alexiev und sonst dem Markierungsdatum.

5. Aktivitätsbestimmung von MalFGK₂

Fluoreszenz-basierte Methoden sind ein wichtiges Werkzeug, um Informationen über die Struktur, Dynamik und Funktion von biologischen Makromolekülen zu erhalten. Das zu untersuchende Biomolekül kann hierfür mit kovalent gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden (Kim et al., 2009; Kirchberg et al., 2011; Winkler et al., 2007; Alexiev et al., 2003). Dabei ist eine Voraussetzung für die Nutzung dieser fluoreszenzmarkierten Biomoleküle, dass ihre Funktionstüchtigkeit durch die Markierung nicht beeinträchtigt wird. Zur Untersuchung der Dynamik des heteromeren ABC-Maltose-Transporters und seiner Interaktion mit dem Maltose-Bindeprotein MalE wurden in der vorliegenden Arbeit die periplasmatischen Loops der TMD des Transporters und verschiedene ausgewählte Positionen an MalE fluoreszenzmarkiert.

Die Energie, die für den Transport der Maltose durch die Zellmembran benötigt wird, entsteht durch ATP-Hydrolyse in den MalK-Untereinheiten. Die ATP-Hydrolyse und damit verbunden die Freisetzung von Energie kann nur stattfinden, wenn Maltose gebunden ist, und dies erfolgt nur bei an MalE gebundener Maltose (Schneider et al., 2011). Deshalb wird die funktionelle Aktivität des ABC-Transporters über die ATP-Hydrolyse-Aktivität (ATPase-Aktivität) unter Transportbedingungen, d. h. in Anwesenheit von Maltose, MalE und ATP bestimmt (Daus et al., 2006; Nikaido et al., 1997). In dieser Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, um die ATPase-Aktivität von fluoreszenzmarkierten Maltose-Transporterkomplexen nachzuweisen (Repen et al., 2012). Im folgenden werden verschiedene ATP-Aktivitätstests vorgestellt und die Weiterentwicklung eines Malachit-Grün-Assays für fluoreszenzmarkierte Maltosetransporter beschrieben.

5.1. ATPase-Aktivitätstests

Entscheidend für einen ATPase-Aktivitätstest ist die genaue Bestimmung des freigesetzten Phosphats. Hierfür gibt es verschiedene radiometrische und photometrische Methoden. Letztere haben im Gegensatz zu radiometrischen Methoden den Vorteil, dass sie ohne radioaktive und somit gefährdende Komponenten auskommen. Um direkt messbegleitend die ATPase-Funktion zu bestimmen, wurde deshalb ein photometrischer Test so weiterentwickelt, dass sensitiv die Aktivität von fluoreszenzmarkierten solubilisierten Maltosetransporter-Protein gemessen werden kann. Mit Hilfe einer Kalibrierkurve mit bekannten Phosphatkonzentrationen kann das durch die hydrolytische Aktivität des MalK

5. Aktivitätsbestimmung von MalFGK_2

freigesetzte Phosphat bestimmt werden.

Zu den photometrischen Phosphatbestimmungsmethoden sind insbesondere die Molybdänblau-, Vanadat-Molybdat und Malachitgrün-Verfahren zu nennen (Fiske and Subbarow, 1925; Carter and Karl, 1982; Itaya and Ui, 1966; Gericke and Kurmies, 1952). In allen drei Verfahren ist Ammoniummolybdat der Komplexbildner mit dem freien anorganischen Phosphat. Bei dem Molybdänblau-Verfahren setzen sich Orthophosphate mit Ammoniummolybdat im sauren Milieu zu Phosphomolybdänsäure um. Durch ein Reduktionsmittel ergibt sich das Phosphomolybdänblau, welches im Spektralbereich zwischen 740 nm und 880 nm detektiert werden kann (Chifflet et al., 1988).

Das Vanadat-Molybdat-Verfahren kommt ohne Reduktionsmittel aus. Dabei reagieren Orthophosphat und Ammoniumvanadat zum gelben Ammoniumphosphorvanadomolybdat. Dieses kann bei 380 nm photometrisch gemessen werden (Gericke and Kurmies, 1952).

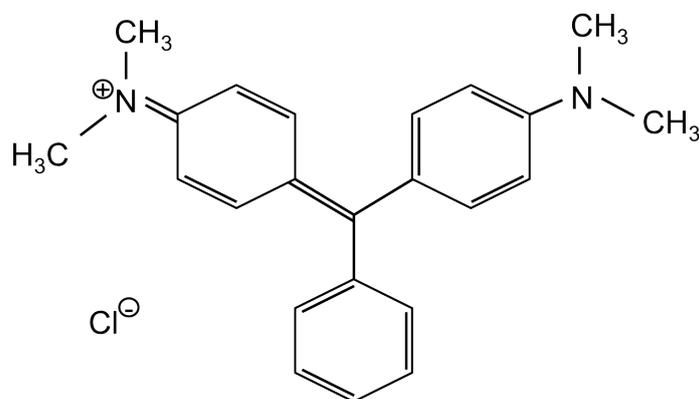


Abbildung 5.1.: **Strukturformel von Malachitgrün** mit dem Grundkörper Triphenylmethan in der Mitte.

Eine weitere Methode ist der Malachitgrün-Assay. Malachitgrün gehört zu den Triphenylmethanfarbstoffen (Abbildung 5.1). Das Orthophosphat bildet, wie in Abbildung 5.2 dargestellt, unter sauren Bedingungen einen Komplex mit Ammoniummolybdat (Itaya and Ui, 1966; Terasaki and Brooker, 1976). Die darauf folgende Bindung des Malachitgrüns mit dem Phosphomolybdat lässt sich bei einer Wellenlänge von 620 nm-750 nm nachweisen (Baykov et al., 1988).

Für die vorliegende Arbeit wurde zunächst das Molybdänblauverfahren zur Phosphatbestimmung nach Chifflet et al. (1988) getestet. Als Reduktionsmittel wirkt hier die Ascorbinsäure. Zur Durchführung des Molybdänblauverfahrens werden mehrere Chemikalien benötigt, die zum Teil jedesmal frisch angesetzt werden und bestimmten Spezifikationen entsprechen müssen. Diese variieren jedoch nach Herstellerfirma und Charge. In einer Testmessung konnte aus diesem Grunde mit den vorhandenen Chemikalien kei-

5. Aktivitätsbestimmung von MalFGK₂



Abbildung 5.2.: **Malachitgrünreaktion mit Phosphat und Ammoniummolybdat.** Freies Phosphat wird mit Ammoniummolybdat zu Phosphomolybdat, welcher als Komplex nur im Sauren stabil ist. Der gelbe Phosphomolybdat-Komplex wiederum bildet mit Malachitgrün einen photometrisch detektierbaren und stabilen Komplex.

ne zufriedenstellende Kalibrierkurve aufgenommen werden. Deshalb wurde nach einer alternativen Methode gesucht.

Diese alternative Methode bestand aus einem käuflich zu erwerbenden *SensoLyte Malachit Green Colometric Assay* von Anaspec. Hierbei handelt es sich um einen Malachitgrün-Assay, welcher eine hohe Genauigkeit im Konzentrationsbereich von 8 pM bis 50 µM von freiem Phosphat besitzt [Anaspec]. Im Gegensatz zum Molybdänblauverfahren besteht dieser Test nur aus der Malachitammoniummolybdat-Lösung und einem Phosphatstandard für die Herstellung der Kalibrierkurve.

5.2. Malachitgrün-Verfahren: Kalibrierkurve

Die Aufnahme einer Kalibrierkurve mit definierten Phosphatkonzentrationen ist essentiell für eine spätere Phosphatbestimmung. Hierfür wurde mit KH₂PO₄ als Phosphatstandard eine Verdünnungsreihe von 12.5 µM bis 0.78 µM in Probenpuffer (50 mM Tris pH 8, 20 % Glycerin, 0.01 % DDM, 0.1 mM PMSF) hergestellt. Die Konzentration wurde hierbei schrittweise halbiert. Von jeder hergestellten Konzentration wurde nach Zugabe der Anaspec Malachitgrünlösung und einer Inkubationszeit von 30 min. ein Absorptionsspektrum von 600 nm bis 800 nm gemessen (siehe Abbildung 5.3). Wie vom Hersteller angegeben, wurden die Absorptionswerte bei 650 nm für die Kalibrierkurve, wie sie in Grafik 5.4 dargestellt wird, verwendet. Dabei wurde der Absorptionswert der Malachitgrün-Lösung ohne Phosphat als Hintergrundabsorption (sogenannter Blank-Wert) abgezogen. Die erhaltene Kalibrierkurve zeigt eine lineare Abhängigkeit der Absorptionswerte im gesamten verwendeten Konzentrationsbereich des Phosphatstandards. Es ist jedoch erkennbar, dass die Messpunkte um die Ausgleichgerade schwanken.

5. Aktivitätsbestimmung von MalFGK₂

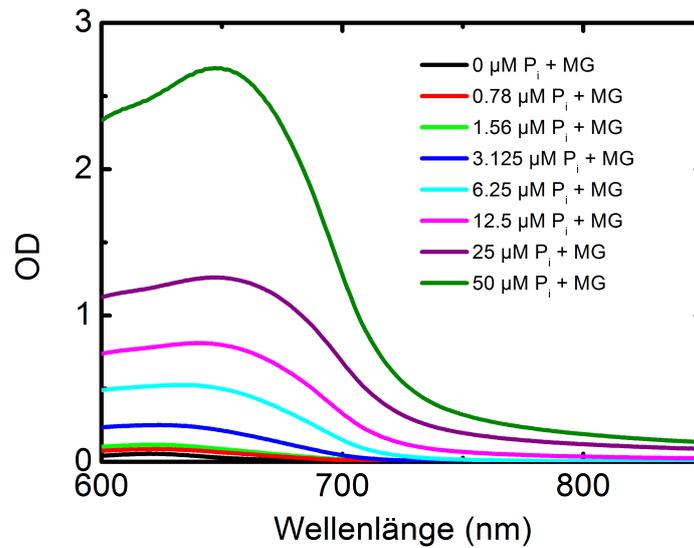


Abbildung 5.3.: **Malachitgrün (MG)-Phosphat- Komplexes bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen in Probenpuffer.** Bei 650 nm ist eine Proportionalität von der Absorption zur Phosphatkonzentration zu erwarten. Die Lösungen wurden in 50 mM Tris pH 8, 20 % Glycerin, 0.01 % DDM, 0.1 mM PMSF bei 20°C gemessen.

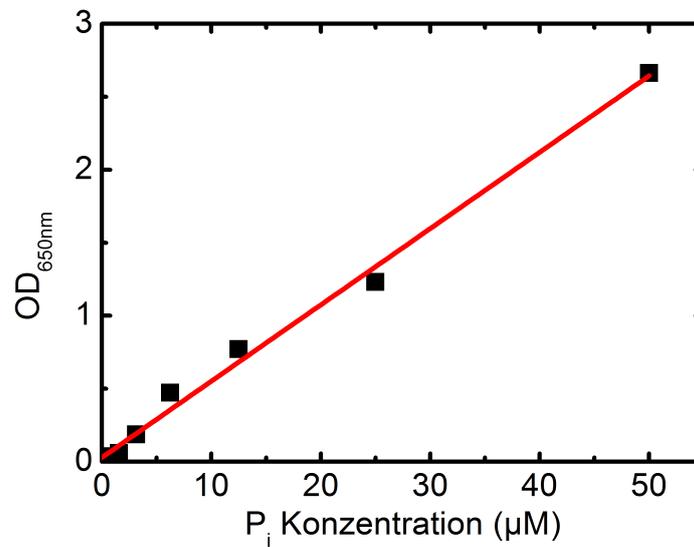


Abbildung 5.4.: **Kalibrierkurve des Malachitgrün-Verfahrens nach Herstellerprotokoll.** Die Messungen wurden in Probenpuffer durchgeführt. Aus den Absorptionsdaten bei 650 nm aus Abbildung 5.3 gewonnen und mit einer Ausgleichsgeraden gefittet. Messbedingungen: 50 mM Tris pH 8, 20 % Glycerin, 0.01 % DDM, 0.1 mM PMSF, 20°C.

5.3. Optimierung des Malachitgrün-Verfahrens für die Aktivitätsbestimmung des ABC-Transporters

Für eine genaue Durchführung des Malachitgrün-Verfahrens muss ausgeschlossen werden, dass die für den Aktivitätstest verwendeten Chemikalien die Phosphatbestimmung beeinflussen. Bei Natriumdodecylsulfat (SDS), einem Detergens, welches zum Stoppen der enzymatischen Aktivität durch Denaturierung des Transporters verwendet wird, wurde eine solche Beeinflussung nachgewiesen. Das SDS bewirkt eine Verfärbung des Malachitgrüns (Terasaki and Brooker, 1976). Weitere Chemikalien, die die Reaktion beeinflussen können sind Glycerin (Zhu et al., 2009) und Ammoniummolybdat (Geladopoulos et al., 1991).

Um trotz der zusätzlichen Absorptionsbande aufgrund der Zugabe von SDS eine Phosphatbestimmung durchführen zu können, wurden die Absorptionsspektren von SDS und Phosphat, welche jeweils mit Malachitgrün reagieren wie in Abbildung 5.5 gezeigt, analysiert. Die Absorptionsmaxima der beiden Spektren unterscheiden sich deutlich. Der Komplex mit SDS hat einen Peak der Absorptionsbande bei 629 nm, währenddessen der Malachitgrün-Phosphat-Komplex eine dazu rotverschobene Absorptionsbande aufweist (Abbildung 5.6). Somit kann zwischen beiden Absorptionsbanden unterschieden werden. Bei 700 nm ist die Absorption des SDS-Malachitgrün-Komplexes marginal im Vergleich zur Absorption des Phosphat-Malachitgrün-Komplexes. Alle weiteren Kalibrierkurven wurden deshalb in Gegenwart von SDS aufgenommen und die Absorption bei 700 nm als Messwert für die Kalibrierkurve verwendet.

Eine weitere Schwierigkeit zur Bestimmung der Phosphatkonzentration stellt das Glycerin dar. Glycerin wird zur Stabilisierung des Proteins verwendet und ist somit ein fester Bestandteil des Puffers. Es ist bekannt, dass Glycerin eine Verringerung der Absorption bei Ammoniummolybdat-basierten-Assays verursacht (Chifflet et al., 1988). Es wurde eine bis zu 67% geringere Absorption festgestellt.

Um zu testen, ob die verringerten Absorptionswerte mit einer verlangsamten Kinetik der Bildung des Komplexes erklärt werden kann, wurde der Zeitverlauf der Bildung des Komplexes mit verschiedenen Glycerin Konzentrationen spektroskopisch aufgenommen (Abbildung 5.6 und 5.7). Es zeigte sich, dass bei 20% Glycerin der Reaktionsverlauf stark verlangsamt ist und die Sättigung erst nach 200 Minuten erreicht wird. In H₂O ohne Glycerin tritt die Sättigung dagegen schon nach 20 Minuten ein (Geladopoulos et al., 1991). Wie in Abbildung 5.6 zu erkennen, ist der Verlauf der Kinetik in Anwesenheit von 20% Glycerin nicht gut reproduzierbar. Um die Reaktionszeit bis zur Sättigung zu senken, wurde die Konzentration des Glycerins auf 2% herabgesetzt. Wie Abbildung 5.7 zeigt, tritt die Sättigung jetzt schon nach 40-60 Minuten ein und eine Reproduzierbarkeit der Kinetik ist unter diesen Bedingungen wieder gegeben. Da eine Verringerung der Gly-

5. Aktivitätsbestimmung von MalFGK₂

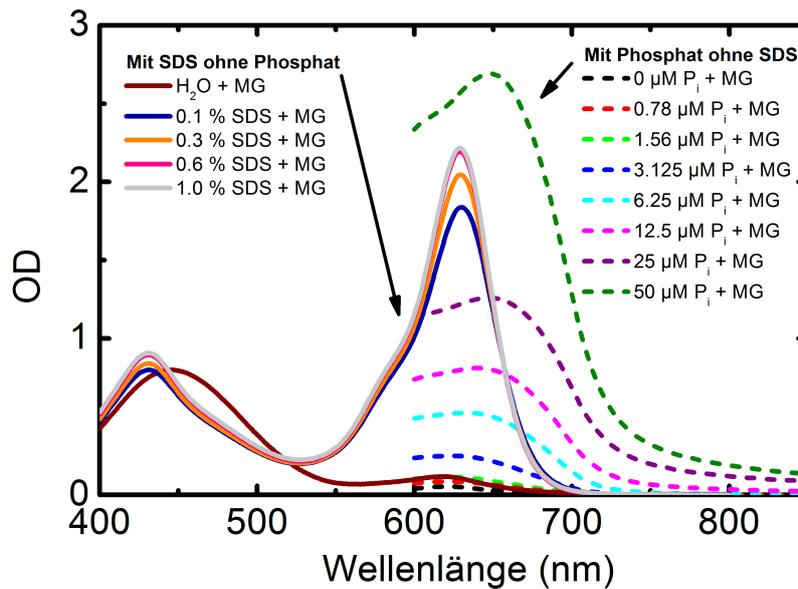


Abbildung 5.5.: **Einfluss von SDS:** Absorptionsspektren von verschiedenen Konzentrationen des Phosphatstandards mit Malachitgrün (MG) (50 mM Tris pH 8, 20 % Glycerin, 0.01 % DDM, 0.1 mM PMSF) und verschiedene SDS Konzentrationen in MilliQ-Wasser mit Malachitgrün. Die Absorption der Lösungen mit SDS ist im Gegensatz zur Phosphatlösung bei 700 nm marginal.

cerinkonzentration im Puffer zur Instabilisierung des ABC-Transporterkomplexes führt, kann diese nur nach der Inaktivierung des Transportkomplexes, d. h. nach der Zugabe des SDS erfolgen (Landmesser et al., 2002). Die Probenlösung wurde deshalb nach der ATPase-Reaktion und dem folgenden Abstoppprozess mit SDS auf ein Fünftel verdünnt. Dies führte zu einer Glycerinkonzentration von 4 %, welche ebenfalls noch eine genaue Phosphatbestimmung ermöglichte. Die Phosphatkonzentration, die dabei um den Faktor 5 gesenkt wurde, liegt immer noch im linearen Bereich von 0.1 μM bis 50 μM der Phosphatdetektion.

5. Aktivitätsbestimmung von MalFGK₂

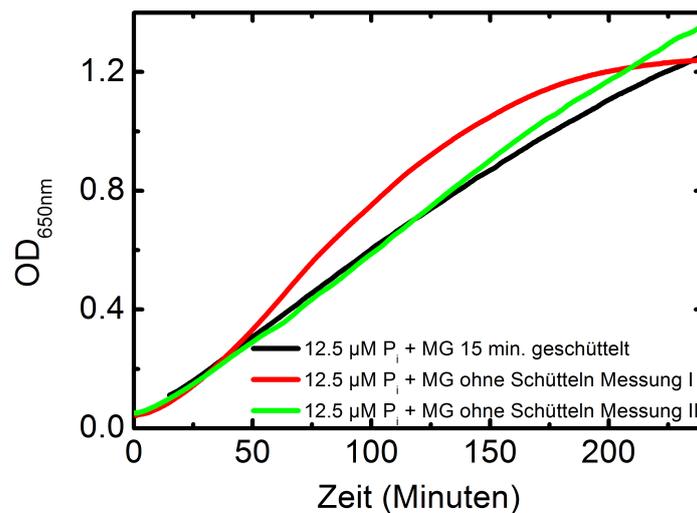


Abbildung 5.6.: **Einfluss von Glycerin:** Kinetik der Absorption bei 650 nm von Phosphatstandard mit Malachitgrün (MG) (12.5 µM P_i, 50 mM Tris pH 8, 20 % Glycerin, 0.01 % DDM, 0.1 mM PMSF). Die schwarze Kurve wurde nach einer 15-minütigen Inkubationszeit, 250 rpm geschüttelt, aufgenommen. Die grüne und rote Kurve wurden direkt nach der Zugabe von Malachitgrün aufgenommen.

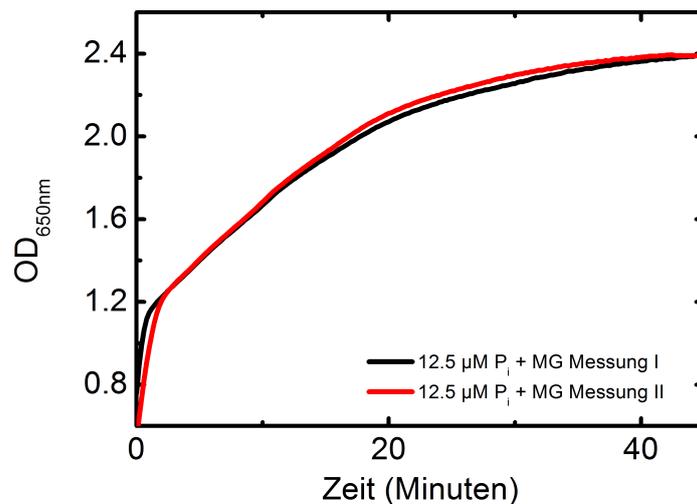


Abbildung 5.7.: **2 % Glycerin:** Kinetik der Absorption bei 650 nm von Phosphatstandard mit Malachitgrün (MG) (12.5 µM P_i, 5 mM Tris pH 8, 2 % Glycerin, 0.001 % DDM, 0.01 mM PMSF). Beide Messungen sind unabhängig voneinander gemessen und reproduzierbar. Die hohe Viskosität von Glycerin verhindert eine schnelle Mischung der Reaktanten und verlangsamt die Reaktion mit Malachitgrün.

Da eine Stunde Reaktionszeit ebenfalls noch zu lang für die Anzahl der durchzuführenden Messungen ist, wurde nach einer Lösung gesucht, die Reaktionszeit zu beschleunigen. Es gibt eine Korrelation zwischen Veränderung der Ammoniummolybdatkonzentration

5. Aktivitätsbestimmung von MalFGK₂

und der Farbentwicklung des Malachitgrüns mit dem freien Phosphat (Geladopoulos et al., 1991). Um die Reaktion zu beschleunigen, wurde zusätzlich zur Malachitgrün-Lösung des Herstellers 2.2 % Ammoniummolybdat zum Reaktionsansatz zugegeben. Wie deutlich in Abbildung 5.8 zu sehen ist, beschleunigt sich die Kinetik der Reaktion und die Sättigung wird nach ca. 30 Minuten erreicht. Alle weiteren Absorptionsbestimmungen für die Phosphatkonzentrationsbestimmung wurden nach einer 30-minütigen Reaktionszeit mit Malachitgrün aufgenommen.

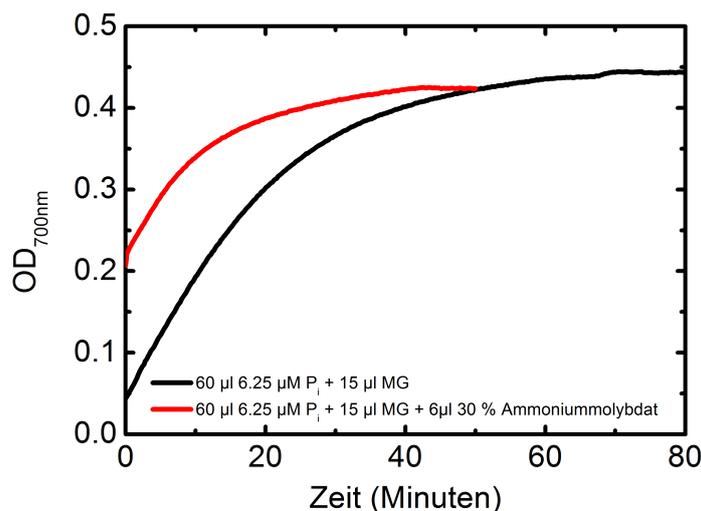


Abbildung 5.8.: **Einfluss von Ammoniummolybdat:** Kinetik der Absorption bei 650 nm von Phosphatstandard mit Malachitgrün (MG) (6.25 μM P_i , 5 mM Tris pH 8.0, 4 % Glycerin, 0.001 % DDM, 0.01 mM PMSF, 0.4 % SDS). Die schwarze Kurve wurde ohne Ammoniummolybdat aufgenommen, die rote mit 2.2 % Ammoniummolybdat, welches die Reaktion von Malachitgrün mit freiem Phosphat beschleunigt.

