

**Festkörper-NMR-Spektroskopie am ABC-Transporter
ArtMP-J aus *G. stearotherophilus***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Britta Sigrun Kunert

aus Lutherstadt-Wittenberg

2011

Diese Arbeit wurde von April 2007 bis September 2011 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) unter Anleitung von Prof. Dr. Hartmut Oschkinat angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Reif

Technische Universität München

Disputation am: 14.12.2011

Für meine Patenkinder Amelie & Jonas

Wo Licht im Menschen ist, scheint es aus ihm heraus.

Albert Schweizer

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders herzlich bei Prof. Dr. Hartmut Oschkinat für dieses spannende Projekt, für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und sein Vertrauen in meine Arbeit bedanken. Danke für die Möglichkeit, an nationalen sowie internationalen Tagungen und Workshops teilzunehmen.

Prof. Dr. Reif danke ich für die großartige Organisation der *Leibniz Graduate School of Molecular Biophysics*. Danke für das Vertrauen in uns, wodurch es uns möglich war, an der Organisation von Mini-Symposien aktiv mitzuwirken.

Bei Prof. Dr. Erwin Schneider und Dr. Viola Eckey möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung des Plasmids pVE15 bedanken. Prof. Dr. E. Schneider und Prof. Dr. Andreas Herrmann danke ich für hilfreiche Diskussionen im Rahmen meines Thesis-Komitees.

Bei Frau Dr. Anne Diehl und Frau Dr. Katja Fälber möchte ich mich für ihre Diskussionsbereitschaft bedanken. Sie haben mir oft mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Danke!

Ich möchte mich besonders herzlich bei Frau Dr. Dorothea Lorenz für das geduldige Suchen nach 2D-Kristallen bedanken. Probe für Probe und Grid für Grid!

Herrn Dr. Peter Schmieder danke ich für die große Unterstützung bei der Durchführung der Lösungs-NMR-Experimente und seine hilfreichen Ratschläge zu jeder Zeit. Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Monika Beerbaum und Frau Brigitte Schlegel für ihre Hilfe bei meinen ersten Schritten zum selbstständigen Messen bedanken. Vielen Dank!

Herrn Trent Franks, PhD und Herrn Dr. Matthias Hiller danke ich für die Durchführung der Festkörper-NMR-Experimente und die Einführung in die NMR-Spektroskopie. Besonderer Dank gilt Dr. Matthias Hiller für seine tatkräftige und motivierende Unterstützung im letzten Jahr.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dr. Barth van Rossum, Shakeel Ahmad Shahid, Marco Röben und Stefan Markovic für viele fachliche und interessante Gespräche danken. Mit Euch war es immer lustig. Ich werde Euch vermissen!

Meinen Kollegen im Labor danke ich für die gute Zusammenarbeit, ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft! Besonders möchte ich an dieser Stelle bei Liselotte Handel, Martina Leidert und Kristina Rehbein bedanken, die mit Rat und Tat zur Stelle waren, wenn es irgendwo „brannte“.

Ich bedanke mich bei Alexandra Kiesling, Heidemarie Petschick und Andrea Steuer für die unermüdliche Hilfe bei administrativen Fragen und für viele nette Gespräche!

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dr. Janet Zapke, Jana Bröcker, Anja Voreck und Matthias Dorn bedanken. Janet, wir haben uns im Studium kennen gelernt und uns am FMP wieder getroffen. Danke für Deine Unterstützung! Jana, als Du das Institut verlassen hast, blieb eine große Lücke. Uns fehlten besonders Dein Temperament und dein großes Herz. Anja, Du wurdest mir ohne Ankündigung im Druckerraum als neue Partnerin auf meinem Projekt vorgestellt. Du warst von Anfang an eine tolle Kollegin. Danke für alles! Matthias, wann immer es technische Probleme gab, warst Du zur Stelle. Der Retter in der Not, Danke!

Ich danke Natalja Erdmann für die großartige Zusammenarbeit bei der Durchführung der HZDF mit unserem *G. stearothermophilus*. Deine Fröhlichkeit und Dein ansteckendes Lachen werde ich sehr vermissen! Du hast immer ein offenes Ohr für mich und immer einen Rat. Natalja, Du bist mir sehr ans Herz gewachsen! Bleib so wie Du bist!

Ich möchte mich ganz besonders bei Anne Wartenberg bedanken. Du standest mir in vielen fachlichen Fragen zur Seite und warst immer eine große Unterstützung. Aber Du warst nicht nur eine tolle Kollegin, sondern bist zu einer echten Freundin geworden, die immer für mich da ist! Unsere Einkaufsbummel und Gespräche werde ich sehr vermissen! Danke, dass Du so bist, wie Du bist!

Ein besonders große Danke geht an Dr. Vivien Lange! Vivien, Du warst eine wunderbare Kollegin und hast mich bis zuletzt immer tatkräftig unterstützt. Du hast mich aufgebaut, wenn es mal schwer war. Aber meistens haben wir viel