Nachdem der Malachitgrün-Phosphat-Assay für die Probenpufferbedingungen des ABC-Transporters optimiert wurde, wurde eine neue Kalibrierkurve aufgenommen (Abbildung 5.10) Die dazugehörigen Absorptionsspektren sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Die entsprechenden Proben der Verdünnungsreihe von 12.5 μM bis 0.78 μM des Phosphatstandards wurden in 0.4 % SDS, 4 % Glycerin, 10 mM Tris pH 8.0, 0.002 % DDM und 0.02 μM PMSF hergestellt. Das Probenvolumen betrug 60 μl . Zu dieser wurden jeweils 15 μl Malachitgrün und 6 μl 30 % Ammoniummolybdat zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 20°C wurden jeweils Absorptionsspektren über den Wellenlängenbereich von 600 nm bis 800 nm gemessen. Aus den Absorptionswerten bei 700 nm wurde, wie in Abbildung 5.10 dargestellt, die Kalibrierkurve erstellt. Diese zeigt eine Steigung von 1.09 ± 0.01 ($\text{nmol}^{-1}\text{Phosphat} \cdot 60 \mu\text{l}$) pro OD, welche bezogen auf ein Probenvolumen von 60 μl eine direkte Umrechnung der OD zur Phosphatkonzentration ermöglicht.

5. Aktivitätsbestimmung von MalFGK₂

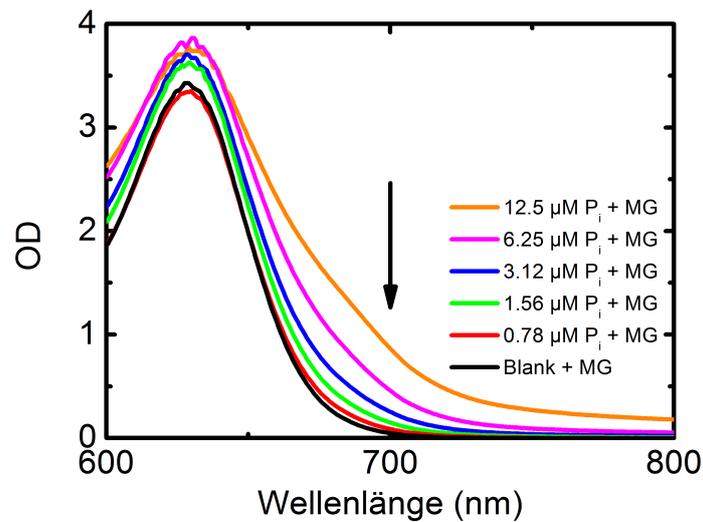


Abbildung 5.9.: **Absorptionsspektren des Phosphatstandards in unterschiedlichen Konzentrationen mit Malachitgrün (MG).** Bei 700 nm konnte eine Proportionalität von der Absorption zur Phosphatkonzentration nachgewiesen werden. Die Lösungen wurden in 10 mM Tris pH 8, 4 % Glycerin, 0.002 % DDM , 0.02 mM PMSF, 0.4 % SDS, 2.2 % Ammoniummolybdat gemessen.

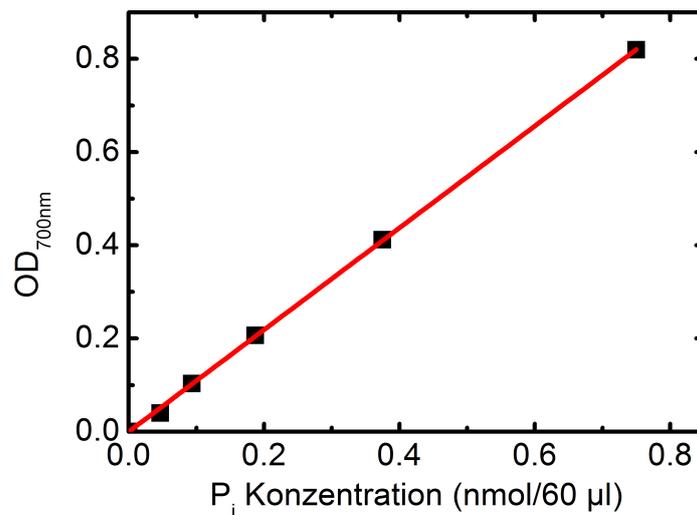


Abbildung 5.10.: **Kalibrierkurve unter optimierten Bedingungen** Absorptionsdaten bei 700 nm sind aus Abbildung 5.9 gewonnen und linear gefittet. Messbedingungen: 10 mM Tris pH 8, 4 % Glycerin, 0.002 % DDM , 0.02 mM PMSF, 0.4 % SDS, 2.2 % Ammoniummolybdat.

5.4. Kontrollmessungen

Nachdem der Malachitgrün-Phosphat-Test für die Probenpuffer-Bedingungen des ABC-Transporters optimiert wurde, müssen für den eigentlichen Aktivitätstests Kontrollmessungen durchgeführt werden. Wie in der Einleitung zu Kapitel 5 ausgeführt, wird die Aktivität des Maltose-Transporters über die ATPase-Aktivität der MalK-Untereinheiten bestimmt, welche unter Transportbedingungen, d.h. in Anwesenheit von Maltose, MalE und ATP, stimuliert wird. Die Kontrollmessungen sollen zeigen, ob die Malachitgrün-Lösung eine Verfärbung in Anwesenheit der einzelnen Proteine oder Chemikalien zeigt, die dann fälschlicherweise für freies Phosphat aus der ATP-Hydrolyse gehalten werden kann. Somit wurde der Malachitgrün-Test der Reihe nach in Anwesenheit vom Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein, von ATP, ATP und MalE, ATP und fluoreszenzmarkiertem MalE (G13C-AF), ATP und Transporter MalFGK₂(C40S) sowie von ATP und fluoreszenzmarkiertem MalF(T177C-AF)GK₂(C40S) durchgeführt. Die beiden letzten Messungen dienen ebenfalls zur Bestimmung der basalen ATPase-Aktivität des Transporters, d.h. der ATPase-Aktivität von MalK unter Nicht-Transportbedingungen. Diese basale ATPase Aktivität ist somit ein Hintergrundwert für die Bestimmung der Aktivität des Transporters. Unter den gleichen Bedingungen wie danach der Aktivitätstest durchgeführt wird, wurden die Kontrollproben in Probenpuffer (2 % SDS, 50 mM Tris pH 8.0, 20 % Glycerin, 0.01 % DDM, 0.1 mM PMSF) 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die anschließende Phosphatbestimmung erfolgte eine 1:5 Verdünnung der jeweiligen Kontrolllösung mit der dann geringeren Pufferkonzentration (0.4 % SDS, 10 mM Tris pH 8.0, 4 % Glycerin, 0.002 % DDM, 0.02 mM PMSF). Von dieser wurden 60 µl mit 15 µl Malachitgrün-Lösung und 6 µl 30 % Ammoniummolybdat zusammengegeben und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 20°C über die aufgenommenen Absorptionsspektren (600 nm bis 800 nm) die OD bei 700 nm bestimmt.

Das Ergebnis der ersten Kontrollmessung der inkubierten Blank-Probe zeigt keine Veränderung durch die 5-minütige Inkubation bei 37°C im unverdünnten Puffer. Die Ergebnisse der weiteren einzeln getesteten Komponenten finden sich in Abbildung 5.11.

Es ist zu erkennen, dass die Bestimmung der Basalaktivität des Transporters die höchsten Absorptionswerte ergibt (Abbildung 5.11). Da dieser Wert als Hintergrundwert für die Aktivitätsbestimmung des Transporters dient und alle anderen Absorptionswerte der einzelnen Komponenten kleiner als der Basalwert sind, ist eine Bestimmung der Phosphatkonzentration mit der für den Aktivitätstest erforderlichen Genauigkeit gegeben. Hervorzuheben ist, dass der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein, der für die Markierung des Transporters und des Maltosebindeproteins benutzt wurde, eine Absorption vergleichbar zu dem Blank-Wert aufweist (Abbildung 5.11). Nähere Informationen zu den Basalmessungen finden sich im folgenden Unterkapitel.

5. Aktivitätsbestimmung von MalFGK₂

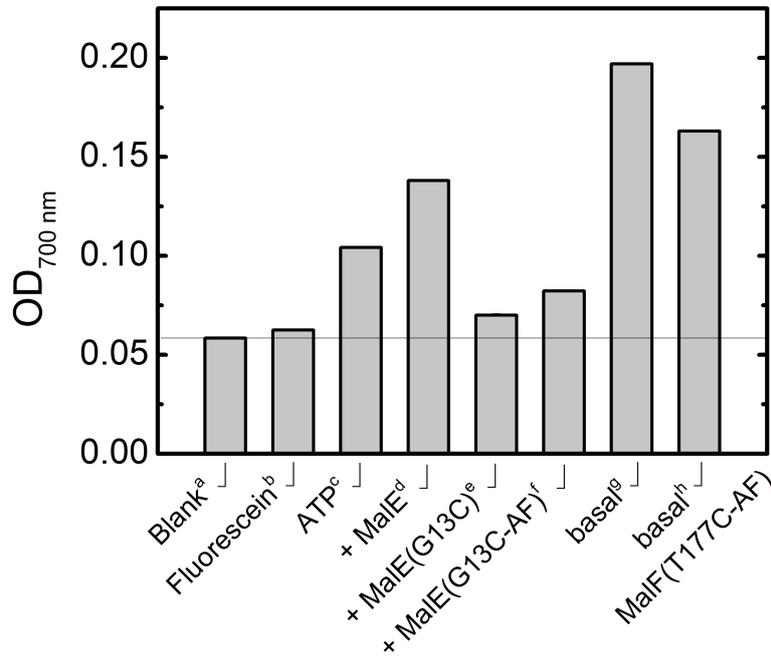


Abbildung 5.11.: **Kontrollmessungen mit dem Malachitgrün-Phosphat-Test.** Die Reaktion wurde unter den optimierten Bedingungen (vergleiche Abbildung 5.10) durchgeführt. Die Proben wurden zusätzlich 5 Minuten vor der Farbentwicklung bei 37°C inkubiert.

a) Blank-Wert in Anwesenheit von 0.4 % SDS, 10 mM Tris pH 8.0, 4 % Glycerin, 0.002 % DDM, 0.02 mM PMSF. b) 9.5 µM Fluorescein (IAF) in Anwesenheit von 0.4 % SDS, 10 mM Tris pH 8.0, 4 % Glycerin, 0.002 % DDM, 0.02 mM PMSF. c) 1.92 mM ATP in Anwesenheit von 9.6 mM MgCl₂, 0.4 % SDS, 10 mM Tris pH 8.0, 4 % Glycerin, 0.002 % DDM, 0.02 mM PMSF. d) 0.416 mg/ml MalE in Anwesenheit von 1.92 mM ATP, 9.6 mM MgCl₂, 10 µM Maltose, 0.4 % SDS, 10 mM Tris pH 8.0, 4 % Glycerin, 0.002 % DDM, 0.02 mM PMSF. e) 0.416 mg/ml MalE(G13C) in Anwesenheit von 1.92 mM ATP, 9.6 mM MgCl₂, 10 µM Maltose, 0.4 % SDS, 10 mM Tris pH 8.0, 4 % Glycerin, 0.002 % DDM, 0.02 mM PMSF. f) 0.416 mg/ml MalE(G13C-AF) in Anwesenheit von 1.92 mM ATP, 9.6 mM MgCl₂, 10 µM Maltose, 0.4 % SDS, 10 mM Tris pH 8.0, 4 % Glycerin, 0.002 % DDM, 0.02 mM PMSF. g) 0.013 mg/ml MalFGK₂(C40S) in Anwesenheit von 1.92 mM ATP, 9.6 mM MgCl₂, 0.4 % SDS, 10 mM Tris pH 8.0, 4 % Glycerin, 0.002 % DDM, 0.02 mM PMSF. h) 0.013 mg/ml MalF(T177C-AF)GK(C40S)₂ in Anwesenheit von 1.92 mM ATP, 9.6 mM MgCl₂, 10 µM Maltose, 0.4 % SDS, 10 mM Tris pH 8.0, 4 % Glycerin, 0.002 % DDM, 0.02 mM PMSF

5.5. Bestimmung der Transporter-Aktivität

Die Bestimmung der Transporter-Aktivität wird in Abbildung 5.12 exemplarisch für den Transporterkomplex MalFGK(C40S)₂ und fluoreszenzmarkiertes MalE und nicht-fluoreszenzmarkiertes MalE dargestellt. Hierzu wurde die ATPase-Reaktion vor Zugabe von MalE (0 Minuten Wert), nach 2 Minuten, 5 Minuten und 10 Minuten mit SDS gestoppt. Danach wurde die jeweilige Probe im Verhältnis 1:5 mit H₂O verdünnt. Zur Phosphatbestimmung wurden dann zu 60 µl Probe 6 µl 30% Ammoniummolybdat und 15 µl Malachitgrün hinzugefügt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde die Absorption über das Spektrum von 600 nm bis 800 nm aufgenommen. Der Absorptionswert bei 700 nm diente zur Bestimmung der Phosphatkonzentration unter Benutzung der Kalibrierkurve, die in Abbildung 5.10 gezeigt ist. Die berechneten Phosphatkonzentrationen zu den vier Zeitpunkten, normiert auf die Menge des eingesetzten Transporters MalFGK₂ wurden in Abbildung 5.12 als Funktion der Reaktionszeit aufgetragen. Die Daten in allen drei gezeigten Messreihen wurden dreifach bestimmt und die Messreihen wurden zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Für alle drei Messreihen wird der Sättigungsbereich nach 10 Minuten erreicht. Für die Bestimmung der Aktivität von MalFGK(C40S)₂ wird die Basalaktivität, dargestellt als schwarze Datenpunkte in Abbildung 5.12, mit der ATPase-Aktivität unter Transportbedingungen, d. h. in Anwesenheit von MalE und Maltose (grüne Datenpunkte), verglichen. Es ist deutlich zu sehen, dass im Sättigungsbereich eine ca. 3-fach höhere Konzentration an Phosphat vorhanden ist. Eine Erhöhung der Aktivität unter Transportbedingungen um einen Faktor zwei gegenüber der Basalaktivität zeigt die normale Wildtyp-Aktivität des Transporters in Detergenzlösung an (Daus et al., 2006). Die eingesetzten Konzentrationen an MalFGK(C40S)₂, MalE und Maltose für den in dieser Arbeit durchgeführten Malachitgrün-Phosphat-Test zur Bestimmung der ATPase-Aktivität (siehe Angaben in Kapitel 3.8.1) sind vergleichbar zu denen, die für den in der Literatur verwendeten Molybdänblau-Test eingesetzt wurden (Daus et al., 2006, 2007a). Im Fall von fluoreszenzmarkiertem MalE(G13C-AF) (rote Datenpunkte in Abbildung 5.12) liegen die bestimmten Phosphatwerte nur etwas niedriger als für MalE. Es ist klar zu erkennen, dass die Aktivität unter Transportbedingungen mindestens einen Faktor zwei grösser ist als die Basalaktivität. Damit konnte gezeigt werden, dass auch fluoreszenzmarkiertes MalE(G13C-AF) aktiv ist.

Zusätzlich zu dem Aktivitätstest von MalE G13C-AF mit dem Komplex in Detergens wurde ein Aktivitätstest mit MalE G13C-AF mit dem Komplex in Proteoliposomen durchgeführt. Dieser Test soll zeigen, dass sich die Mutation und das Labeling mit IAF nicht negativ auf die Aktivität des Transporters auswirkt, wenn er sich in einer natürlichen Umgebung, in einem Lipidbilayer, befindet (siehe Abschnitt 5.5.2).

5. Aktivitätsbestimmung von MalFGK₂

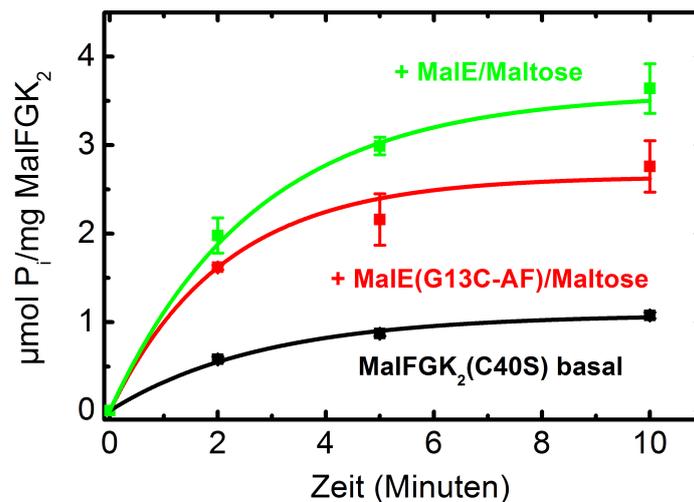


Abbildung 5.12.: **Aktivitätstest MalE und MalE G13C-AF** Bestimmung des Phosphatgehalts im Verhältnis zum eingesetzten Protein nach einer ATPase-Aktivität von 0, 2, 5 und 10 Minuten angefitet mit der Exponentialfunktion $Y = K_{max} \cdot e^{-kt}$ angefitet (Koepsell et al., 2005), wobei K_{max} den theoretischen Sättigungswert angibt. MalE (grün) und die AF markierte Mutante MalE G13C-AF im Vergleich zum Basalwert (schwarz).

5.5.1. Übersicht der Aktivitätstests für die Transporter-Komplexvarianten

In diesem Abschnitt wird der ATPase-Aktivitätstest für die fluoreszenzmarkierten und unmarkierten Transporter-Komplexmutanten beschrieben. Es wurden die Sättigungswerte der Phosphatkonzentrationen der Aktivitätsmessungen mit den verschiedenen Komplexvarianten im P2-Loop von MalF ermittelt und in Abbildung 5.13 dargestellt. Die getesteten Komplexvarianten zeigen eine eindeutig höhere Aktivität mit MalE und Maltose im Vergleich zur Basalaktivität. Die markierte Probe MalF(T177C-AF)GK₂ zeigt im Bereich des Fehlers keine Aktivitätsveränderung zur unmarkierten Mutante MalF(T177C)GK₂. Die Markierung durch Fluorescein bewirkt keine Verringerung der ATPase Aktivität bei der Variante MalF(T177C)GK₂. Beide Proben von MalF(T177C)GK₂, markiert und unmarkiert, sind somit aktiv. Dies stimmt auch mit den Aktivitätsbestimmungen von MalFGK₂ in der Literatur (Daus et al., 2006) überein.

Bei MalF(S205C)GK₂ ist jedoch eine signifikante Verringerung der Aktivität durch die Markierung mit Fluorescein zu beobachten. Die unmarkierte Variante besitzt eine höhere Aktivität als MalFGK₂, verliert diese aber durch die Fluoresceinmarkierung. Dies gilt für die basale Aktivität und die Aktivität mit MalE und Maltose. Die ATPase-Aktivität mit Maltose und MalE für MalF(S205C-AF)GK₂ ist vergleichbar zur Basalaktivität von unmarkierter MalF(S205C)GK₂. Die Mutante MalF(S205C)GK₂ ist dadurch für weitere Fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungen zur Aufklärung des Transportmechanismus ungeeignet.

5. Aktivitätsbestimmung von MalFGK₂

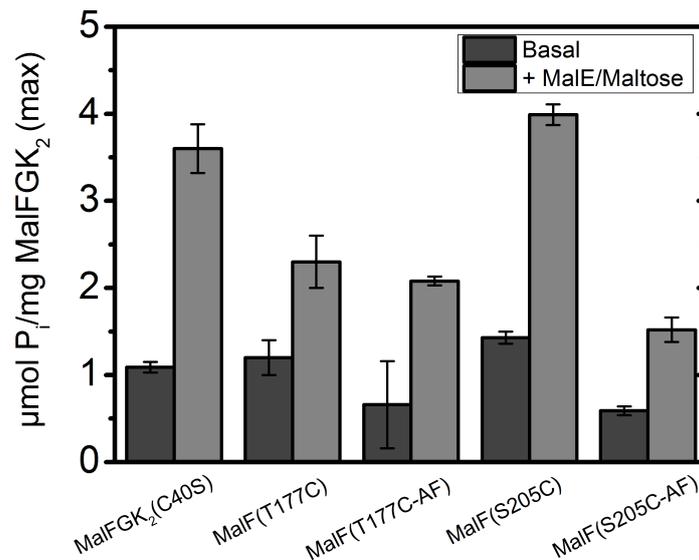


Abbildung 5.13.: **ATPase-Aktivitätstests der verschiedenen Komplexmutanten im Vergleich** Die ermittelten Sättigungswerte des Phosphatgehalts nach ATP-Hydrolyse unter Transportbedingungen für verschiedene MalFGK₂-Varianten, fluoreszenzmarkiert und unmarkiert.

5.5.2. Übersicht der Aktivitätstests für die MalE-Varianten

Zusätzlich zu den Transporterkomplex-Varianten wurden auch markierte und unmarkierte MalE-Varianten auf Aktivität getestet. In Abbildung 5.14 sind Sättigungswerte der Phosphatkonzentrationen der Aktivitätsmessungen mit den verschiedenen Varianten von MalE als Balkendiagramm dargestellt.

Die Mutante MalE(G13C) ist, wie in Kapitel 5.5 beschrieben, im markierten und unmarkierten Zustand aktiv. Die Mutante MalE(E211C) hat im Bereich des Fehlers den gleichen Sättigungswert im markierten und unmarkierten Zustand wie MalE(G13C) und wird daher als aktiv angesehen.

Zusätzlich zu den Messungen von MalE wt und MalE(G13C) markiert und unmarkiert mit dem Komplex in Detergens wurden außerdem noch Messungen mit dem Komplex in Proteoliposomen durchgeführt (Durchführung siehe Abschnitt 3.8). Aus der Literatur ist bekannt (Daus et al., 2007a), dass für den den Transporterkomplex in Membranumgebung, im Gegensatz zum Detergenz-solubilisierten Transporter, eine vernachlässigbare basale ATPase-Aktivität vorhanden ist. Wie erwartet, zeigen auch die hier durchgeführten Messungen im Membransystem (Proteoliposomen) eine geringere Basalaktivität im Vergleich zum Transporterkomplex in Detergenzmizellen (Abbildung 5.14). Alle hier getesteten MalE Varianten besitzen eine eindeutige Aktivität.

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltostransporter

Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie-Zerfallsmessungen in Kombination mit ortsspezifisches Fluoreszenz-Labeling ermöglicht es, Informationen über die lokale Dynamik von interhelikalen Loop-Domänen im Pikosekunden- und Nanosekundenbereich zu erhalten (Kim et al., 2012). Die Rotationsdiffusion des kovalent gebundenen Farbstoffs wird von der Bewegung des Proteinsegments, an welches die Fluoreszenzreportergruppe gebunden ist, beeinflusst. Damit manifestiert sich in der Anisotropiezerfallskurve eine Hierarchie von Bewegungen die aus der Rotationsbewegung des Farbstoffs, der beweglichen Proteinsegmente und der Gesamtrotation des Moleküls, in diesem Fall des Transporterkomplexes, resultiert. Die Anisotropiezerfallskurve enthält somit sowohl Informationen über globale und lokale Proteindynamiken als auch über die Proteinstrukturen und Konformationsänderungen. Der Konformationsraum und die Bewegung der interhelikalen periplasmatischen Loops in den verschiedenen Stadien des Transportvorgangs sind von Interesse.

6.1. Messungen an der periplasmatischen Oberfläche

In der vorliegenden Arbeit wurde die periplasmatische Oberfläche des ABC-Maltostransporters untersucht. Im Fokus waren hierbei der große und für den Maltosetransport bedeutende periplasmatische P2-Loop von MalF (Daus et al., 2009) und die ebenfalls im Transportzyklus beteiligten periplasmatischen Loops P1 und P3 von MalG (Daus et al., 2007a). Hierzu wurden, wie in Abbildung 6.1 zu erkennen ist, die Position 177 im P2-Loop von MalF und die Positionen 78 im P1-Loop und 256 im P3-Loop von MalG für die die Ankopplung Fluoreszenz-Reportergruppe ausgewählt. Die entsprechenden Cystein-Mutanten in diesen ausgewählten Positionen wurden vom Kooperationspartner AG Schneider schon in früheren Experimenten eingesetzt (Jacso et al., 2009; Daus et al., 2007a).

Aminosäure T177 befindet sich in einem kurzen helikalen Segment in der Mitte des P2-Loops von MalF und ist nicht in direktem Kontakt mit dem gebundenen MalE (Abbildung 6.1 und 2.3). Der P2-Loop enthält ca. 180 Aminosäuren und eine ausgeprägte Sekundärstruktur aus β -Faltblatt und α -Helices. Der P1-Loop von MalG ist im Gegensatz zum P2-Loop von MalF wesentlich kleiner. Die Position 78 befindet sich in einem

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

unstrukturierten Bereich in diesem Loop und ist ebenfalls nicht in direktem Kontakt mit dem gebundenen MalE soweit es sich anhand der Kristallstruktur beurteilen lässt (Abbildung 2.3). Von großem Interesse ist außerdem der P3-Loop von MalG, der trotz seiner geringen Größe tief ins Periplasma hineinreicht. Die Kristallstruktur des Transportkomplexes mit gebundenen MalE (Abbildung 2.3) deutet an, dass sich der P3-Loop in die Struktur des MalE eingepasst hat. Die Labelposition 256 befindet sich in einem unstrukturierten Bereich zwischen zwei Helices und auch hier besteht kein direkter Kontakt mit dem gebundenen MalE.

Zur Untersuchung der periplasmatischen Oberfläche und ihrer Bedeutung für den Transportvorgang wurde die Dynamik der drei hier beschriebenen Loops während des gesamten Transportzyklus mit Hilfe der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie untersucht. In An- und Abwesenheit von MalE, ATP und Maltose wurde der Zerfall der Fluoreszenzanisotropie gemessen und die Änderung zwischen den verschiedenen Transportschritten analysiert. Zusätzlich wurde in einem letzten Schritt die Hydrolysefähigkeit der markierten Mutanten unter Transportbedingungen getestet. Hierzu wurde der Transporter in Anwesenheit von MalE, ATP, Maltose und verschiedenen MgCl_2 -Konzentrationen untersucht, um die Auswirkung auf die periplasmatische Oberfläche der TMD zu ermitteln.

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

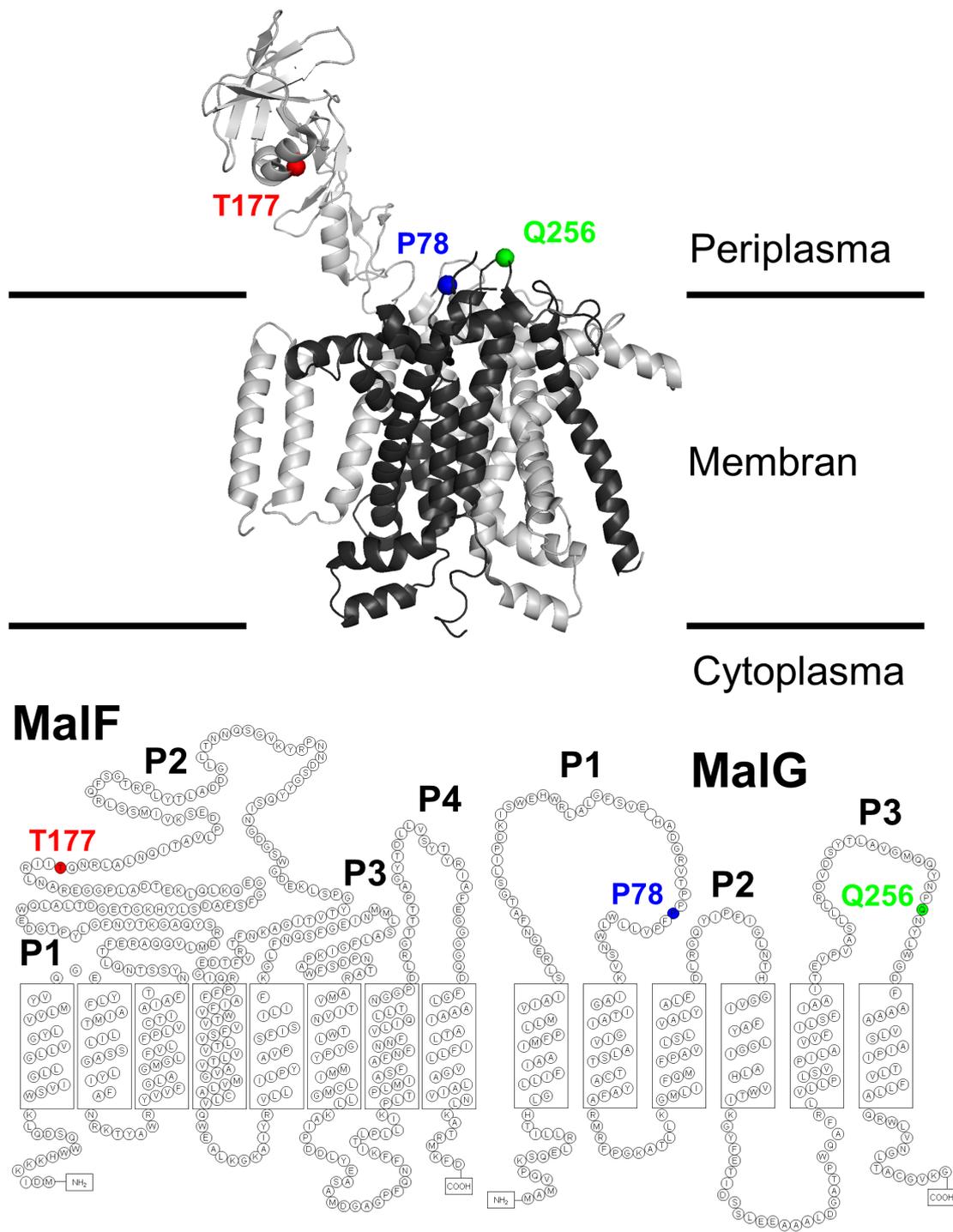


Abbildung 6.1.: **Sekundär- und Tertiärstruktur von MalF und MalG mit den ausgewählten Labelpositionen.** Markiert sind die Positionen T177 (rot), P78 (blau) und Q256 (grün). Die Abbildung wurde auf Grundlage der Kristallstruktur von Oldham et al. (2007) (PDB: 2R6G) und den Topologiemodellen von MalF (Froschauer et al., 1988) und MalG (Boyd et al., 1993) angefertigt.

6.1.1. Vergleich der Anisotropie-Zerfallskurven in den verschiedenen Positionen im Grundzustand des Transportzyklus

Zu Vergleichszwecken und zur Überprüfung des experimentellen Aufbaus wurden Anisotropie-Zerfallsmessungen mit freiem Fluorescein durchgeführt.

Hierzu wurde Fluorescein-Dinatriumsalz bei einem pH-Wert von 8.0 und einer Temperatur von 20°C mit der TCSCP-Apparatur parallel (I_{\parallel}) und senkrecht (I_{\perp}) gemessen (Abbildung 6.2 A).

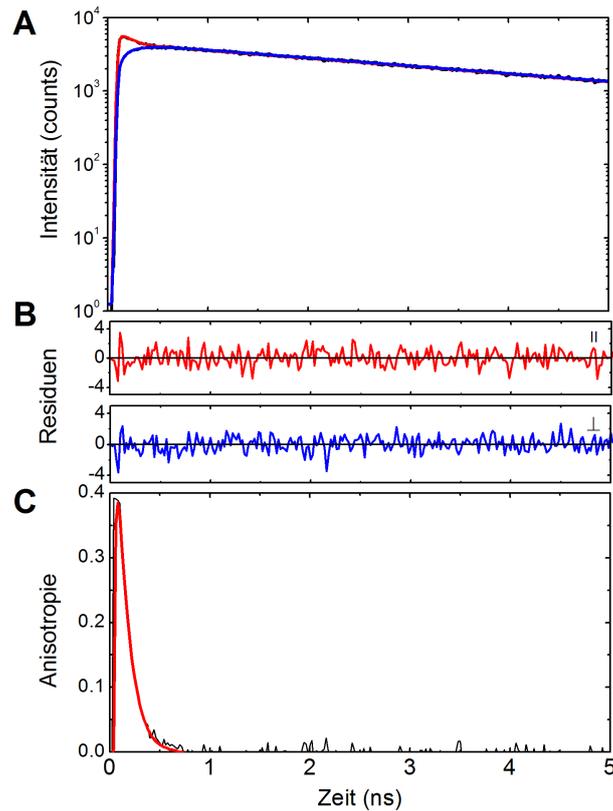


Abbildung 6.2.: **Fluoreszenzzerfall und -anisotropie von Fluorescein-Dinatriumsalz.** **A:** Die Fluoreszenzzerfallskurven I_{\parallel} , I_{\perp} (schwarz) und die Fits (rot: parallel, blau: senkrecht) mit einer Fluoreszenzzerfallszeit τ von 4.1 ns. **B:** Die Residuen der Fits aus A mit $\chi_r^2 = 1.0$. **C:** Die Anisotropiekurve $r(t)$ berechnet sich aus I_{\parallel} und I_{\perp} . Die berechnete Rotationskorrelationszeit ϕ_1 beträgt = 0.21 ns. Die Messung erfolgte von Fluorescein-Dinatriumsalz in 50 mM TRIS pH 8.0 bei 20°C.

In Abbildung 6.2 C erkennt man die schnell abfallenden Anisotropie des freien Fluoresceins. Innerhalb von 1 ns ist eine vollständige Depolarisation zu erkennen. Der Fit mit der Modelfunktion Gleichung 3.5 ergibt einen monoexponentiellen Abfall mit der Rotationskorrelationszeit $\phi_1 = 0.21$ ns. Die entsprechenden Residuen sind in Abbildung 6.2 B dargestellt. Die Fitdaten sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst. werden. Die Analyse

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

des Fluoreszenzzerfalls und der Fluoreszenzanisotropie-Daten wurde, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, durchgeführt.

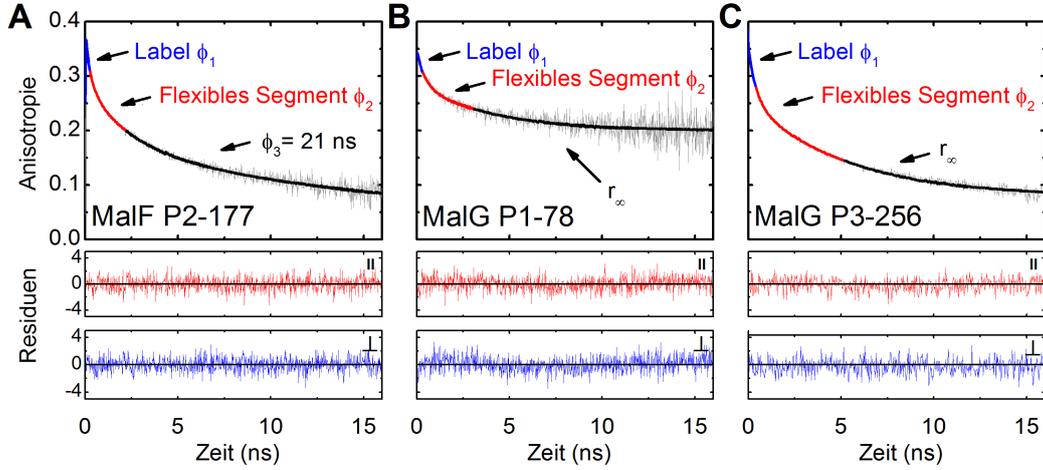


Abbildung 6.3.: **Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessung an der TMD-Oberfläche im Grundzustand.** **A:** Anisotropie von MalF(T177C-AF)GK₂ mit drei Rotationskorrelationszeiten: ϕ_1 für das Label (blau), ϕ_2 für das flexible Segment (rot) und ϕ_3 für den P2-Loop. In den unteren Graphen befinden sich die Residuen für die Fits von I_{\parallel} (rot) und I_{\perp} (blau). **B:** Anisotropiezerfall und Fitresiduen von MalFG(P78C-AF)K₂ mit ϕ_1 für das Label (blau), ϕ_2 für das flexible Segment (rot) und ϕ_3 für den gesamten Komplex. **C:** Anisotropiezerfall und Fitresiduen von MalFG(Q256C-AF)K₂. Alle Proben wurden in 50 mM Tris, pH 8.0, 0.01% DDM, 20% Glycerin, 0.1mM PMSF bei 15°C gemessen.

Ist das Fluorescein an den Transporter gebunden, dann ist deutlich ein veränderter Anisotropiezerfall mit mehreren Zerfallskomponenten zu erkennen (Abbildung 6.3). In einer ersten Reihe von Experimenten wurde der Anisotropiezerfall der drei mit Fluorescein markierten Mutanten MalF(T177C-AF)GK₂, MalFG(P78C-AF)K₂ und MalFG(Q256C-AF)K₂ im Grundzustand des Transportzyklus, d. h. nur in Anwesenheit von MalFGK₂ und ohne ATP und MalE gemessen (Abbildung 6.3). Deutlich ist bei allen drei Kurven der langsamere Zerfall der Anisotropie im Vergleich zum freien Fluorescein (Abbildung 6.2) zu sehen. Dieser besteht im Fall des gebundenen Fluoresceins aus drei Hauptzerfallskomponenten, den Rotationskorrelationszeiten ϕ_1 bis ϕ_3 . Diese besitzen die relativen Amplituden β_1 bis β_3 ($\sum_i \beta_i = 1$), wie in Tabelle 6.1 dargestellt. Die absoluten Amplituden r_i berechnen sich hierbei mit $r_i = r_0 \cdot \beta_i$. Die Güte des Fits und die Anzahl der Zerfallskomponenten wurde aus den χ^2 -Werten und den Residuen des Fits ermittelt. Die schnellste Zerfallskomponente der Anisotropie mit der Rotationskorrelationszeit ϕ_1 im Bereich von 0.2-0.4 ns gibt die Eigenbewegung des gebundenen Fluorophors wieder. Die mittlere Zerfallskomponente der Anisotropie mit einer Rotationskorrelationszeit ϕ_2 liegt im einstelligen Nanosekundenbereich und entspricht der Bewegung des flexiblen Protein-

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

segments, an dem der Farbstoff gebunden ist (Alexiev et al., 2003; Schröder et al., 2005). Die drei Anisotropiezerfallskurven in Abbildung 6.3 A-C unterscheiden sich bezüglich ϕ_3 . Für kleinere Moleküle, wie freies Fluorescein oder kleinere Proteine mit einem Molekulargewicht bis ca. 30 kDa kann die Gesamtrotationskorrelationszeit des Moleküls für den gegebenen Fluorophore (hier Fluorescein) noch aufgelöst werden. Für größere Moleküle, z. B. Molekülkomplexe oder Membranfragmente erhält man eine Endanisotropie, da die Rotationsdiffusion nicht mehr im Beobachtungsfenster der Fluoreszenz liegt. Für das Makromolekül MalFGK₂ mit ca. 200 kDa ist eine Rotationskorrelationszeit im dreistelligen ns-Bereich im solubiliserten Zustand zu erwarten. Eine vollständige Depolarisation wird somit außerhalb des Messbereichs stattfinden, welcher durch die Fluoreszenzlebensdauer des verwendeten Farbstoffs begrenzt ist. Dahingegen ist bei einem vollständig flexiblen Proteinsegment eine Depolarisation innerhalb des Messfensters möglich. Es ist eine Rotationskorrelationszeit für einen der periplasmatischen Loops von MalFGK₂, abhängig von der Größe, im einstelligen oder zweistelligen Nanosekundenbereich zu erwarten.

In Abbildung 6.3 A ist der Anisotropiezerfall der Probe MalF(T177C-AF)GK₂ mit den Residuen des Fits von I_{\parallel} und I_{\perp} dargestellt. Die drei farbigen Abschnitte blau, rot und schwarz der Anisotropiekurve stehen für die drei Hauptzerfallskomponenten mit den jeweiligen Rotationskorrelationszeiten ϕ_i . Die langsamste Zerfallskomponente mit einer Zeitkonstante liegt bei 21 ns.

	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ_r^2
Fluorescein	0.39	0.21	1.0	-	-	-	-	-	4.1	1.0
MalF-T177C-AF	0.35	0.26	0.20	2.2	0.31	21	0.49	1.4	4.1	1.2
MalG-P78C-AF	0.36	0.34	0.17	3.1	0.21	∞	0.62	0.99	4.0	1.2
MalG-Q256C-AF	0.35	0.40	0.28	5.2	0.48	∞	0.24	1.4	4.2	0.9

Tabelle 6.1.: **Fitparameter der in Abbildung 6.2 und in Abbildung 6.3 gezeigten Anisotropiezerfallskurven** mit den Rotationskorrelationszeiten ϕ_i , β_i den zugehörigen relativen Amplituden β_i ($\sum_i \beta_i = 1$), den Fluoreszenzzerfallszeiten τ_i und der Fitgüte χ_r^2 .

Diese Rotationskorrelationszeit kann nicht die Rotationsdiffusion für den gesamten Transporterkomplex beschreiben, welcher mit einem Molekulargewicht von 200 kDa und zusätzlichen Detergenzmolekülen eine Rotationskorrelationszeit von ca. 100 ns bei 15°C erwarten lässt. Diese langsame Rotationskorrelationszeit liegt außerhalb der Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophores (~ 4 ns), und es ist somit nur mit einem Zerfall zu einem konstanten Endwert der Anisotropie zu rechnen. Wenn sich der P2-Loop von MalF frei bewegen kann und diese Bewegung von dem restlichen Membranteil des Transporters entkoppelt ist, dann ist eine Rotationskorrelationszeit von ca. 20 ns für den kompakten P2-Loop mit 180 Aminosäuren zu erwarten. Damit beschreibt die langsamste Rotationskorrelationszeit die Dynamik des gesamten P2-Loops und die mittlere Rotationskorre-

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

tionszeit von 2.2 ns die Bewegung eines flexiblen Segments innerhalb des strukturierten P2-Loops. Position 177 befindet sich in der Mitte einer helikalen Region, die von den Aminosäuren 170-185 gebildet wird (Abbildung 6.1). Es ist anzunehmen, dass die mittlere Anisotropiezerfallskomponente ϕ_2 hier die Bewegung dieser kurzen Helix innerhalb des P2-Loops beschreibt.

Abbildung 6.3 B und C zeigen den Anisotropiezerfall der Proben MalFG(P78C-AF)K₂ und MalFG(Q256C-AF)K₂ mit den jeweiligen Residuen des Fits von I_{\parallel} und I_{\perp} . Auch hier wurden die Zerfallskomponenten farbig dargestellt (blau ϕ_1 , rot ϕ_2 , schwarz ϕ_3). Insbesondere für Position 78 im P1-Loop von MalG (Abbildung 6.3 B) ist deutlich der Zerfall der Anisotropie in eine Endanisotropie r_{∞} deutlich zu erkennen. Ebenfalls konnte der Anisotropiezerfall für die Fluoreszenzreportergruppe in Position 256 im P3-Loop von MalG mit zwei Zerfallskomponenten und einer Endanisotropie gefittet werden. Die sterische Einschränkung der Bewegung des Loops, für die r_{∞} ein Maß ist, ist deutlich höher für den MalG P1-Loop als für den MalG P3-Loop (Tabelle 6.1).

MalFG(P78C-AF)K₂ (Abbildung 6.3 B) besitzt eine Rotationskorrelationszeit ϕ_2 von 3.1 ns. Bei MalFG(Q256C-AF)K₂ (Abbildung 6.3 C) weist ϕ_2 einen Wert von 4.7 ns auf. Beide ϕ_2 Werte liegen im Bereich von 1-5 ns und haben damit typische Rotationskorrelationszeiten für relativ kurze Loopstrukturen (Alexiev et al., 2003; Schröder et al., 2005).

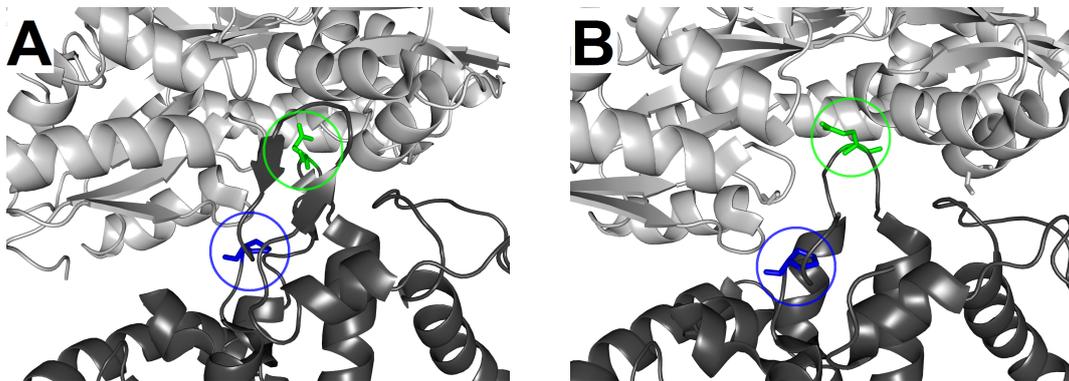


Abbildung 6.4.: **Ausschnitt der Tertiärstruktur von MalG und MalE im pre- und katalytischen Transportzustand.** **A:** Prekatalytischer Zustand von MalG (dunkelgrau) und MalE (hellgrau). Markiert sind die Positionen P78 (blau) und Q256 (grün). Die Abbildung wurde auf Grundlage der Kristallstruktur von Oldham and Chen (2011) (PDB: 3PV0) angefertigt. **B:** Katalytischer Zustand von MalG (dunkelgrau) und MalE (hellgrau). Markiert sind die Positionen P78 (blau) und Q256 (grün). Die Abbildung wurde auf Grundlage der Kristallstruktur von Oldham et al. (2007) (PDB: 2R6G) angefertigt.

Da der MalG P1-Loop mit ca. 60 Aminosäuren länger als der P3-Loop mit 40 Aminosäuren ist, kann man vermuten, dass der Fluoreszenzmarker in Position 78 (P1-Loop MalG) nicht die Bewegung des gesamten Loops detektiert, sondern ein kleineres flexibles

Segment innerhalb des P1-Loops. In der Tat befindet sich P78 innerhalb eines kurzen unstrukturierten Abschnitts (Aminosäuren 62-80), der zwischen zwei flankierenden Helices liegt (Abbildung 6.4). Q256 befindet sich im P3-Loop von MalG dem sogenannten „*Scoop Loop*“, welcher die offene gebundene MalE Konformation während des Maltose Transports über die Membran stabilisiert (Abbildung 6.4). Der Konformationsraum des P3-Loops von MalG ist im Gegensatz zum P1-Loop wesentlich höher, wie in Abbildung 6.3 C anhand der großen Amplitude der mittleren Anisotropiezerfallskomponente zu sehen ist. Alle Fitparameter für Abbildung 6.2 und Abbildung 6.3 sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

6.1.2. Dynamik des P2-Loops (MalF) im Grundzustand des Transportzyklus

Im Gegensatz zum P1- und P3-Loop von MalG konnte für den P2-Loop von MalF keine Endanisotropie detektiert werden und die langsamste Korrelationszeit mit 22.2 ± 1.23 ns (Mittelwert von vier Experimenten, Standardabweichung ist gegeben) bestimmt (Abbildung 6.3 A). Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, kann diese nicht für die Rotationsdiffusion des gesamten Moleküls MalFGK₂ stehen. Da dieses Experiment bei 15°C durchgeführt wurde, sollten Messungen bei anderen Temperaturen diesen Befund bestätigen. Hierzu wurde zweimal eine Temperaturmessreihe mit MalF(T177C-AF)GK₂ durchgeführt. Diese erfolgten mit einer Anfangstemperatur von 0°C und einer sukzessiven Temperaturerhöhung um 5°C bis zu einem Endwert von 35°C. In der Annahme einer kugelförmigen Gestalt konnte mit Hilfe des in Abbildung 6.5 verwendeten Perrinplots und der dazugehörigen Formel

$$\phi = \eta V / k_B T \quad (6.1)$$

das Volumen mit 47 ± 2.2 nm³ und der Durchmesser von etwa 4.5 ± 0.22 nm bestimmt werden. Dabei ist ϕ die Rotationskorrelationszeit, η die Viskosität, V das Volumen, k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur. Die gewonnenen Daten sind in Übereinstimmung mit dem Durchschnittswert der Größe des P2-Loops von MalF mit 4.5 nm. Daraus lässt sich folgern, dass der P2-Loop frei rotiert und in seiner Bewegung entkoppelt vom Transmembranteil des Transporters im Grundzustand ist.

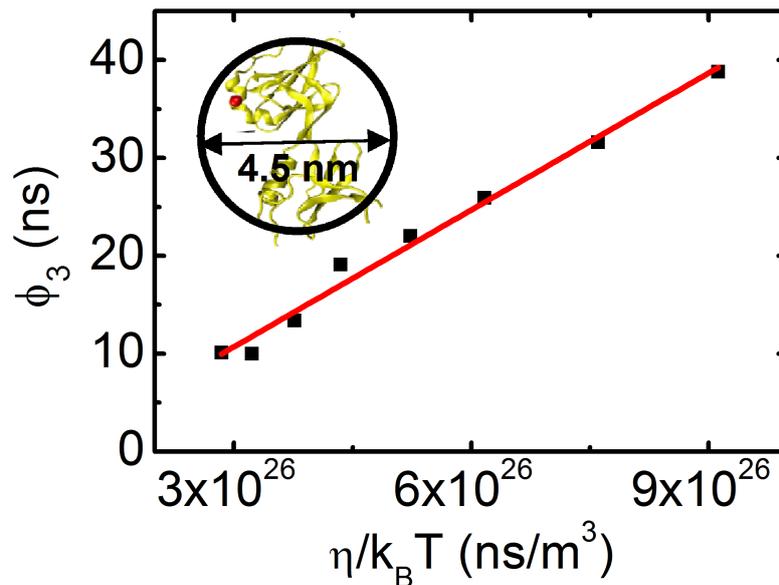


Abbildung 6.5.: **Perrinplot von MalF(T177C-AF)GK₂ im Grundzustand.** Bei unterschiedlichen Temperaturen wurde die Rotationskorrelationszeit ϕ_3 aufgenommen und mit einer Geraden angefitet. Mit Hilfe der Perringleichung $\phi = \eta V/k_B T$ lässt sich aus der Steigung das Volumen in Kugelgestalt und daraus der Durchmesser mit 4.5 nm des P2-Loops bestimmen. Zum Vergleich ist die Kristallstruktur vom P2-Loop (Gelb) mit der Position 177 (rot) abgebildet, welche auf Grundlage der Kristallstruktur von Oldham et al. (2007) (PDB: 2R6G) angefertigt wurde.

6.1.3. Dynamik des P2-Loops von MalF unter Transportbedingungen

6.1.3.1. Bindung von MalE/Dynamik des MalF-P2-Loops im MalE-gebundenen Zustand

Das dynamische Verhalten des P2-Loops verändert sich, wenn ATP und maltosebeladenes MalE hinzugegeben werden (Abbildung 6.6). Der Anisotropiezerfall zu einem Endwert zeigt an, dass eine Immobilisierung des P2-Loops durch eine Kopplung des membranintegralen Teils des Transporters stattgefunden hat. Diese Beobachtung ist im Einklang mit dem Kristallstrukturmodell von MalFGK₂E (Oldham et al., 2007), welches eine Interaktion des P2-Loops mit MalE gebunden zur periplasmatischen Oberfläche des Transporters zeigt (Abbildung Kristallstruktur des gesamten Transporters). Außerdem ändert sich die Rotationskorrelationszeit des helikalen Segments 170-185 mit dem P2-Loop von 2.01 ± 0.28 ns im Grundzustand zu 4.58 ± 0.47 ns im MalE-gebundenen Zustand (Mittelwert von 5 Experimenten, Standardabweichung ist gegeben). Die hängt von der Größe und der Form des Segments und von der Viskosität des Lösemittels ab. Die langsamere Diffusion des Segments im MalE-MalFGK₂-Zustand deutet auf eine Erhöhung der Größe,

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

eine Formveränderung und/oder eine Erhöhung der Umgebungsviskosität hin.

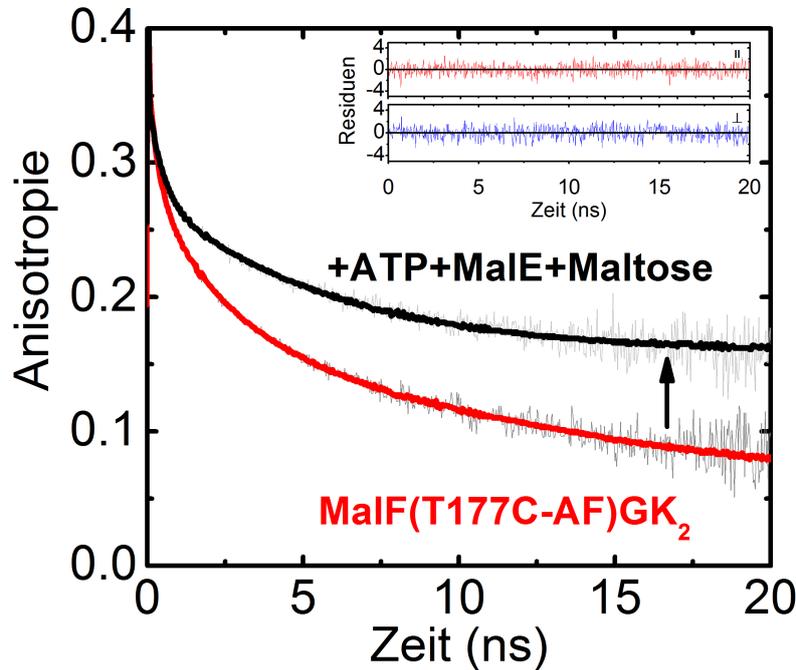


Abbildung 6.6.: **Änderung Anisotropiezerfallskurve von MalF(T177C-AF)GK₂ durch Bindung von MalE.** Die Anisotropie von MalF(T177C-AF)GK₂ im Grundzustand (rot) und in Anwesenheit von ATP, MalE und Maltose (schwarz, Residuen im Inset) im Vergleich. Die Bindung von MalE kann durch die Erhöhung der sterischen Einschränkung und Rotationskorrelationszeit detektiert werden (schwarzer Pfeil). Beide Proben wurden in 50 mM Tris, pH8, 0.01% DDM, 20% Glycerin, 0.1 mM PMSF bei 15°C gemessen.

Das dynamische Verhalten des P2-Loops während des Transportprozesses wurde dann systematisch erforscht, um ein mechanistisches Verständnis für die Bindung des MalE an den Transporter zu erhalten. Dafür wurde zunächst die P2-Loop-Immobilisierung im Fall der Bindung des maltosefreien MalE (offene Konformation von MalE) an die periplasmatische Oberfläche untersucht. Das Experiment, dessen Ergebnisse in Abbildung 6.7 A gezeigt werden, wurde mit MalE im Überschuss durchgeführt. Diese Abbildung zeigt den Anstieg der P2-Immobilisierung über den Anstieg in r_{∞} in Abhängigkeit von der Stöchiometrie zwischen Transporter und MalE. Ein Anstieg von r_{∞} mit einer Erhöhung der MalE-Konzentration ist zu erwarten, wenn maltosefreies MalE an den Transporter bindet. Dies wurde in der Tat beobachtet. Die Resultate zeigen klar, dass MalE in der offenen Konformation an den Transporter binden kann und eine Immobilisierung des MalF-P2-Loops bewirkt. Dies ist nicht der Fall, wenn maltosebeladenes MalE (geschlossene Konformation von MalE) in dem Experiment verwendet wird. Sogar bei einem zehnfachen Überschuss von maltosebeladenem Bindeprotein wurde keine P2-Loop-Immobilisierung

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

detektiert. Die Beobachtungen implizieren eine unterschiedliche Interaktion von maltosegeladenem und maltosefreiem MalE mit der periplasmatischen Seite des Transporters in Abwesenheit von ATP.

In einem nächsten Schritt wurde der Effekt von ATP-Bindung an das MalK-Dimer auf der zytoplasmatischen Seite des Transporters auf die P2-Loop-Immobilisierung untersucht. Zugabe von ATP erhöht die Affinität von maltosefreiem MalE zum Transporter, welche durch eine partielle Immobilisierung des P2-Loops sichtbar wird (Abbildung 6.7 C; Stöchiometrie MalFGK₂: MalE= 1:2 grüne Kurve und MalFGK₂: MalE= 1:0.2 blaue Kurve). Des Weiteren erhöht die Zugabe von Maltose die Immobilisierung des P2-Loops (türkise Kurve), wie der Vergleich zwischen maltosefreiem MalE mit und ohne ATP und maltosegebundenem MalE in Gegenwart von ATP bei einem Verhältnis von MalFGK₂: MalE= 1:0.2 zeigt. Somit führt die Bindung von ATP an den MalK-Dimer auf der gegenüberliegenden Membranseite des Transporters zu einer langreichweitigen Konformationsänderung im Transporter, welche die Affinität auf der periplasmatischen Seite zur maltosebeladenen und maltosefreien MalE-Form erhöht. Der Überschuss von MalE in der Anwesenheit von ATP führt zu dem höchsten Wert der P2-Immobilisierung (6.7 A, 6.7D). Die Dynamik des kurzen helikalen Segments (Position 170-185), welches sich im P2-Loop befindet, ist in der Gegenwart von ATP und maltosefreier MalE-Form durch eine Rotationskorrelationszeit von 4.1 ns charakterisiert. Diese Zeit ist ähnlich dem Wert von 4.6 ns, welcher unter den Bedingungen mit ATP und maltosebeladener MalE-Anwesenheit gemessen wurde (Tabelle 8.2).

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

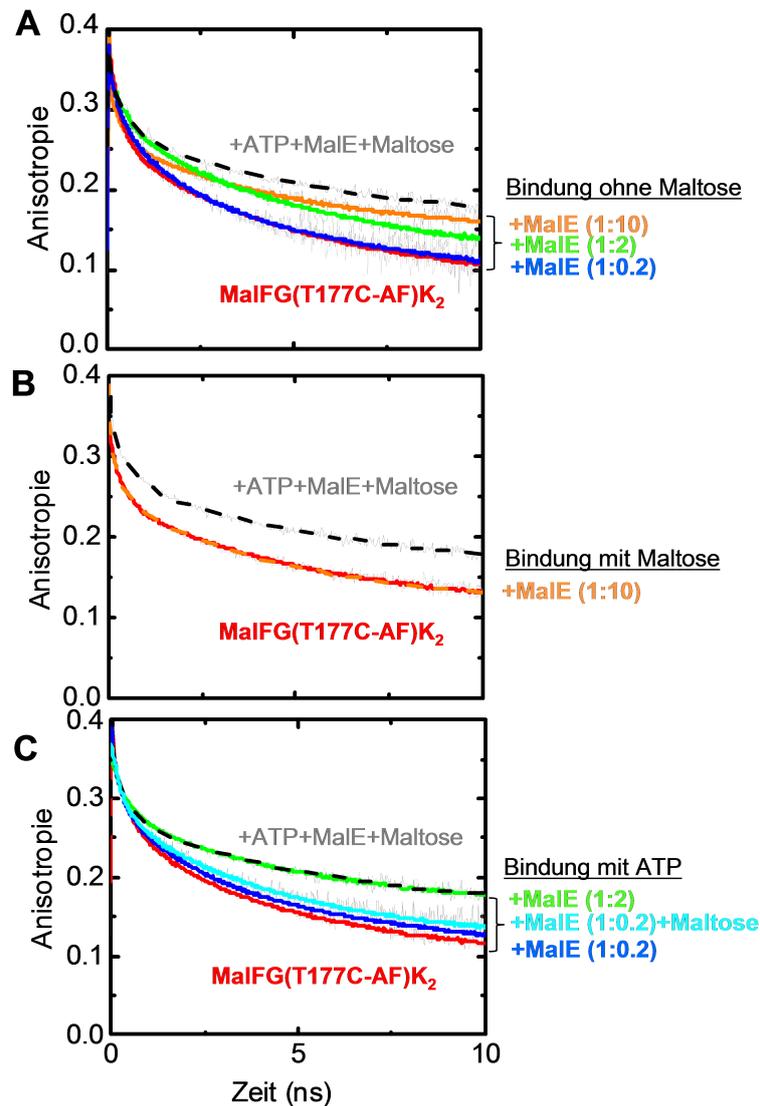


Abbildung 6.7.: Einfluss von Maltose und ATP auf die Bindung von MalE an MalF(T177C-AF)GK₂. **A**: Bindung von MalE in verschiedenen Verhältnissen zum Komplex (orange 1:10, grün 1:2, blau 1:0.2) ohne Maltose. MalF(T177C-AF)GK₂ im Grundzustand (rot) in Anwesenheit von ATP, MalE und Maltose (schwarz gestrichelt) zum Vergleich abgebildet. **B**: Nicht vorhandene Bindung von MalE (orange, MalE zu Komplex Verhältnis 1:10) mit Maltose. MalF(T177C-AF)GK₂ im Grundzustand (rot) in Anwesenheit von ATP, MalE und Maltose (schwarz gestrichelt) zum Vergleich abgebildet. **C**: Bindung von MalE in verschiedenen Verhältnissen zum Komplex (grün gestrichelt 1:2, hellblau 1:0.2 mit Maltose, dunkelblau 1:0.2 ohne Maltose) in Anwesenheit von ATP. MalF(T177C-AF)GK₂ im Grundzustand (rot) in Anwesenheit von ATP, MalE und Maltose (schwarz gestrichelt) zum Vergleich abgebildet. Alle Proben wurden in 50 mM Tris, pH8, 0.01% DDM, 20% Glycerin, 0.1mM PMSF bei 15°C gemessen.

6.1.3.2. MalF-P2-Loopdynamik bei der ATP-Hydrolyse

Die Zugabe von MgCl_2 initiiert die ATP-Hydrolyse und dadurch den Maltosetransport über die Membran. Die P2-Loop-Immobilisierung wird durch die ATP-Hydrolyse wieder herabgesetzt (Abbildung 6.8 A, 6.8 B). Dies ist in Übereinstimmung mit der Vorstellung, dass Maltose an den Transporter bindet und ATP-Hydrolyse die Energie für die Konformationsänderung liefert, welche benötigt wird, um der Translokationspore den Zugang zum Cytoplasma zu ermöglichen. Die in Abbildung 6.8 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in diesem Zustand die P2-Bewegung von dem transmembralen Teil des Transporters wieder nahezu entkoppelt ist. Während geringere Konzentrationen von MgCl_2 nur zu einer partiellen Mobilisierung des P2-Loops führen, resultiert ein hoher Überschuss von MgCl_2 in eine vollständige Depolarisation des Anisotropiesignals (Abbildung 6.8 B). Dies ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, dass - solange ATP anwesend ist - MalE in der maltosefreien oder -beladenen Form durch Bindung eine P2-Immobilisierung induziert. Nur wenn der gesamte „Vorrat“ an ATP hydrolysiert ist, kann der P2-Loop sich wieder frei bewegen und MalE dissoziiert wahrscheinlich vom Transporter. Dieses Ergebnis ist zu vergleichen mit Experimenten, bei denen die P2-Loop-Bewegung in Anwesenheit von ATP (Abbildung 6.8 C) und in der Anwesenheit von $\text{ATP} + \text{MgCl}_2$ (Abbildung 6.8 D) beobachtet wurde. Eine ATP-Bindung zum MalK-Dimer induziert keine P2-Loop-Immobilisierung, ändert aber dafür geringfügig die Dynamik des kurzen helikalen Segments, an dem der Farbstoff kovalent gebunden ist (Abbildung 6.8 C). Diese geringfügige Änderung in der Dynamik des kurzen helikalen Segments von 2.24 ± 0.24 ns im Grundzustand zu 3.10 ± 0.10 ns im ATP gebundenen Zustand deutet auf eine langreichweitige induzierte Änderung in der intramolekularen Dynamik des P2-Loops durch ATP-Bindung an der gegenüberliegenden Membranseite hin.

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

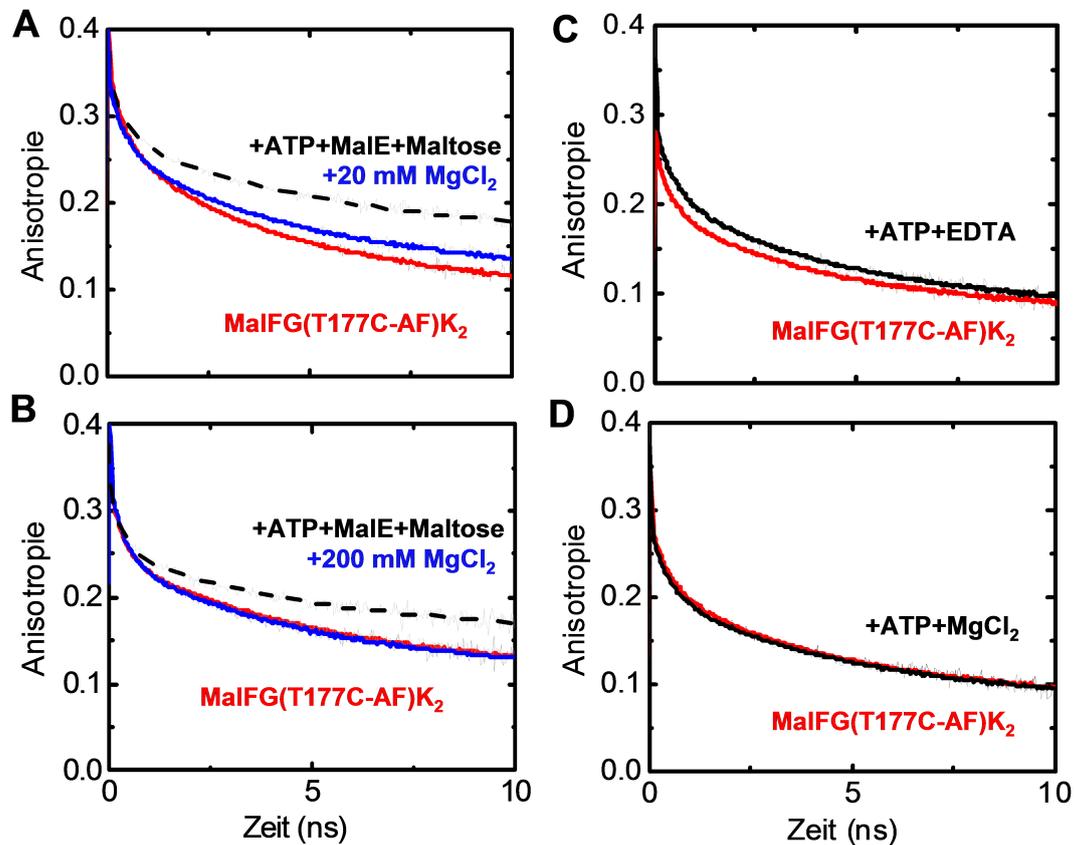


Abbildung 6.8.: Einfluss der MgCl_2 -Konzentration auf die ATP-Hydrolyse durch $\text{MalF(T177C-AF)GK}_2$. **A:** Teilweise Mobilisierung vom P2-Loop von MalE durch Zugabe von MgCl_2 equimolar (blau). $\text{MalF(T177C-AF)GK}_2$ im Grundzustand (rot) in Anwesenheit von ATP, MalE und Maltose (schwarz gestrichelt) zum Vergleich abgebildet. **B:** Vollständige Mobilisierung vom P2-Loop durch Zugabe von MgCl_2 im Überschuss (blau). $\text{MalF(T177C-AF)GK}_2$ im Grundzustand (rot) in Anwesenheit von ATP, MalE und Maltose (schwarz gestrichelt) zum Vergleich abgebildet. **C:** $\text{MalF(T177C-AF)GK}_2$ im Grundzustand (rot) und in Anwesenheit von ATP und EDTA (schwarz) im Vergleich. **D:** $\text{MalF(T177C-AF)GK}_2$ im Grundzustand (rot) und in Anwesenheit von ATP und MgCl_2 (schwarz) im Vergleich. Alle Proben wurden in 50 mM Tris, pH8, 0.01% DDM, 20% Glycerin, 0.1 mM PMSF bei 15°C gemessen.

6.1.4. Dynamik des P1-Loops (MalG) unter Transportbedingungen

Beim P1-Loop von MalG handelt es sich um den größten Loop von MalG, der ins Periplasma hineinreicht (Abbildung 6.1). Zur Markierung mit der Fluoreszenzreportergruppe wurde die Position 78 ausgewählt, welche sich in einem unstrukturierten Abschnitt befindet (Abbildung 6.1). Es wurden wie beim P2-Loop von MalF die Änderungen in der Dynamik des fluoreszenzmarkierten P1-Loops von MalG während des gesamten Transportzyklus untersucht, das heißt in Anwesenheit von MalE, ATP und Maltose. Hierbei zeigte sich, dass dieser Loop in seiner Bewegung im Grundzustand, d. h. ohne ATP, MalE und Maltose, einer hohen sterischen Einschränkung unterliegt. Wie in Abbildung 6.9 erkennbar, gibt es nur eine geringfügige Änderung durch die Zugabe von ATP, MalE und Maltose. Die Endanisotropie r_{∞} steigt von 0.22 auf 0.24 und die Rotationskorrelationszeit des flexiblen Segments ändert sich von 3.1 ns nach 3.0 ns. Durch Zugabe von 20 mM $MgCl_2$ welches die ATP-Hydrolyse startet, konnte wie für den P2-Loop von MalF eine Reversibilität in der Loopyndynamikänderung beobachtet werden. Die Endanisotropie sinkt auf 0.22 und die Rotationskorrelationszeit des flexiblen Segments ändert sich zu 3.6 ns.

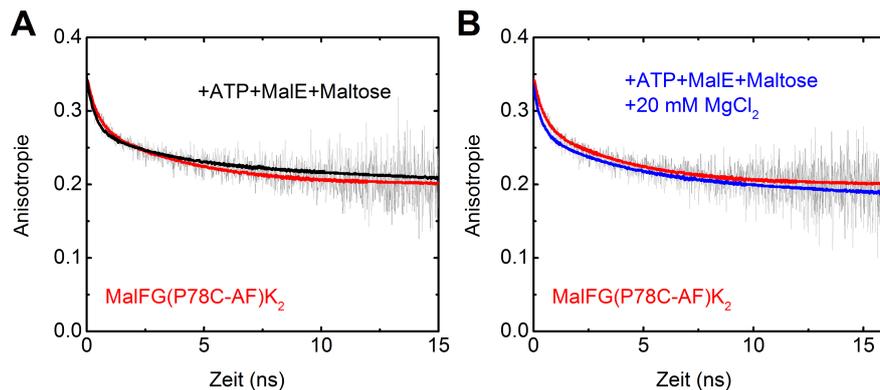


Abbildung 6.9.: **Anisotropiezerfallskurve von MalFG(P78C-AF)K₂ in den verschiedenen Transportzuständen.** **A:** Die Anisotropie von MalFG(P78C-AF)K₂ im Grundzustand (rot) und in Anwesenheit von ATP, MalE und Maltose (schwarz) im Vergleich zeigen nur einen geringen Unterschied. Dies beruht auf der hohen sterischen Einschränkung des P1-Loops von MalG. **B:** Die Anisotropie von MalFG(P78C-AF)K₂ im Grundzustand (rot) und in Anwesenheit von ATP, MalE, Maltose und $MgCl_2$ equimolar (blau). Alle Proben wurden in 50 mM Tris, pH8, 0.01% DDM, 20% Glycerin, 0.1 mM PMSF bei 15°C gemessen.

6.1.5. Dynamik des P3-Loops der MalG Untereinheit unter Transportbedingungen

Der P3-Loop (*scoop loop*) von MalG besitzt im Grundzustand eine höhere Beweglichkeit als der P1-Loop von MalG wie im Abschnitt 6.1.1 gezeigt wurde. Ein Effekt der

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

Interaktion vom P3-Loop mit MalE kann über die Rotationskorrelationszeit ϕ_2 und die Endanisotropie beobachtet werden. Durch die Zugabe von ATP, MalE findet eine Bindung von maltosefreiem MalE an den Komplex statt und eine Veränderung der Anisotropiezerfallskurve, d. h. ein Änderung der Rotationskorrelationszeit ϕ_2 von 4.7 ns auf 5.7 ns und ein Anstieg der Endanisotropie von 0.08 auf 0.11 (grüner Pfeil, Abbildung 6.10 A). Dieser Effekt ist bei maltosebeladenen MalE noch stärker. Es findet ein weiterer Anstieg der Rotationskorrelationszeit ϕ_2 auf 6.0 ns und zusätzlich ein Anstieg der Endanisotropie von 0.11 auf 0.12 statt (schwarzer Pfeil, Abbildung 6.10 A). Damit wird die Dynamik des P3-Loops durch die Bindung von MalE langsamer und in Abhängigkeit von der Maltose-Beladung des MalEs wird die sterische Einschränkung der Bewegung des P3-Loops moduliert.

Durch die Zugabe von MgCl_2 wird die ATP-Hydrolyse und damit der Transportvorgang eingeleitet. Wie auch beim P2-Loop von MalF wird die vorangegangene Änderung der Dynamik des P3-Loops durch die Bindung des MalE durch die ATP-Hydrolyse wieder teilweise umgekehrt (blauer Pfeil, Abbildung 6.10 B). Dies wird erkennbar durch die Veränderung der Rotationskorrelationszeit ϕ_2 von 6.0 ns im gebundenen Zustand zu 5.6 ns im Post-Hydrolyse-Zustand und einer Verringerung der sterischen Einschränkung der Bewegung des Loops, welche sich in einem niedrigeren Endanisotropiewert von 0.1 manifestiert.

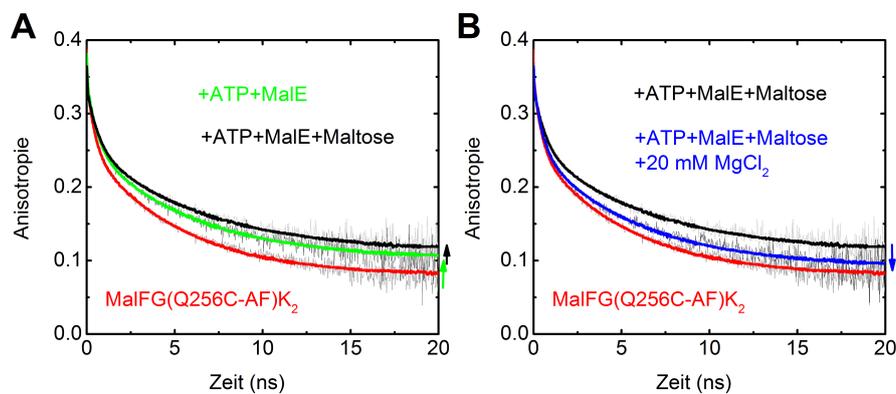


Abbildung 6.10.: **Änderung der Anisotropiezerfallskurve von MalFG(Q256C-AF)K₂ durch Bindung und Abkopplung von MalE.** **A:** Die Anisotropie von MalFG(Q256C-AF)K₂ im Grundzustand (rot) und in Anwesenheit von ATP, MalE (grün) und Maltose (schwarz) im Vergleich. Die Bindung von MalE kann durch die Erhöhung der sterischen Einschränkung und Rotationskorrelationszeit detektiert werden (grüner/schwarzer Pfeil). **B:** Teilweise Loslösung von MalE durch Zugabe von MgCl_2 equimolar (blau). MalFG(Q256C-AF)K₂ im Grundzustand (rot) in Anwesenheit von ATP, MalE und Maltose (schwarz) zum Vergleich abgebildet. Alle Proben wurden in 50 mM Tris, pH8, 0.01% DDM, 20% Glycerin, 0.1 mM PMSF bei 15°C gemessen.

6.2. Messungen am Maltose-Bindeprotein MalE

In einem zweiten Satz von Experimenten wurden die fluoreszenzmarkierten MalE-Varianten zur Beobachtung von Konformationsänderungen bei der Interaktion mit der periplasmatischen Seite des Transporterkomplexes verwendet. Gewählt wurden die Positionen 13 und 31 im N-terminalen Teil von MalE (N-Domäne) und Position 211 im C-terminalen Teil von MalE (C-Domäne) als Label-Stelle für die Fluoreszenzreporter (Abbildung 6.11). Die Aminosäuren G13 und E211 befinden sich in der Nähe der Maltose-Bindungsstelle. Diese Region sollte ihre Konformation und Dynamik bei der Bindung an den Transporter und bei Abgabe des Substrats ändern. Das Labeling der Einzel-Cysteinemutanten MalE(G13C), MalE(T31) und MalE(E211) mit dem Fluoreszenzfarbstoff IAF beeinflusst nicht die Transportaktivität des Komplexes, wie mit ATPase-Aktivitätstests gezeigt wurde (siehe Kapitel 5.5).

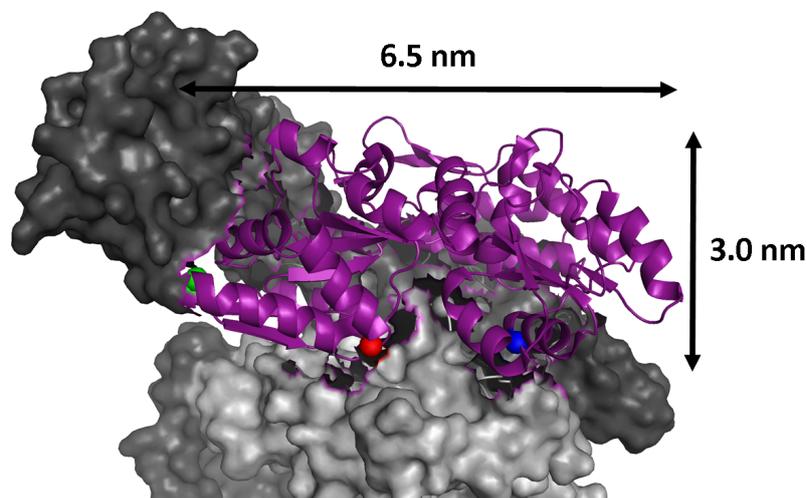


Abbildung 6.11.: **Strukturmodell von MalE gebunden an MalFG mit den ausgewählten Labelpositionen.** Markiert sind die Positionen G13 (rot), T31 (grün), welche sich im N-terminalen Bereich befinden, und E211 (blau) im C-terminalen Bereich von MalE (violett). MalE bindet an die periplasmatische Oberfläche des Komplexes. Die Oberflächenstruktur von MalF (dunkelgrau) und MalG (hellgrau) ist mit abgebildet. Die Abbildung wurde auf Grundlage der Kristallstruktur von Oldham et al. (2007) (PDB: 2R6G) angefertigt.

Da MalE mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa kleiner ist als der Transporterkomplex MalFGK₂, ist die Rotationskorrelationszeit des MalE im Fluoreszenz-Lebenszeitfenster detektierbar. Die temperaturabhängigen Anisotropiekurven von MalE (G13C-AF) werden in Abbildung 6.12 A gezeigt. Die langsamste Anisotropie-Zerfallszeit beschreibt die Rotationsdiffusion von MalE und ist als Funktion von Temperatur und Viskosität als Inset in Abbildung 6.12 A dargestellt. Aus der Steigung des Perrinplots (Inset Abbildung 6.12 A) lässt sich ein Durchmesser für MalE von 5.0 ± 0.2 nm mit Hilfe

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

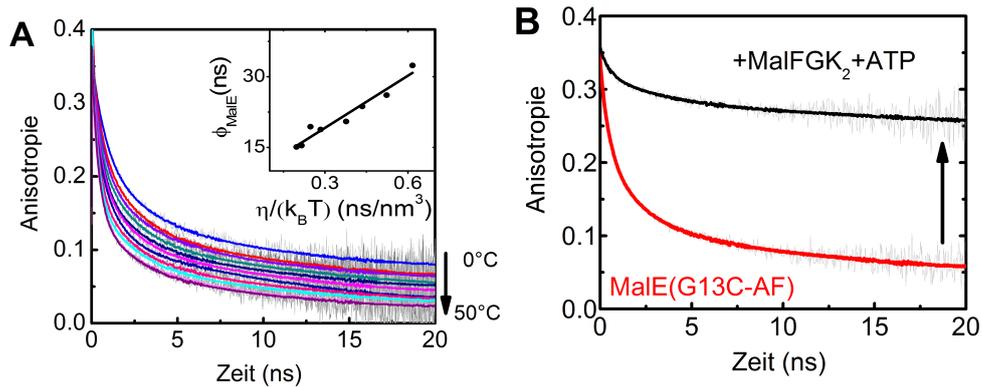


Abbildung 6.12.: **MalE G13C-AF im Grundzustand mit Perrinplot und im an MalFGK₂ gebundenen Zustand.** **A:** Bei unterschiedlichen Temperaturen wurde die Rotationskorrelationszeit ϕ_3 aufgenommen und mit einer Geraden angefitzt. Mit Hilfe der Perringleichung $\phi = \eta V/k_B T$ lässt sich aus der Steigung das Volumen in Kugelgestalt und daraus der Durchmesser mit 5.0 nm von MalE bestimmen. **B:** Die Anisotropie von MalE(13AF) im Grundzustand (rot) und in Anwesenheit von ATP, MalE und Maltose (schwarz) im Vergleich. Die Bindung von MalE kann durch die Erhöhung der sterischen Einschränkung und Rotationskorrelationszeit detektiert werden (schwarzer Pfeil). Messbedingungen: 50 mM Tris, pH 8.0, 0.01 % DDM, 20 % Glycerin, 0.1 mM PMSF, T=15°C.

der Gleichung 6.1 berechnen. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der durchschnittlichen Größe von MalE (Abbildung 6.11).

Die Analyse der Anisotropiezerfallskurve von MalE zeigt drei Hauptzerfallkomponenten, wie bei den Loops des Transporters (ϕ_1 für das Label, ϕ_2 für das Segment und ϕ_3 für MalE). Die Mobilität des Segments, an das der Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist, führt nicht zur vollständigen Depolarisation. Die Bindung des kleinen MalE zum großen Transporterkomplex ist damit in der Anisotropiezerfallskurve anhand des konstanten Endwerts der Anisotropie detektierbar, der sich nach Bindung in der Anisotropiezerfallskurve manifestieren sollte. Sofern der Transporterkomplex MalGFK₂ und ATP anwesend sind, wie in Abbildung 6.12 B (schwarze Kurve) gezeigt, zerfällt die Anisotropiekurve in der Tat zu einem konstanten Endwert, was andeutet, dass MalE an den Transporter gebunden ist.

Zur Untersuchung der Bindung und Dynamik von MalE während des Transportvorgangs wurden die zwei fluoreszenzmarkierten MalE-Konstrukte, MalE(G13C-AF) und MalE(E211C-AF) in Abhängigkeit von der Anwesenheit des Transporterkomplexes, ATP und Maltose betrachtet. Um die Bindung von MalE an den Transporterkomplex zu analysieren, wurden in folgender Reihenfolge die Depolarisationsexperimente durchgeführt. Die erste Messung erfolgte immer mit MalE ohne weitere Komponenten. Im zweiten Schritt wurde der Transportkomplex MalFGK₂ der Probe hinzugegeben. Die weiteren Schritte folgten mit der Zugabe von ATP und Maltose. Zwischen den Zugaben wurde ei-

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

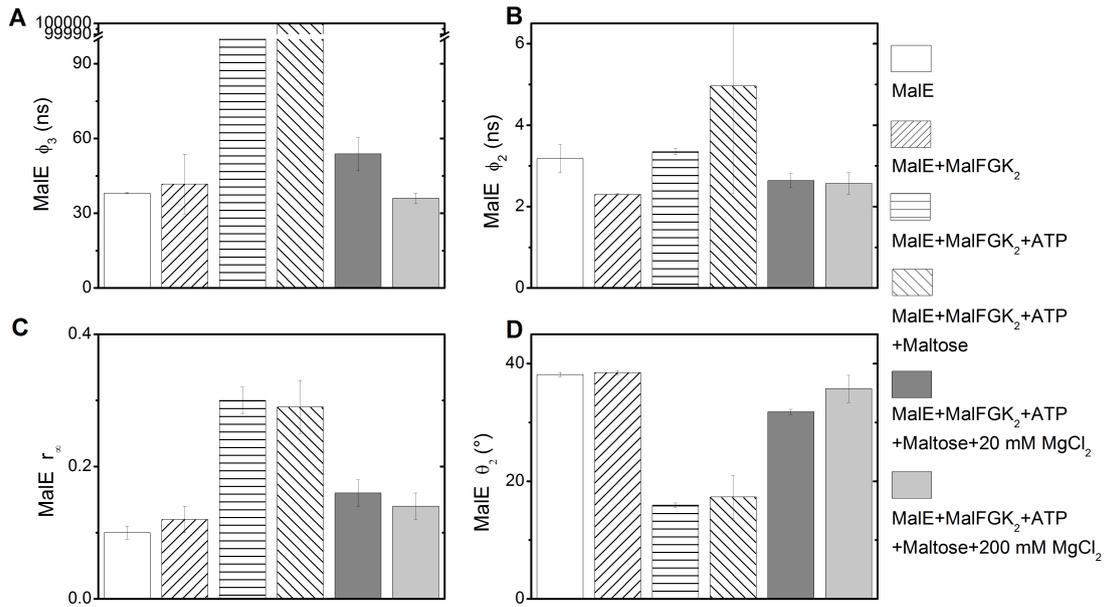


Abbildung 6.13.: **Balkendiagramme mit den Ergebnissen aus den Fluoreszenzanisotropie-Experimenten mit Male(13C-AF).** **A:** Rotationskorrelationszeiten ϕ_3 in Abhängigkeit der Umgebung durch Schrittweise Zugabe der einzelnen Komponenten. **B:** Rotationskorrelationszeiten ϕ_2 in Abhängigkeit der Umgebung. **C:** Sterische Einschränkung r_∞ in Abhängigkeit der Umgebung. **D:** Halbkegelöffnungswinkel θ_2 nach dem *cone in a cone* Model in Abhängigkeit der Umgebung. Messbedingungen: 50 mM Tris, pH 8.0, 0.01 % DDM, 20 % Glycerin, 0.1 mM PMSF, T=15°C.

ne Depolarisationsmessung durchgeführt. Das Male wurde dabei in einem Verhältnis von 1:20 zu MalFGK₂ eingesetzt. Abbildungen 6.13 und 6.14 zeigen die Analyse der verschiedenen Fluoreszenz-Anisotropieexperimente von Male(G13C-AF) und Male(E211C-AF) über den Anstieg.

Wie gezeigt wurde, manifestiert sich die Bindung von Male an den Transporter über das Auftreten einer Endanisotropie. Das Erscheinen einer Endanisotropie geht einher mit einem Anstieg der langsamsten Rotationskorrelationszeit. Damit kann die Bindung von Male zum Transporterkomplex analysiert, indem die Erhöhung der Rotationskorrelationszeit von Male (Abbildung 6.13 A und 6.14 A) bestimmt wurde. Die Bindung von maltosefreiem Male mit dem Transporterkomplex in der Abwesenheit von ATP wurde nur beobachtet, wenn die Reportergruppe an Position E211 gebunden wurde. Dies weist darauf hin, dass es eine asymmetrische Interaktion der maltosefreien Form Male mit der periplasmatischen Oberfläche und der Bewegung der N-Domäne gibt. Wenn ATP, wie auch ATP und Maltose vorhanden sind, wurde eine Bindung von beiden Male(G13C-AF) und Male(E211C-AF) beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass unter diesen Konditionen beide Domänen von Male in engem Kontakt mit dem Transporter stehen. Die Interakti-

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

on von MalE unter hydrolisierenden Bedingungen, das heißt in Anwesenheit von MgCl_2 , ist wiederum unterschiedlich zwischen den beiden Domänen von MalE. Unter identischen experimentellen Bedingungen (geringe Konzentration von MgCl_2 und MgCl_2 im Überschuss) konnten sequentielle Änderungen der Dynamik beider Domänen von MalE beobachtet werden. Dies kann als differentielle dynamische Abkopplung von MalE interpretiert werden. In diesem Prozess löst sich zunächst die N-Domäne von MalE. Bei Messbedingungen mit einem Überschuss von MgCl_2 , der die Hydrolyse des gesamten Vorrats von ATP ermöglicht, befindet sich MalE in einem Gleichgewicht zwischen einem ungebundenen und einem partiell gebundenen Zustand. Dies zeigt sich bei den Messungen mit dem im C-terminalen Segment markierten MalE E211C-AF, die eine Rotationskorrelationszeit ϕ_3 von 39 ± 1.1 ns im Grundzustand besitzt. Durch die Zugabe von Transportercomplex, Maltose, ATP und MgCl_2 im Überschuss entsteht einer Erhöhung der Rotationskorrelationszeit ϕ_3 auf 53 ± 6.2 ns .

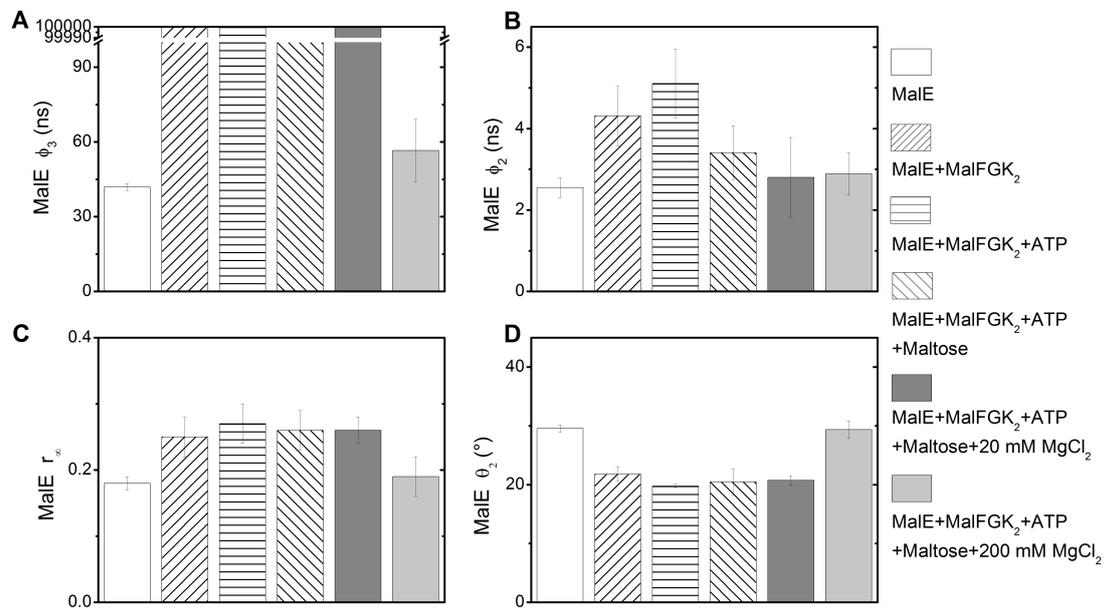


Abbildung 6.14.: **Balkendiagramme mit den Ergebnissen aus den Fluoreszenzanisotropie-Experimenten mit MalE(211C-AF).** **A:** Rotationskorrelationszeiten ϕ_3 in Abhängigkeit der Umgebung durch Schrittweise Zugabe der einzelnen Komponenten. **B:** Rotationskorrelationszeiten ϕ_2 in Abhängigkeit der Umgebung. **C:** Sterische Einschränkung r_∞ in Abhängigkeit der Umgebung. **D:** Halbkegelöffnungswinkel θ_2 nach dem *cone in a cone* Modell in Abhängigkeit der Umgebung. Messbedingungen: 50 mM Tris, pH 8.0, 0.01 % DDM, 20 % Glycerin, 0.1 mM PMSF, $T=15^\circ\text{C}$.

Die Segmentdynamik (ϕ_2) der zwei MalE-Regionen, an denen die Fluoreszenzreportergruppe gebunden ist, ändert, sobald der Transportkomplex anwesend ist (Abbildung 6.13 B und 6.14 B). Während die Korrelationszeit des Segments mit dem Residuum 211 in

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

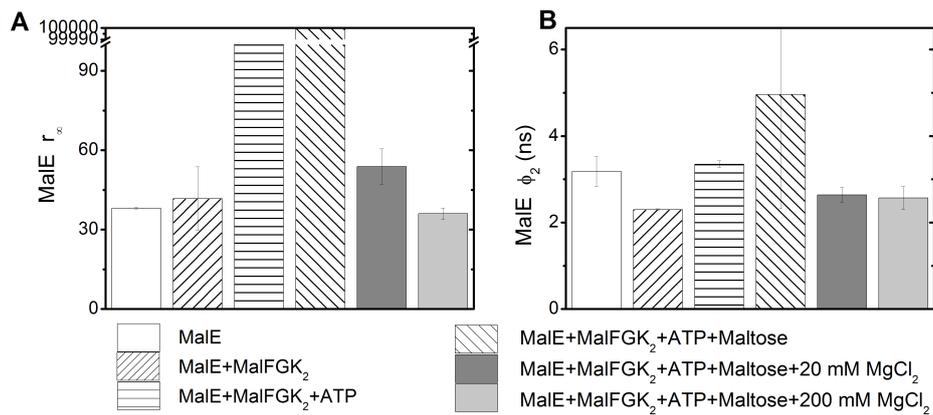


Abbildung 6.15.: **Balkendiagramme mit den Ergebnissen aus den Fluoreszenzanisotropie-Experimenten mit MalE(31C-AF).** **A:** Sterische Einschränkung r_∞ in Abhängigkeit der Umgebung durch Schrittweise Zugabe der einzelnen Komponenten. **B:** Rotationskorrelationszeiten ϕ_2 in Abhängigkeit der Umgebung. Messbedingungen: 50 mM Tris, pH 8.0, 0.01 % DDM, 20 % Glycerin, 0.1 mM PMSF, T=15°C.

Anwesenheit von MalFGK₂ und ATP langsamer wird, was auf eine Interaktion induziert durch Wechsel in Größe oder Form des bewegten Segments hinweist, wird dieser Effekt durch Zugabe von Maltose rückgängig gemacht. Es scheint, dass die Maltosebindung zum MalE und die Abgabe an die Translokationspore die Dynamik des helikalen Segments mit Position E211 bei der Interaktion mit der Transporteroberfläche kaum verändern. Der Bereich, der Position G13 enthält, verhält sich anders. Bei der Bindung von der maltosefreien Form MalE zur periplasmatischen Seite des Transporters wird die Dynamik des Loops mit den Residuen 11-15 schneller ($\phi_2=3.2 \pm 0.3$ ns gegenüber $\phi_2=2.2 \pm 0.1$ ns). Die größte Veränderung in der Loop-Dynamik fand bei der Maltosebindung an das vorgabundene MalE, das heißt im ATP hydrolysefördernden Interaktionszustand von MalE, statt. Die langsame Rotationskorrelationszeit von 5.0 ± 2.7 ns deutet an, dass entweder eine Änderung der Loop-Größe und/oder der Viskosität der Umgebung vorliegt.

Es ändert sich die sterische Einschränkung der zwei MalE-Regionen, wenn der Transporterkomplex anwesend ist (Abbildung 6.13 und 6.14). Die größte sterische Einschränkung von MalE und den periplasmatischen Loops wurde beobachtet, wenn ATP am MalK-Dimer gebunden ist, also bei Anwesenheit von MalFGK₂, ATP und Maltose.

Um den Unterschied in der Dynamik der beiden Domänen bei der Interaktion mit dem Transporter zu erhärten, wurde zusätzlich an der Position 31 fluoreszenzmarkiertes MalE (MalE(T31C-AF)) hergestellt und untersucht. Die Position 31 befinden sich in der Nähe zum MalF-P2-Loop im MalE-MalGFK₂ *transition state complex* (Oldham et al., 2007) (Abbildung 6.11). Interaktion von maltosefreiem MalE mit der periplasmatischen Oberfläche des Transporters in der Abwesenheit von ATP zeigt sich durch

6. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am ABC-Maltosetransporter

den Anstieg der sterischen Einschränkung (Abbildung 6.15 A). Wie für die beiden anderen Labeling-Positionen, wurde die höchste sterische Einschränkung von MalE und dem periplasmatischen Loop beobachtet, wenn ATP an den MalK-Dimer gebunden hat. Durch die Änderung der Segmentdynamik (ϕ_2) bei der MalE-Bindung zum Transporter in den Fällen der Ab- und Anwesenheit von ATP, und in der Anwesenheit von ATP und Maltose (Abbildung 6.15 B) kann auf mehrere in ihrer Dynamik sich unterscheidende Intermediatzustände geschlossen werden.

Zusätzlich wurden Messungen von MalGFK₂ in Proteoliposomen berücksichtigt (Abbildung 6.16), um zu zeigen, dass die assymetrische Interaktion von MalE mit der periplasmatischen Transporteroberfläche auch in einer Lipid-Membranumgebung vorhanden ist. Ein Anstieg der Rotationskorrelationszeit von MalE(G13C-AF) deutet an, dass eine Bindung an MalGFK₂ in der Anwesenheit von ATP vorhanden ist. Eine Änderung der Segmentdynamik ist ebenfalls im Vergleich zur Messung ohne ATP aufgetreten. Dies ist ähnlich zu den Resultaten, die beim solubilisierten Komplex zu beobachten waren.

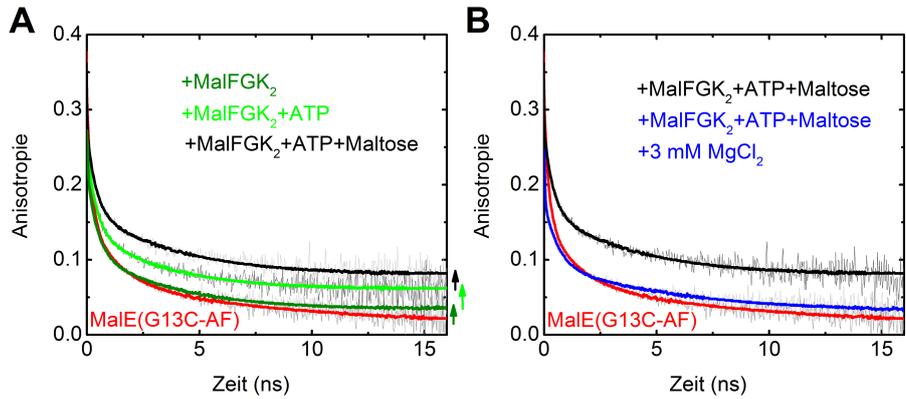


Abbildung 6.16.: **Änderung der Anisotropiezerfallskurve von MalE(G13C-AF) durch den Kontakt mit MalFGK₂ in Proteoliposomen.** **A:** Die Anisotropie von MalE(G13C-AF) im Grundzustand (rot) und in Anwesenheit von MalFGK₂ in Proteoliposomen (olivgrün), ATP (grün) und Maltose (schwarz) im Vergleich. Die Bindung von MalE(G13C-AF) an MalFGK₂ kann durch die Erhöhung der sterischen Einschränkung und Rotationskorrelationszeit detektiert werden (olivgrüner/grüner/schwarzer Pfeil). **B:** Teilweise Loslösung von MalE durch Zugabe von MgCl₂ equimolar (blau). MalE(G13C-AF) im Grundzustand (rot) in Anwesenheit von ATP, MalE und Maltose (schwarz) zum Vergleich abgebildet. Alle Proben wurden in 50 mM Tris, pH8 bei 15°C gemessen.

7. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konformationsänderungen und die Dynamik der periplasmatischen Oberfläche des ABC-Maltosetransporters von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* sowie des dazugehörigen SBP MalE während des Transportzyklus untersucht. Zur Analyse der Oberflächendynamik wurde die zeitaufgelöste Fluoreszenzdepolarisation in Kombination mit ortsspezifischer Fluoreszenzmarkierung gewählt.

Insbesondere die Interaktion der TMD und des im Periplasma gelösten SBP spielen eine entscheidende Rolle bei dem Transportvorgang des Substrats von prokaryotischen ABC-Importern, da über diesen Weg das Substrat an den Transporter geleitet wird. Durch die Bindung des SBP an die periplasmatische Oberfläche der TMD wird die Aufnahme des Substrats ermöglicht. Die Dynamik des Transporterkomplexes während des Transportprozesses wurde am Beispiel des ABC-Maltosetransporters von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* charakterisiert, der aufgrund intensiver und langjähriger Forschung als ein Modellsystem für ABC-Transporter betrachtet wird.

Der Maltosetransporter besitzt die für ABC-Transporter charakteristische Struktur von zwei TMD und zwei NBD, welche durch ein für prokaryotische Importer notwendiges SBP ergänzt werden. MalF und MalG bilden die TMD und zeichnen sich durch einen im MalF befindlichen, großen periplasmatischen Loop, den P2-Loop, aus. Dieser spezielle Loop nimmt eine zentrale Position beim Andockprozess des SBP, auch Maltose-Bindeprotein genannten Proteins MalE an die TMD ein. Die Dynamik des P2-Loop von MalF und von zwei weiteren für den Transportprozess bedeutenden periplasmatischen Loops von MalG wurden ausführlich in dieser Arbeit untersucht. Desweiteren wurde das Zusammenspiel des Transportkomplexes mit dem N-terminale und C-terminale Bereich des Maltose-Bindeproteins MalE untersucht.

7.1. Fluoreszenzmarkierung der Mutanten von MalE und MalFGK₂

Für die Fluoreszenzexperimente zur Konformationsänderung und Dynamik des ABC-Maltosetransporters ist eine ortsspezifische Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff notwendig. Dazu wurde ein bestehendes Labelingverfahren für den ABC-Maltosetransporter angepasst und optimiert. Nach der kovalenten Bindung des Fluoresceins an das

Protein muss der überschüssige Farbstoff von der zu vermessenden Probe vollständig abgetrennt werden, da sonst der verbleibende freie Farbstoff das Anisotropiesignal verfälschen kann. Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung der zeitaufgelösten Fluoreszenzdepolarisation ist, dass durch die Fluoreszenzmarkierung die Funktionalität des Proteins nicht beeinträchtigt wird. Für den Nachweis dieser Funktionalität ist eine Labelingstöchiometrie von nahezu 100 % erforderlich, die mit dem optimierten Labelingverfahren erzielt wurde.

7.2. Aktivitätsbestimmung von MalFGK₂

Die funktionale Aktivität des ABC-Maltosetransporters kann über die ATPase-Aktivität der NBD bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, welches die ATPase-Aktivität des fluoreszenzmarkierten ABC-Transporters und des fluoreszenzmarkierten MalE bestimmt. Der zentrale Schritt des ATPase-Aktivitätsassays besteht in der quantitativen Detektion des durch ATP-Hydrolyse entstandenen Phosphats. Wie nachgewiesen werden konnte, interferiert der hierzu verwendete Malachitgrün-Farbstoff nicht mit dem verwendeten Fluoreszenzlabel Fluorescein. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das zum Stoppen der ATPase-Reaktion verwendete SDS zu einem Farbumschlag des Malachitgrüns führt. Jedoch ist die Absorptionsbande des SDS-Malachitgrün-Komplexes gegenüber der Malachitgrün-Phosphat-Absorptionsbande blau verschoben. Durch die spektrale Diskriminierung beider Farbkomplexe ist eine quantitative Detektion der Phosphatkonzentration durch die Absorption bei 700 nm möglich. Das ist von besonderem Interesse, da dies eine quantitative Bestimmung des freien Phosphats mit Malachitgrün trotz Anwesenheit von dem in der Biochemie häufig verwendeten SDS ermöglicht. Mit Hilfe des hier entwickelten ATPase-Aktivitätsassays konnten die fluoreszenzmarkierten MalFGK₂-Komplexe und Maltose-Bindeproteine auf ihre Funktionalität überprüft werden.

7.3. Proteindynamik und ihre Änderungen während des Transportprozesses

Die Kristallstruktur des gesamten MalFGK₂-Komplexes in Anwesenheit von MalE (Oldham et al., 2007) zeigt eindeutig, dass im ATP-gebundenen Zustand MalE stark an den MalFGK₂-Komplex gebunden ist und der MalF-P2-Loop mit dem Maltose-Bindeprotein interagiert. Im Grundzustand des Transporters, d. h. in Abwesenheit von MalE (*resting state*), ist jedoch der große P2-Loop mit einem Molekulargewicht von über 20 kDa in der Kristallstruktur nicht aufgelöst (Khare et al., 2009). Dies kann durch eine hohe Mobilität des Loops oder durch eine große Strukturflexibilität erklärt werden. Mit Hilfe der Fluores-

7. Diskussion

zenanisotropieexperimente zur Charakterisierung der Dynamik des P2-Loops von MalF konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Entkopplung der Bewegung des P2-Loops vom Transmembranteil vorliegt. Insbesondere die Temperaturabhängigkeit der langsamsten Anisotropiezerfallskomponente von MalF-P2 T177C-AF deutet auf die vollständige Depolarisation durch die Rotation des P2-Loops hin. Da der P2-Loop auch in Abwesenheit der TMD strukturiert ist (Jacso et al., 2009), ist es sehr wahrscheinlich, dass die hohe Mobilität des strukturierten Loops durch eine Rotation um einen Gelenkbereich nahe der Membranoberfläche zustande kommt (Abbildung 6.1).

Während des Transportprozesses kommt es zu verschiedenen Konformationsänderungen des P2-Loops, denen eine funktionelle Relevanz zugeschrieben wird (Oldham et al., 2007; Khare et al., 2009; Oldham and Chen, 2011; Daus et al., 2009; Jacso et al., 2009). Neben den strukturellen Informationen aus den Kristallstrukturen (Oldham et al., 2007; Khare et al., 2009; Oldham and Chen, 2011) belegen spektroskopische und Cross-Linking-Messdaten (Daus et al., 2009) diesen Befund. Interessanterweise zeigt eine aktuelle MD-Simulation des MalFGK2-Komplexes (Oliveira et al., 2011), dass sich die Struktur und Interaktion des MalF-P2-Loops im ATP-gebundenen Zustand signifikant von der Kristallstruktur unterscheidet. Insbesondere der obere Teil des P2-Loops faltet sich zurück zur Membran. Dazu gehört auch das kurze helikale Segment 170-185, in dem sich in Position 177 der Fluoreszenzlabel befindet. Dieses helikale Segment scheint sich parallel zur Membranoberfläche anzuordnen (Oliveira et al., 2011). Durch die in der MD-Simulation beobachtete Konformationsänderung des P2-Loops verstärkt sich die Interaktion des N-terminalen Teils des MalE mit der periplasmatischen Oberfläche von MalG, d. h. der P2-Loop von MalF interagiert seitlich mit der N-terminalen Domäne von MalE und zieht die N-terminale MalE-Seite in Richtung der periplasmatischen Loops von MalG, während die restliche periplasmatische Oberfläche von MalF mit der C-terminalen Seite von MalE in Kontakt steht.

Bei der Interaktion mit dem N-terminalen Bereich von MalE kommt dem periplasmatischen P3-Loop von MalG eine besondere Bedeutung zu. Dieser P3-Loop, der sogenannte *scoop loop* (Abbildung 6.4), stabilisiert die offene, an den Transporter gebundene Form von MalE im sogenannten MalE-MalFGK₂ *transition state complex* (Oldham et al., 2007). Es gibt Befunde, die darauf hindeuten, dass dieser P3-Loop nicht nur eine Relokation der Maltose vom Bindeprotein in die Translokationspore ermöglicht, sondern auch die ATP-Hydrolyse über den Kontakt mit den Aminosäuren D14 und K15 (Gould and Shilton, 2010) von MalE begünstigt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten zeitaufgelösten Anisotropieexperimente liefern weitere Informationen über die Konformations- und Dynamikänderungen des P2-Loops von MalF sowie der P1- und P3-Loops von MalG während des Transportzyklus. Da die Anisotropiezerfallsexperimente eine freie Rotation des P2 Loops im Grundzustand

7. Diskussion

des Transporters ohne MalE zeigten, wurde die Fragestellung untersucht, unter welchen Bedingungen eine Immobilisierung des P2-Loops zu beobachten ist. Im Einklang mit den Informationen aus der Kristallstruktur konnte eine stark eingeschränkte Bewegung des P2-Loops im MalE-gebundenen Zustand, d. h. in Anwesenheit von ATP, und Maltose beobachtet werden. Um zu verstehen, wie die Beladung von MalE und die Bindung von ATP zu den NBDs auf der gegenüberliegenden Membranseite die Immobilisierung des P2-Loops, d. h. die Bindung von MalE beeinflusst, wurde zuerst untersucht, wie sich die Dynamik des P2-Loops in Gegenwart von MalE in der offenen (d. h. ohne Maltose) und in der geschlossenen (d. h. in der Maltose-gebundenen) Konformation verändert. In der offenen Konformation konnte eine MalE-konzentrationsabhängige Immobilisierung des P2-Loops über den Anstieg der Amplitude der Endanisotropie beobachtet werden. Ein zehnfacher Konzentrationsüberschuss an MalE in der offenen Konformation führt zu einer Immobilisierung des MalF-P2-Loops, währenddessen in der Maltose-gebundenen Form von MalE unter den gleichen Bedingungen kein Effekt auf die Dynamik des P2-Loops beobachtet wurde. Dieses Ergebnis impliziert eine differentielle Bindungsaffinität der beiden MalE-Konformationen an den Transporter. Ein ähnlicher Effekt wurde kürzlich von (Bao and Duong, 2012b) beobachtet. Die Autoren konnten zeigen, dass MalE mit hoher Affinität an den Transporter bindet, jedoch in der Maltose-gebundenen Form dissoziiert, wenn die Maltosekonzentration die Transportkapazität übersteigt. Diese Maltosekonzentrationsabhängige MalE-Bindungsaffinität wurde dahingehend interpretiert, dass in vivo die Maltose-getriebene Dissoziation von MalE die Transportrate limitiert und damit einen allosterischen Autoregulationsmechanismus darstellt (Bao and Duong, 2012b). Die in dieser Arbeit durchgeführten Proteindynamikexperimente unterstützen die Existenz einer differentiellen MalE-Bindungsaffinität, die von der Maltosebindung abhängt. Unter den in dieser Arbeit gegebenen experimentellen Bedingungen wird jedoch die differentielle Bindungsaffinität von MalE an den Grundzustand des Transporters in Abwesenheit von ATP durch die offene oder geschlossene MalE-Konformation bestimmt. In der Gegenwart von ATP wird die Bindungsaffinität von MalE vor allem in der Maltose-gebundenen Konformation erhöht, wie aus dem Anstieg der Endanisotropie in Abbildung 6.7 zu sehen ist. Diese Experimente zeigen, dass eine langreichweitige Konformationsänderung durch die Bindung von ATP an die NBD stattfindet und die Affinität auf der periplasmatischen Seite zur maltosebeladenen oder maltosefreien MalE-Form erhöht wird. Dies ist in Einklang mit früheren Studien zum Effekt von ATP auf die Transporterkonformation (Daus et al., 2007b, 2006). Die maximale P2-Loop-Immobilisierung wird in Gegenwart von ATP und Maltose bei einem Überschuss an MalE erzielt. Transporter-gebundenes MalE hat eine hohe Affinität für Maltose (Bao and Duong, 2012b). Unter den in dieser Arbeit gegebenen experimentellen Bedingungen erreicht die Maltosekonzentration nicht die Sättigungskonzentration von 1 mM für die beobachtete Dissoziation von

7. Diskussion

MalE (Bao and Duong, 2012b). Damit kann die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Dynamik des P2-Loops unter diesen Bedingungen der ATP-unterstützten Interaktion des P2-Loops mit MalE in seinem hochaffinen Maltosebindungszustand zugeordnet werden. Nach Zugabe von MgCl_2 , welches die ATP-Hydrolyse und somit den Transportvorgang einleitet, ist eine Verringerung der P2-Loop-Immobilisierung zu beobachten. Während geringere Konzentrationen von MgCl_2 nur zu einer partiellen Mobilisierung des P2-Loops führen, bringt ein hoher Überschuss von MgCl_2 einen vollständigen Rückgang der P2-Loop-Immobilisierung. Dies ist im Einklang mit der Vorstellung, dass eine Maltosebindung an den Transporter stattfindet und ATP-Hydrolyse die Energie für die Konformationsänderung liefert und, solange ATP vorhanden ist, MalE in der un- oder beladenen Form eine P2-Immobilisierung induziert. Nachdem ATP vollständig hydrolysiert wurde, kann der P2-Loop wieder frei rotieren. Dies bedeutet, dass nicht nur in der Gegenwart von Maltose ohne ATP (siehe oben), sondern auch in Gegenwart von Maltose und ADP die Bindungsaffinität von MalE zur periplasmatischen Transporteroberfläche herabgesetzt ist.

Neben der Immobilisierung des P2-Loops kann auch die Dynamik des kurzen helikalen Segments (Position 170-185) des P2-Loops Auskunft über das Zusammenspiel von MalE, Maltose, ATP und dem Transporter geben. Bindung von MalE führt zu einer langsameren Rotationsdiffusion des helikalen Segments von 4.6 ± 0.2 ns gegenüber der Rotationskorrelationszeit von 2.3 ± 0.2 ns im Grundzustand des Transporters. Die langsamere Dynamik der Helix im MalE-gebundenen Zustand geht mit einer etwas größeren sterischen Einschränkung ihres Bewegungsraums einher (Tabellen 8.1 - 8.3). Eine langsamere Bewegung der Helix kann unter anderem durch eine Erhöhung der Viskosität zustande kommen, wenn das helikale Segment 170-185 im MalE-gebundenen Zustand mit der Membran interagiert, wie anhand von MD-Simulationen vorgeschlagen wurde (Oliveira et al., 2011).

Zusätzlich zum P2-Loop von MalF wurden die Position 78 im P1-Loop und die Position 256 im P3-Loop von MalG fluoreszenzmarkiert und die beiden MalG-Loops auf ihre Konformationsänderungen und Dynamik hin untersucht. Hierbei zeigte sich eine hohe sterische Einschränkung des MalG P1-Loops im Grundzustand und nur eine marginale Veränderung der Dynamik und Konformation in den weiteren Transportzuständen des Komplexes. Dies ist im Einklang mit der Kristallstruktur im MalE-gebundenen prekatalytischen Zustand des Transporters (Abbildung 6.4), wo keine direkte Interaktion zwischen dem kurzen flexiblen Segment im P1-Loop und MalE erkennbar ist (Oldham and Chen, 2011). Der P3-Loop (*scoop loop*) von MalG zeigt im Gegensatz zum P1-Loop von MalG eine hohe Beweglichkeit, was darauf hindeutet, dass das Segment, in dem sich Position 256 befindet, sehr flexibel und wenig sterisch eingeschränkt, jedoch nicht in seiner Bewegung von der TMD entkoppelt ist. In Anwesenheit von Maltose, ATP und MalE

7. Diskussion

verlangsamt sich die Rotationsdiffusionszeit des flexiblen Segments, und es ist von einer Interaktion des P3-Loops mit dem beladenen Maltose-Bindeprotein MalE auszugehen. Interessanterweise ist die Dynamik des P3-Loopsegments etwas schneller, wenn unbeladenes MalE bindet, und die sterische Einschränkung der Bewegung ist weniger stark.

Unbeladenes MalE besitzt eine intrinsische Flexibilität, die eine Substratbindung über einen Venus-Fliegenfallen-Mechanismus erlaubt (Mao et al., 1982). Die zwei Substrat-Bindedomänen (siehe Kapitel 2.1.1.1) sind über eine kleine Helix und ein zweifach gefaltetes β -Faltblatt, das die Form einer Drehgelenkregion hat, verbunden. Die Bindeseite von MalE zum Transporter schließt die interdomäne Spalte zwischen den beiden MalE-Domänen ein. Der Bindemechanismus beinhaltet eine 30° Drehgelenksrotation zwischen den zwei Bereichen zueinander. Um die korrespondierenden MalE-Konformationsänderungen zu den periplasmatischen Loopänderungen des Transporters zu untersuchen, wurden der N-terminale Bereich in den Positionen 13 und 31, und der C-terminale Bereich mit der Position 211 fluoreszenzmarkiert und die Dynamik untersucht. Mit Hilfe der langsamsten Rotationskorrelationszeit ϕ_3 und dessen Temperaturabhängigkeit konnte für freies MalE die aus den Kristallstrukturdaten bekannte Größe von MalE aus dem Perrin-Plot bestimmt werden. Die Bindung von MalE an den Transporterkomplex konnte dann über die Änderung der Anisotropiezerfallskurve anhand des Auftretens eines konstanten Endwerts der Anisotropie detektiert werden.

Es wurden die verschiedenen Stadien des Transportzyklus mit mehreren Einzelmessungen zwischen den schrittweisen Zugaben der einzelnen Komponenten wie MalFGK₂, ATP und Maltose an den Mutanten MalE(G13C-AF) (N-terminale Domäne) und MalE(E211CAF) (C-terminale Domäne) untersucht. Wie auch für MalE G13C-AF und solubilisiertem Transporter wurde bei Messungen von MalGFK₂ in Proteoliposomen eine Bindung von MalE(G13C-AF) an MalGFK₂ in der Anwesenheit von ATP beobachtet. Die Resultate aus den Messungen mit dem Transporter in der Lipidmembranumgebung sind vergleichbar mit den Ergebnissen mit dem solubilisierten Komplex. Damit sind die hier vorgestellten Ergebnisse kein Artefakt im Detergenzsystem, sondern spiegeln die Prozesse wieder, die auch im Membransystem stattfinden werden. Mit Hilfe der Detektionspositionen in den beiden MalE-Domänen konnte eine asymmetrische Bindung von MalE beobachtet werden. Es sieht so aus, dass die maltosefreie Form von MalE nur mit ihrer C-terminalen Seite mit der periplasmatischen Transporteroberfläche interagiert. Wenn ATP, wie auch ATP und Maltose vorhanden sind, wurde eine Bindung von beiden MalE-Domänen beobachtet, und es besteht ein enger Kontakt zum Transporter. Unter hydrolisierenden Bedingungen (mit MgCl₂) konnte eine sequentielle dynamische Abkopplung der beiden Domänen von MalE beobachtet werden. Hierbei scheint sich zunächst die N-Domäne und erst bei Messbedingungen mit einem Überschuss von MgCl₂

7. Diskussion

die C-Domäne von MalE zu lösen. Daraus lässt sich schließen, dass das unbeladene MalE weiterhin mit dem C-terminalen Bereich des Transporters interagiert. Um die Ergebnisse über die Interaktion der N-Domäne von MalE während des Transportzyklus zu erhärten, wurde zusätzlich die Mutante MalE(T31C-AF) untersucht. Position 31 liegt in direkter Nähe des P2-Loops von MalF. Wie auch für die Immobilisierung des P2-Loops wurde für Position 31 von MalE die höchste sterische Einschränkung in Gegenwart von ATP beobachtet. Die Fluoreszenz-anisotropieexperimente zeigten, dass der P2-Loop ebenfalls durch einen Überschuss an MalE in seiner offenen Konformation immobilisiert werden kann, d. h. es zu einer Bindung der N-terminalen Domäne von MalE an den P2-Loop von MalF kommt. Der Fluoreszenzlabel in Position 31 der N-terminalen Domäne zeigt jedoch nur eine marginale Erhöhung der sterischen Einschränkung seiner Bewegung in Gegenwart des Transporters und bei Abwesenheit von Maltose. Da für die Anisotropieexperimente von MalE mit einem Überschuss an Transporter gearbeitet wurde, lassen sich die Ergebnisse wie folgt interpretieren. MalE hat nicht nur eine differentielle Bindungsaffinität zum Transporter in Abhängigkeit von Maltose, sondern die beiden Domänen in der offenen Konformation von MalE interagieren mit unterschiedlicher Affinität mit dem Grundzustand des Transporters (d. h. ohne ATP).

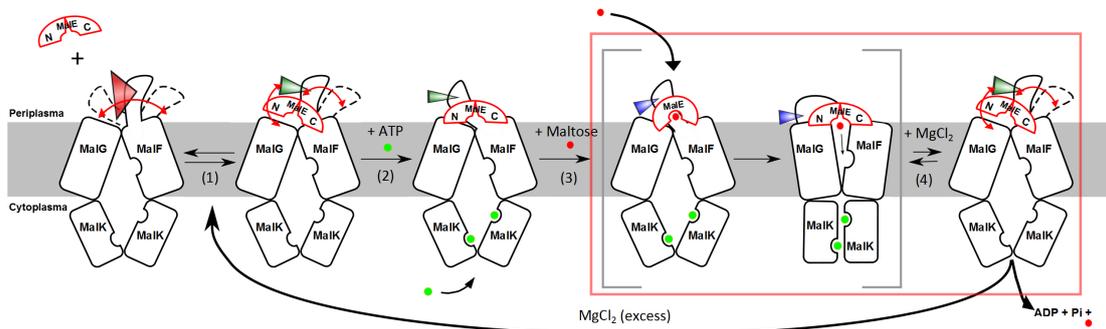


Abbildung 7.1.: **Transportmodell mit Maltose unbeladenen MalE** und dem im Grundzustand entkoppelten P2-Loop von MalF. **(1)** Das Maltose-Bindeprotein kann im unbeladenen Zustand eine schwache und reversible Bindung an seinem C-terminalen Bereich mit der periplasmatischen Oberfläche der TMD eingehen. **(2)** Durch Zugabe von ATP findet eine starke Bindung vom C- und N-terminalen Bereich des MalE mit der TMD statt. **(3)** Maltose kann an das gekoppelte MalE binden. Dadurch ändert sich die Konformation vom MalE und dem Komplex. **(4)** In der Anwesenheit von MgCl₂ wird der Transportprozess vollendet. Das Maltose-Bindeprotein löst sich an seinem N-terminalen Bereich von der TMD. Dabei ist es wieder in der Lage, Maltose aufzunehmen und mit dem Komplex den Transportvorgang erneut durchzuführen. Bei einer erhöhten MgCl₂-Konzentration kann sich das gesamte Maltose-Bindeprotein lösen und der Zyklus beginnt erneut bei (1).

7. Diskussion

Die aus dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen die Entwicklung eines genaueren Modells für den Transportzyklus zu (Abbildung 7.1 und Abbildung 7.2). Die Kernpunkte sind hierbei, dass eine P2-Immobilisierung unter den folgenden zwei Bedingungen auftritt: (i) bei der Bindung von unbeladenen MalE in Abwesenheit von ATP und (ii) bei der Bindung von Maltose-beladenen MalE in Gegenwart von ATP.

Der erste Teil des Modells (Abbildung 7.1) geht von unbeladenen MalE aus, welches im ersten Schritt eine schwache und reversible Bindung an seinem C-terminalen Bereich mit der periplasmatischen Oberfläche der TMD eingehen kann. Durch das ATP, welches aus dem Cytoplasma bereitgestellt wird, findet eine starke Bindung vom C- und N-terminalen Bereich des MalE mit der TMD statt. Somit kann Maltose an das gekoppelte MalE binden. Dadurch findet eine Konformationsänderung bei MalE und dem Komplex statt. Durch die Anwesenheit von $MgCl_2$ im Cytoplasma kann sich das Maltose-Bindeprotein an seinem N-terminalen Bereich von der TMD lösen. Daraufhin ist es wieder in der Lage, Maltose aufzunehmen und mit dem Komplex den Transportvorgang erneut durchzuführen. Bei einer erhöhten $MgCl_2$ -Konzentration kann sich das gesamte Maltose-Bindeprotein lösen und der Zyklus beginnt wieder vom ersten Schritt an.

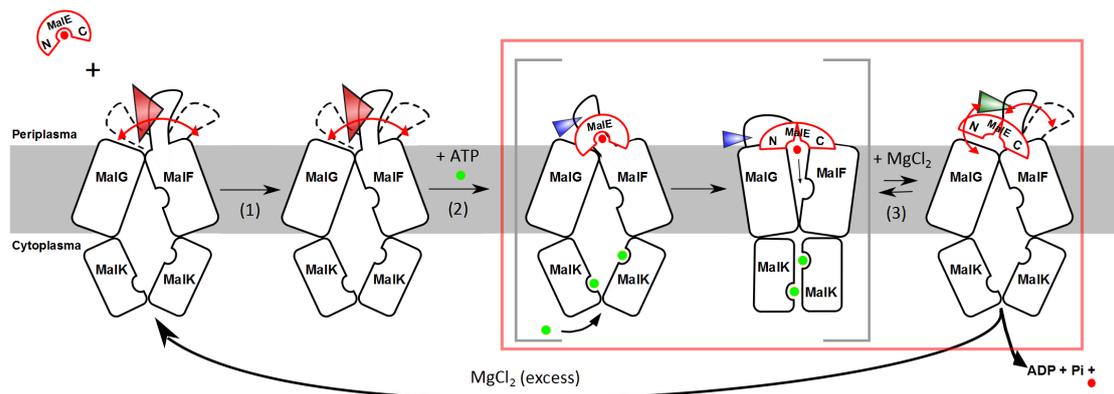


Abbildung 7.2.: **Transportmodell mit Maltose beladenen MalE** und dem im Grundzustand entkoppelten P2-Loop von MalF. **(1)** Das Maltose-Bindeprotein geht im beladenen Zustand keine Bindung mit der periplasmatischen Oberfläche der TMD ein. **(2)** Erst durch Zugabe von ATP erfolgt eine starke Bindung mit der Einleitung des Transportprozesses und den verbundenen Konformationsänderungen des Maltose-Bindeproteins und des Komplexes. **(3)** Mit der Anwesenheit von $MgCl_2$ wird der Transportprozess vollendet. Das Maltose-Bindeprotein löst sich an seinem N-terminalen Bereich von der TMD. Dabei ist es wieder in der Lage, Maltose aufzunehmen und mit dem Komplex den Transportvorgang erneut durchzuführen. Bei einer erhöhten $MgCl_2$ -Konzentration kann sich das gesamte Maltose-Bindeprotein lösen und der Zyklus beginnt erneut bei (1).

Im zweiten Teil des Modells wird von beladenen MalE ausgegangen, welches keine Bindung mit der periplasmatischen Oberfläche der TMD eingeht. Erst durch ATP erfolgt eine starke Bindung mit der Einleitung des Transportprozesses und den verbundenen Konfor-

7. Diskussion

mationsänderungen des Maltose-Bindeproteins und des Komplexes. Mit der Anwesenheit von MgCl_2 kann sich das Maltose-Bindeprotein an seinem N-terminalen Bereich von der TMD lösen und ist es wieder in der Lage, Maltose aufzunehmen und mit dem Komplex den Transportvorgang erneut durchzuführen. Bei einer erhöhten MgCl_2 -Konzentration kann sich das gesamte Maltose-Bindeprotein lösen und der Komplex ist bereit für einen weiteren Transportzyklus.

8. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Dynamik der periplasmatischen Oberfläche des ABC-Maltosetransporters von *Escherichia coli*/*Salmonella typhimurium* und dem dazugehörigen SBP während des Transportzyklus. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Labelingprotokoll zur Markierung des ABC-Maltosetransporters mit Fluorescein optimiert, so dass eine Labelingstöchiometrie von 100 % erreicht werden kann. Des Weiteren wurde ein Aktivitätsassay für den ABC-Maltosetransporter entwickelt, mit dem die Funktionstüchtigkeit der fluoreszenzmarkierten Komplex- und Maltose-Bindeprotein-Varianten nachgewiesen werden konnte. In diesem Zusammenhang konnte eine reproduzierbare Phosphatbestimmung mit Hilfe eines Malachitgrün-Assays unter Berücksichtigung der Effekte, die z. B. durch Glycerin, SDS und den Fluoreszenzmarker verursacht werden, erzielt werden.

Es wurde die Methode der ortsspezifischen kovalenten Bindung von Fluoreszenzmarkern an verschiedenen Positionen an der Proteinoberfläche verwendet, um mit Hilfe der zeitaufgelösten Fluoreszenzdepolarisation die Proteindynamik an spezifischen Stellen im Protein während des Transportvorgangs zu untersuchen.

Es konnte eine Charakterisierung der Oberflächenkonformation der periplasmatischen TMD. Dabei hat sich gezeigt, dass die MalF-P2-Loopdynamik im Grundzustand (*resting state*) von der TMD im Gegensatz zum MalG-P1- und MalG-P3-Loop (*scoop loop*) vollständig entkoppelt ist, wobei der *scoop loop* eine höhere Beweglichkeit als der in seiner Bewegung eingeschränkte MalG-P1-Loop im Grundzustand besitzt. In einem weitergehenden Schritt wurde die Immobilisierung des P2-Loops in Anwesenheit von unbeladenen MalE und in Abwesenheit von ATP wie auch in der Anwesenheit von ATP und dem beladenen MalE beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass eine langreichweitige Konformationsänderung durch die Bindung von ATP an die NBD stattfindet und die Affinität auf der periplasmatischen Seite zur maltosebeladenen oder maltosefreien MalE-Form erhöht wird.

Weiterführend wurde der N-terminale und C-terminale Bereich des SBP MalE untersucht. MalE ist in der Lage, mit dem Transporter unabhängig von ATP und Maltose zu interagieren. Die Bindung von ATP an den Transporter und die Bindung von Maltose an MalE führt zu unterschiedlichen Konformationsänderungen in den beiden Domänen von MalE.

Die gewonnenen Kenntnisse über die periplasmatischen Oberfläche der TMD und den

8. Zusammenfassung

N-terminalen und C-terminalen Bereichs von MalE konnten in Zusammenhang gebracht und daraus ein erweitertes Transportmodell erstellt werden.

Anhang

Anisotropiezerfall	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ_r^2
MalF-T177C-AF	0.36	0.32	0.20	2.5	0.31	26	0.49	1.5	4.1	0.9
+ATP+MalE+Maltose	0.34	0.38	0.18	4.4	0.28	∞	0.54	1.3	4.2	1.0

Tabelle 8.1.: **Fitparameter der Anisotropiezerfallskurven von Abbildung 6.6.** Mit den Rotationskorrelationszeiten ϕ_i , β_i den zugehörigen relativen Amplituden β_i ($\sum_i \beta_i = 1$), den Fluoreszenzzerfallszeiten τ_i und der Fitgüte χ_r^2 .

Abb.6.7 A Bindung ohne Maltose	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
MalF-T177C-AF +MalE (1:10)	0.32	0.29	0.18	4.3	0.32	∞	0.50	1.0	4.0	1.0
MalF-T177C-AF +MalE (1:2)	0.35	0.40	0.22	3	0.34	28	0.44	4.1	1.3	1.3
MalF-T177C-AF +MalE (1:0.2)	0.35	0.32	0.19	2.3	0.3	22	0.48	0.94	4.1	1.1
MalF-T177C-AF	0.35	0.30	0.18	2.1	0.33	21	0.5	0.94	4.0	1.1
+ATP+MalE+Maltose	0.34	0.38	0.18	4.4	0.28	∞	0.54	1.3	4.2	1.0

Abb.6.7 B Bindung mit Maltose	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
MalF-T177C-AF	0.33	0.14	0.18	1.5	0.23	24	0.60	0.82	4.0	1.1
MalF-T177C-AF+MalE+Maltose	0.33	0.14	0.21	1.5	0.23	24	0.59	0.89	4.0	1.0
MalF-T177C-AF+ATP+MalE+Maltose	0.34	0.38	0.18	4.4	0.28	∞	0.54	1.3	4.2	1.0

Abb.6.7 C Bindung mit ATP	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
MalF-T177C+MalE (1:2)	0.34	0.38	0.18	4.4	0.28	∞	0.54	1.3	4.2	0.9
MalF-T177C+MalE (1:0:2) +Maltose	0.36	0.26	0.21	3.4	0.36	51	0.43	0.76	4.0	1.3
MalF-T177C+MalE (1:0.2)	0.36	0.22	0.19	2.4	0.32	29	0.48	0.83	4.0	1.3
MalF-T177C-AF	0.36	0.32	0.20	2.5	0.31	26	0.49	1.5	4.1	0.9
+ATP+MalE+Maltose	0.34	0.38	0.18	4.4	0.28	∞	0.54	1.3	4.2	1.0

Tabelle 8.2.: **Fitparameter der Anisotropiezerfallskurven von Abbildung 6.7** mit den Rotationskorrelationszeiten ϕ_i , β_i den zugehörigen relativen Amplituden β_i ($\sum_i \beta_i = 1$), den Fluoreszenzzerfallszeiten τ_i und der Fitgüte χ_r^2 .

Anhang

Abb.6.8 A	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ_r^2
MalF-T177C-AF	0.36	0.32	0.20	2.5	0.31	26	0.49	1.5	4.1	0.9
+ATP+MalE+Maltose	0.34	0.38	0.18	4.4	0.28	∞	0.54	1.3	4.2	1.0
+20 mM MgCl ₂	0.34	0.33	0.19	3.0	0.30	39	0.51	1.5	4.2	0.9

Abb.6.8 B	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ_r^2
MalF-T177C-AF	0.33	0.14	0.18	1.5	0.23	24	0.60	0.82	4.0	1.1
+ATP+MalE+Maltose	0.32	0.33	0.20	5.4	0.33	∞	0.47	1.0	4.1	1.0
+200 mM MgCl ₂	0.33	0.18	0.18	1.5	0.23	24	0.59	0.77	4.0	1.0

Abb.6.8 C	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ_r^2
MalF-T177C-AF	0.26	0.36	0.21	2.9	0.33	28	0.46	1.3	4.1	0.9
+ATP+EDTA	0.30	0.31	0.21	3.0	0.33	35	0.46	1.4	4.1	0.9

Abb.6.8 D	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ_r^2
MalF-T177C-AF	0.28	0.36	0.22	3.0	0.32	30	0.47	1.3	4.1	1.0
+ATP+MgCl ₂	0.27	0.39	0.22	3.2	0.31	31	0.47	1.6	4.1	0.9

Tabelle 8.3.: **Fitparameter der Anisotropiezerfallskurven von Abbildung 6.8** mit den Rotationskorrelationszeiten ϕ_i , β_i den zugehörigen relativen Amplituden β_i ($\sum_i \beta_i = 1$), den Fluoreszenzzerfallszeiten τ_i und der Fitgüte χ_r^2 .

Abb.6.9 A	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ_r^2
MalG-P78C-AF	0.36	0.34	0.17	3.1	0.21	∞	0.62	0.99	4.0	1.2
+ATP+MalE+Maltose	0.36	0.31	0.20	3.0	0.14	∞	0.66	1.1	4.1	1.2

Abb.6.9 B	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ_r^2
MalG-P78C-AF	0.36	0.34	0.17	3.1	0.21	∞	0.62	0.99	4.0	1.2
+ATP+MalE+Maltose+MgCl ₂	0.35	0.30	0.19	3.6	0.19	∞	0.62	1.1	3.9	1.2

Tabelle 8.4.: **Fitparameter der Anisotropiezerfallskurven von Abbildung 6.9** mit den Rotationskorrelationszeiten ϕ_i , β_i den zugehörigen relativen Amplituden β_i ($\sum_i \beta_i = 1$), den Fluoreszenzzerfallszeiten τ_i und der Fitgüte χ_r^2 .

Anhang

Abb. 6.10 A	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ_r^2
MalG-Q256C-AF	0.35	0.40	0.28	5.2	0.48	∞	0.24	1.4	4.2	0.9
+ATP+MalE	0.34	0.56	0.25	5.7	0.43	∞	0.32	1.8	4.2	1.2
+Maltose	0.34	0.60	0.23	6.0	0.40	∞	0.37	1.7	4.2	0.9

Abb. 6.10 B	r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ_r^2
MalG-Q256C-AF	0.35	0.40	0.28	5.2	0.48	∞	0.24	1.4	4.2	0.9
+ATP+MalE+Maltose	0.34	0.60	0.23	6.0	0.40	∞	0.37	1.7	4.2	0.9
+MgCl ₂	0.34	0.49	0.26	5.6	0.45	∞	0.29	1.42	4.2	0.9

Tabelle 8.5.: **Fitparameter der Anisotropiezerfallskurven von Abbildung 6.10** mit den Rotationskorrelationszeiten ϕ_i , β_i den zugehörigen relativen Amplituden β_i ($\sum_i \beta_i = 1$), den Fluoreszenzzerfallszeiten τ_i und der Fitgüte χ_r^2 .

Abb. 6.16 A	τ_0	ϕ_0 (ns)	β_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	χ_r^2
MalE-G13C-AF	0.31	-	-	0.19	0.50	1.5	0.27	14	0.23	0.44	1.8	4.1	0.9
+MalFGK ₂	0.31	0.0004	0.29	0.39	0.34	3.9	0.25	∞	0.12	0.36	1.8	4.2	0.9
+ATP	0.25	-	-	0.35	0.43	3.4	0.32	∞	0.25	0.29	1.5	4.2	0.9
+Maltose	0.38	-	-	0.35	0.38	4.1	0.32	∞	0.3	0.22	1.3	4.2	0.9

Abb. 6.16 B	τ_0	ϕ_0 (ns)	β_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	χ_r^2
MalE-G13C-AF	0.31	-	-	0.19	0.50	1.5	0.27	14	0.23	0.44	1.8	4.1	0.9
+MalFGK ₂ +ATP+Maltose	0.38	-	-	0.35	0.38	4.1	0.32	∞	0.3	0.22	1.3	4.2	0.9
+MgCl ₂	0.27	0.0005	0.33	0.56	0.31	6.3	0.25	∞	0.11	0.36	1.7	4.2	0.9

Tabelle 8.6.: **Fitparameter der Anisotropiezerfallskurven von Abbildung 6.16** mit den Rotationskorrelationszeiten ϕ_i , β_i , den zugehörigen relativen Amplituden β_i ($\sum_i \beta_i = 1$), den Fluoreszenzzerfallszeiten τ_i und der Fitgüte χ_r^2 . Die Rotationskorrelationszeit ϕ_0 liegt außerhalb des Auflösungsvermögens der Apparatur. Sie deutet an, dass schnelle Depolarisationsprozesse in den Interaktionszuständen stattfinden, wo kein ATP vorhanden bzw. ATP verbraucht wurde.

Publikationen und Veranstaltungen

Während dieser Doktorarbeit wurden folgende Fachartikel angefertigt oder sind in Arbeit. Zusätzlich wurden verschiedene Beiträge auf Veranstaltungen präsentiert.

Veröffentlichungen

Folgende Publikationen wurden eingereicht oder befinden sich in Arbeit.

- Boris Repen, Erwin Schneider, und Ulrike Alexiev. „Optimization of a malachite green assay for detection of ATP hydrolysis by solubilized membrane proteins.” *Analytical biochemistry* 426(2):103105, July 2012.
- Boris Repen, Tai-Yang Kim, und Ulrike Alexiev. "Characterization of Membrane Protein Non-native States. Effect of Thermal Denaturation on Loop Dynamics in Bacteriorhodopsin." Manuskript ist in Arbeit.
- Boris Repen, Julian Ochsmann, Stefan Ott, Martin Daus, Frank Scheffel, Erwin Schneider und Ulrike Alexiev „Correlated dynamics of substrate binding protein and periplasmic loop regions of the maltose ATP-binding cassette transporter MalGFK₂: Role of MalF P2-loop immobilization” Manuskript ist in Arbeit.

Konferenzen und Workshops

Verschieden Beiträge zu dieser Arbeit wurden auf folgenden Veranstaltungen präsentiert.

- Joint Workshop of the “Physical & Chemical Graduate School Göttingen” and the “Dahlem Research School of Molecular Science”, Freie Universität Berlin, Germany 15.09.2008 – 17.09.2008.

- Bi-annual Conferences of the German Biophysical Society – 2008, Freie Universität Berlin, Germany 28.09.2008–01.10.2008
- Workshop „Molecular Science”, Freie Universität Berlin, Germany, 17.02.2009
- Joint Meeting of Danish and German Biophysicists, St.Bonifatius Monastery, Hünfeld, Germany 21.05.2009-24.05.2009
- First General Meeting „Center for Supramolecular Interactions (CSI)”, Freie Universität Berlin, Germany, 12.01.2010
- "Advanced methods in optical fluorescence microscopy towards nanoscopy", International School of Physics „Enrico Fermi” - Varenna, Italy, 11.07.2010-17.07.2010
- SFB 449 Symposium Berlin-2010, Charité Berlin - Institut für Mikrobiologie, Germany 02.12.2010-03.12.2010
- Second General Meeting „Center for Supramolecular Interactions (CSI)”, Freie Universität Berlin, Germany, 10.03.2011-11.03.2011

Literaturverzeichnis

- Alexiev, U., Rimke, I., and Pöhlmann, T. 2003. Elucidation of the nature of the conformational changes of the EF-interhelical loop in bacteriorhodopsin and of the helix VIII on the cytoplasmic surface of bovine rhodopsin: a time-resolved fluorescence depolarization study. *Journal of molecular biology*, 328(3):705–719. PMID: 12706727.
- Ames, G. F., Nikaido, K., Wang, I. X., Liu, P. Q., Liu, C. E., and Hu, C. 2001. Purification and characterization of the membrane-bound complex of an ABC transporter, the histidine permease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33(2):79–92. PMID: 11456221.
- Austermuhle, M. I., Hall, J. A., Klug, C. S., and Davidson, A. L. 2004. Maltose-binding protein is open in the catalytic transition state for ATP hydrolysis during maltose transport. *The Journal of biological chemistry*, 279(27):28243–28250. PMID: 15117946.
- Bao, H. and Duong, F. 2012a. ATP alone triggers the outward-facing conformation of the maltose ABC transporter. *The Journal of biological chemistry*. PMID: 23243313.
- Bao, H. and Duong, F. 2012b. Discovery of an auto-regulation mechanism for the maltose ABC transporter MalFGK2. *PloS one*, 7(4):e34836. PMID: 22529943.
- Baykov, A. A., Evtushenko, O. A., and Avaeva, S. M. 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Analytical Biochemistry*, 171(2):266–270. PMID: 3044186.
- Beechem, J. M. 1992. Global analysis of biochemical and biophysical data. *Methods in enzymology*, 210:37–54. PMID: 1584042.
- Berntsson, R. P.-A., Smits, S. H. J., Schmitt, L., Slotboom, D.-J., and Poolman, B. 2010. A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Letters*, 584(12):2606–2617. PMID: 20412802.
- Boos, W. and Shuman, H. 1998. Maltose/Maltodextrin system of escherichia coli: Transport, metabolism, and regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1):204–229. PMID: 9529892 PMCID: PMC98911.

- Bordignon, E., Grote, M., and Schneider, E. 2010. The maltose ATP-binding cassette transporter in the 21st century—towards a structural dynamic perspective on its mode of action. *Molecular Microbiology*, 77(6):1354–1366. PMID: 20659291.
- Borst, P., Zelcer, N., van de Wetering, K., and Poolman, B. 2006. On the putative co-transport of drugs by multidrug resistance proteins. *FEBS Letters*, 580(4):1085–1093. PMID: 16386247.
- Boyd, D., Traxler, B., and Beckwith, J. 1993. Analysis of the topology of a membrane protein by using a minimum number of alkaline phosphatase fusions. *Journal of bacteriology*, 175(2):553–556. PMID: 8419303.
- Carter, S. G. and Karl, D. W. 1982. Inorganic phosphate assay with malachite green: An improvement and evaluation. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 7(1):7–13.
- Chang, G. and Roth, C. B. 2001. Structure of MsbA from e. coli: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5536):1793–1800. PMID: 11546864.
- Chen, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A. L., and Quiocho, F. A. 2003. A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Molecular Cell*, 12(3):651–661. PMID: 14527411.
- Chen, J., Sharma, S., Quiocho, F. A., and Davidson, A. L. 2001. Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4):1525–1530. PMID: 11171984.
- Chifflet, S., Torriglia, A., Chiesa, R., and Tolosa, S. 1988. A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPases. *Analytical Biochemistry*, 168(1):1–4. PMID: 2834977.
- Daus, M. L., Berendt, S., Wuttge, S., and Schneider, E. 2007a. Maltose binding protein (MalE) interacts with periplasmic loops p2 and p1 respectively of the MalFG subunits of the maltose ATP binding cassette transporter (MalFGK(2)) from escherichia coli/Salmonella during the transport cycle. *Molecular Microbiology*, 66(5):1107–1122. PMID: 17961142.
- Daus, M. L., Grote, M., Müller, P., Doebber, M., Herrmann, A., Steinhoff, H.-J., Dassa, E., and Schneider, E. 2007b. ATP-driven MalK dimer closure and reopening and conformational changes of the "EAA" motifs are crucial for function of the maltose

Literaturverzeichnis

- ATP-binding cassette transporter (MalFGK2). *The Journal of Biological Chemistry*, 282(31):22387–22396. PMID: 17545154.
- Daus, M. L., Grote, M., and Schneider, E. 2009. The MalF p2 loop of the ATP-binding cassette transporter MalFGK2 from escherichia coli and salmonella enterica serovar typhimurium interacts with maltose binding protein (MalE) throughout the catalytic cycle. *Journal of Bacteriology*, 191(3):754–761. PMID: 19047355.
- Daus, M. L., Landmesser, H., Schlosser, A., Müller, P., Herrmann, A., and Schneider, E. 2006. ATP induces conformational changes of periplasmic loop regions of the maltose ATP-binding cassette transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(7):3856–3865. PMID: 16352608.
- Davidson, A. L. and Chen, J. 2004. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 73:241–268. PMID: 15189142.
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., and Chen, J. 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 72(2):317–364, table of contents. PMID: 18535149.
- Davidson, A. L., Laghaeian, S. S., and Mannering, D. E. 1996. The maltose transport system of escherichia coli displays positive cooperativity in ATP hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(9):4858–4863. PMID: 8617756.
- Davidson, A. L. and Maloney, P. C. 2007. ABC transporters: how small machines do a big job. *Trends in Microbiology*, 15(10):448–455. PMID: 17920277.
- Davidson, A. L., Shuman, H. A., and Nikaido, H. 1992. Mechanism of maltose transport in escherichia coli: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(6):2360–2364. PMID: 1549599.
- Dawson, R. J. P. and Locher, K. P. 2006. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, 443(7108):180–185. PMID: 16943773.
- Dawson, R. J. P. and Locher, K. P. 2007. Structure of the multidrug ABC transporter sav1866 from staphylococcus aureus in complex with AMP-PNP. *FEBS letters*, 581(5):935–938. PMID: 17303126.
- Dean, D. A., Hor, L. I., Shuman, H. A., and Nikaido, H. 1992. Interaction between maltose-binding protein and the membrane-associated maltose transporter complex in escherichia coli. *Molecular microbiology*, 6(15):2033–2040. PMID: 1406246.

- Dean, M., Rzhetsky, A., and Allikmets, R. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, 11(7):1156–1166. PMID: 11435397.
- Deeley, R. G. and Cole, S. P. C. 2006. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Letters*, 580(4):1103–1111. PMID: 16387301.
- Di Pietro, A., Conseil, G., Pérez-Victoria, J. M., Dayan, G., Baubichon-Cortay, H., Trompier, D., Steinfels, E., Jault, J. M., de Wet, H., Maitrejean, M., Comte, G., Boumendjel, A., Mariotte, A. M., Dumontet, C., McIntosh, D. B., Goffeau, A., Castanys, S., Gamarro, F., and Barron, D. 2002. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by p-glycoprotein and related ABC transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 59(2):307–322. PMID: 11915946.
- Duan, X. and Quijcho, F. A. 2002. Structural evidence for a dominant role of nonpolar interactions in the binding of a transport/chemosensory receptor to its highly polar ligands. *Biochemistry*, 41(3):706–712. PMID: 11790091.
- Eitinger, T., Rodionov, D. A., Grote, M., and Schneider, E. 2011. Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1):3–67. PMID: 20497229.
- Elferink, M. G., Albers, S. V., Konings, W. N., and Driessen, A. J. 2001. Sugar transport in *Sulfolobus solfataricus* is mediated by two families of binding protein-dependent ABC transporters. *Molecular Microbiology*, 39(6):1494–1503. PMID: 11260467.
- Fiske, C. H. and Subbarow, Y. 1925. THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHORUS. *Journal of Biological Chemistry*, 66(2):375–400.
- Froshauer, S., Green, G. N., Boyd, D., McGovern, K., and Beckwith, J. 1988. Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, a cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 200(3):501–511. PMID: 3294421.
- Geladopoulos, T. P., Sotiroudis, T. G., and Evangelopoulos, A. E. 1991. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Analytical Biochemistry*, 192(1):112–116. PMID: 1646572.
- Gericke, S. and Kurmies, B. 1952. Colorimetrische bestimmung der phosphorsäure mit vanadat-molybdat. *Fresenius' Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, 137:15–22.
- Gilson, E., Alloing, G., Schmidt, T., Claverys, J. P., Dudler, R., and Hofnung, M. 1988. Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in mycoplasma. *The EMBO Journal*, 7(12):3971–3974. PMID: 3208757.

- Gould, A. D. and Shilton, B. H. 2010. Studies of the maltose transport system reveal a mechanism for coupling ATP hydrolysis to substrate translocation without direct recognition of substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15):11290–11296.
- Grote, M., Polyhach, Y., Jeschke, G., Steinhoff, H.-J., Schneider, E., and Bordignon, E. 2009. Transmembrane signaling in the maltose ABC transporter MalFGK2-E: periplasmic MalF-P2 loop communicates substrate availability to the ATP-bound MalK dimer. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(26):17521–17526. PMID: 19395376.
- Hall, J. A., Davidson, A. L., and Nikaido, H. 1998. Preparation and reconstitution of membrane-associated maltose transporter complex of escherichia coli. *Methods in enzymology*, 292:20–29. PMID: 9711543.
- Higgins, C. F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*, 8:67–113. PMID: 1282354.
- Hirano, T. 2006. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(5):311–322. PMID: 16633335.
- Holland, I. B., Blight, M. A., and Kenny, B. 1990. The mechanism of secretion of hemolysin and other polypeptides from gram-negative bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 22(3):473–491. PMID: 2202728.
- Hopfner, K. P., Karcher, A., Shin, D. S., Craig, L., Arthur, L. M., Carney, J. P., and Tainer, J. A. 2000. Structural biology of rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell*, 101(7):789–800. PMID: 10892749.
- Hvorup, R. N., Goetz, B. A., Niederer, M., Hollenstein, K., Perozo, E., and Locher, K. P. 2007. Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5843):1387–1390. PMID: 17673622.
- Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E., and Higgins, C. F. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, 346(6282):362–365. PMID: 1973824.
- Inagaki, N., Gono, T., Clement, J P, t., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., and Bryan, J. 1995. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5239):1166–1170. PMID: 7502040.

- Itaya, K. and Ui, M. 1966. A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 14(3):361–366. PMID: 5970965.
- Jacso, T., Grote, M., Daus, M. L., Schmieder, P., Keller, S., Schneider, E., and Reif, B. 2009. Periplasmic loop p2 of the MalF subunit of the maltose ATP binding cassette transporter is sufficient to bind the maltose binding protein MalE. *Biochemistry*, 48(10):2216–2225. PMID: 19159328.
- Juszczak, L. J., Zhang, Z. Y., Wu, L., Gottfried, D. S., and Eads, D. D. 1997. Rapid loop dynamics of yersinia protein tyrosine phosphatases. *Biochemistry*, 36(8):2227–2236. PMID: 9047324.
- Khare, D., Oldham, M. L., Orelle, C., Davidson, A. L., and Chen, J. 2009. Alternating access in maltose transporter mediated by rigid-body rotations. *Molecular Cell*, 33(4):528–536. PMID: 19250913.
- Kim, T.-Y., Moeller, M., Winkler, K., Kirchberg, K., and Alexiev, U. 2009. Dissection of environmental changes at the cytoplasmic surface of light-activated bacteriorhodopsin and visual rhodopsin: sequence of spectrally silent steps. *Photochemistry and Photobiology*, 85(2):570–577. PMID: 19222795.
- Kim, T.-Y., Schlieter, T., Haase, S., and Alexiev, U. 2012. Activation and molecular recognition of the GPCR rhodopsin—insights from time-resolved fluorescence depolarisation and single molecule experiments. *European journal of cell biology*, 91(4):300–310. PMID: 21803442.
- Kim, T.-Y., Winkler, K., and Alexiev, U. 2007. Picosecond multidimensional fluorescence spectroscopy: a tool to measure real-time protein dynamics during function. *Photochemistry and photobiology*, 83(2):378–384. PMID: 17117889.
- Kinosita, K. J., Kawato, S., and Ikegami, A. 1977. A theory of fluorescence polarization decay in membranes. *Biophysical journal*, 20(3):289–305. PMID: 922121.
- Kirchberg, K., Kim, T.-Y., Möller, M., Skegro, D., Dasara Raju, G., Granzin, J., Büldt, G., Schlesinger, R., and Alexiev, U. 2011. Conformational dynamics of helix 8 in the GPCR rhodopsin controls arrestin activation in the desensitization process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. PMID: 22039220.
- Koepsell, S. A., Hanson, S., Hinrichs, S. H., and Griep, M. A. 2005. Fluorometric assay for bacterial primases. *Analytical Biochemistry*, 339(2):353–355. PMID: 15797579.
- Krämer, R. 1994. Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1185(1):1–34. PMID: 7511415.

Literaturverzeichnis

- Lage, H. 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International journal of antimicrobial agents*, 22(3):188–199. PMID: 13678820.
- Lakowicz, J. R. 2010. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 4th printing. edition.
- Landmesser, H., Stein, A., Blüschke, B., Brinkmann, M., Hunke, S., and Schneider, E. 2002. Large-scale purification, dissociation and functional reassembly of the maltose ATP-binding cassette transporter (MalFGK(2)) of salmonella typhimurium. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1565(1):64–72. PMID: 12225853.
- Linton, K. J. 2007. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 22:122–130. PMID: 17420303.
- Locher, K. P. 2009. Review. structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1514):239–245. PMID: 18957379.
- Locher, K. P., Lee, A. T., and Rees, D. C. 2002. The e. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5570):1091–1098. PMID: 12004122.
- Lu, G., Westbrook, J. M., Davidson, A. L., and Chen, J. 2005. ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50):17969–17974. PMID: 16326809.
- Mao, B., Pear, M. R., McCammon, J. A., and Quioco, F. A. 1982. Hinge-bending in l-arabinose-binding protein. the "Venus's-flytrap" model. *The Journal of biological chemistry*, 257(3):1131–1133. PMID: 7035444.
- McCleary, W. R., Stock, J. B., and Ninfa, A. J. 1993. Is acetyl phosphate a global signal in escherichia coli? *Journal of Bacteriology*, 175(10):2793–2798. PMID: 8491699.
- Merino, G., Boos, W., Shuman, H. A., and Bohl, E. 1995. The inhibition of maltose transport by the unliganded form of the maltose-binding protein of escherichia coli: experimental findings and mathematical treatment. *Journal of theoretical biology*, 177(2):171–179. PMID: 8558904.
- Munro, I., Pecht, I., and Stryer, L. 1979. Subnanosecond motions of tryptophan residues in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1):56–60. PMID: 284374.

Literaturverzeichnis

- Nikaido, K., Liu, P. Q., and 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(44):27745–27752. PMID: 9346917.
- Oldham, M. L. and Chen, J. 2011. Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6034):1202–1205. PMID: 21566157.
- Oldham, M. L., Davidson, A. L., and Chen, J. 2008. Structural insights into ABC transporter mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(6):726–733. PMID: 18948194.
- Oldham, M. L., Khare, D., Quioco, F. A., Davidson, A. L., and Chen, J. 2007. Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature*, 450(7169):515–521. PMID: 18033289.
- Oliveira, A. S. F., Baptista, A. M., and Soares, C. M. 2011. Inter-domain communication mechanisms in an ABC importer: A molecular dynamics study of the MalFGK2E complex. *PLoS Computational Biology*, 7(8). PMID: 21829343 PMCID: PMC3150292.
- Oloo, E. O., Fung, E. Y., and Tieleman, D. P. 2006. The dynamics of the MgATP-driven closure of MalK, the energy-transducing subunit of the maltose ABC transporter. *The Journal of biological chemistry*, 281(38):28397–28407. PMID: 16877382.
- Orelle, C., Ayyaz, T., Everly, R. M., Klug, C. S., and Davidson, A. L. 2008. Both maltose-binding protein and ATP are required for nucleotide-binding domain closure in the intact maltose ABC transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35):12837–12842. PMID: 18725638.
- Pardee, A. B. 1968. Membrane transport proteins. proteins that appear to be parts of membrane transport systems are being isolated and characterized. *Science (New York, N.Y.)*, 162(854):632–637. PMID: 4879932.
- Quazi, F. and Molday, R. S. 2011. Lipid transport by mammalian ABC proteins. *Essays in Biochemistry*, 50(1):265–290. PMID: 21967062.
- Quioco, F. A. and Ledvina, P. S. 1996. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Molecular Microbiology*, 20(1):17–25. PMID: 8861200.
- Quioco, F. A., Spurlino, J. C., and Rodseth, L. E. 1997. Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin

- transport/chemosensory receptor. *Structure (London, England: 1993)*, 5(8):997–1015. PMID: 9309217.
- Repen, B., Schneider, E., and Alexiev, U. 2012. Optimization of a malachite green assay for detection of ATP hydrolysis by solubilized membrane proteins. *Analytical biochemistry*, 426(2):103–105. PMID: 22507377.
- Samanta, S., Ayvaz, T., Reyes, M., Shuman, H. A., Chen, J., and Davidson, A. L. 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(37):35265–35271. PMID: 12813052.
- Schneider, E., Eckey, V., Weidlich, D., Wiesemann, N., Vahedi-Faridi, A., Thaben, P., and Saenger, W. 2011. Receptor-transporter interactions of canonical ATP-binding cassette import systems in prokaryotes. *European Journal of Cell Biology*. PMID: 21561685.
- Schneider, E. and Hunke, S. 1998. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(1):1–20. PMID: 9640644.
- Schneider, E., Wilken, S., and Schmid, R. 1994. Nucleotide-induced conformational changes of MalK, a bacterial ATP binding cassette transporter protein. *The Journal of biological chemistry*, 269(32):20456–20461. PMID: 8051143.
- Schröder, G. F., Alexiev, U., and Grubmüller, H. 2005. Simulation of fluorescence anisotropy experiments: probing protein dynamics. *Biophysical journal*, 89(6):3757–3770. PMID: 16169987.
- Sharff, A. J., Rodseth, L. E., and Quioco, F. A. 1993. Refined 1.8-Å structure reveals the mode of binding of beta-cyclodextrin to the maltodextrin binding protein. *Biochemistry*, 32(40):10553–10559. PMID: 8399200.
- Smith, P. C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J. E., Rosen, J., Thomas, P. J., and Hunt, J. F. 2002. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Molecular Cell*, 10(1):139–149. PMID: 12150914.
- Spurlino, J. C., Lu, G. Y., and Quioco, F. A. 1991. The 2.3-Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *The Journal of biological chemistry*, 266(8):5202–5219. PMID: 2002054.

- Stockner, T., Vogel, H. J., and Tieleman, D. P. 2005. A salt-bridge motif involved in ligand binding and large-scale domain motions of the maltose-binding protein. *Biophysical Journal*, 89(5):3362–3371. PMID: 16143635 PMCID: PMC1366833.
- Swain, K., Casabon, I., Eltis, L. D., and Mohn, W. W. 2012. Two transporters essential for reassimilation of novel cholate metabolites by rhodococcus jostii RHA1. *Journal of bacteriology*, 194(24):6720–6727. PMID: 23024344.
- Tang, C., Schwieters, C. D., and Clore, G. M. 2007. Open-to-closed transition in apo maltose-binding protein observed by paramagnetic NMR. *Nature*, 449(7165):1078–1082. PMID: 17960247.
- Terasaki, W. L. and Brooker, G. 1976. Automated method for the quantitation of orthophosphate. *Analytical Biochemistry*, 75(2):447–453. PMID: 984405.
- van der Heide, T. and Poolman, B. 2002. ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Reports*, 3(10):938–943. PMID: 12370206.
- Vergani, P., Lockless, S. W., Nairn, A. C., and Gadsby, D. C. 2005. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature*, 433(7028):876–880. PMID: 15729345.
- Wen, P.-C. and Tajkhorshid, E. 2008. Dimer opening of the nucleotide binding domains of ABC transporters after ATP hydrolysis. *Biophysical Journal*, 95(11):5100–5110. PMID: 18790847 PMCID: PMC2586561.
- Winkler, K., Winter, A., Rueckert, C., Uchanska-Ziegler, B., and Alexiev, U. 2007. Natural MHC class I polymorphism controls the pathway of peptide dissociation from HLA-B27 complexes. *Biophysical Journal*, 93(8):2743–2755. PMID: 17573425.
- Wu, C.-P., Hsieh, C.-H., and Wu, Y.-S. 2011. The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Molecular Pharmaceutics*. PMID: 21770407.
- Zhang, Y., Gardina, P. J., Kuebler, A. S., Kang, H. S., Christopher, J. A., and Manson, M. D. 1999. Model of maltose-binding protein/chemoreceptor complex supports intrasubunit signaling mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3):939–944. PMID: 9927672 PMCID: PMC15329.
- Zhu, S., Gan, Z., Li, Z., Liu, Y., Yang, X., Deng, P., Xie, Y., Yu, M., Liao, H., Zhao, Y., Zhao, L., and Liao, F. 2009. The measurement of cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 activities via the quantification of inorganic phosphate with malachite green. *Analytica Chimica Acta*, 636(1):105–110. PMID: 19231363.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Professor Ulrike Alexiev für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe diese Dissertation anfertigen zu können, und für ihre umfangreiche Betreuung zu dieser Arbeit bedanken.

Bei Herrn Professor Heyne bedanke ich mich für die Arbeit am Zweitgutachen meiner Dissertation und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe einen Vortrag halten zu können.

Tai-Yang Kim danke ich für die Einweisung in die Messapparatur, Auswertungsmethoden und die ausführlichen Diskussionen über die physikalischen Aspekte zu dieser Arbeit und im Allgemeinen.

Ich bedanke mich bei Dr. Kristina Kirchberg dafür, mir einen leichten Zugang zur Biochemie verschafft zu haben und für die Tipps zum praktischen Arbeiten in einem Biochemielabor.

Mein Dank gilt weiterhin Julian Ochsman, Alexander Boreham, Stefan Ott, Dr. Sebastian Haase und Christina Seidler für die Unterstützung in der Arbeitsgruppe.

Im Besonderen möchte ich Professor Schneider und seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der ABC-Maltosetransporter-Mutanten danken. Hier sind Dr. Martin Daus, Dr. Frank Scheffel und Heidi Landmesser zu nennen.

Jörg Maas und Alexander Winter danke ich für das ausführliche Korrekturlesen.

Meine größte Dankbarkeit gilt meiner Frau Andrea, die diese Arbeit Korrektur gelesen hat und mich immer unterstützt.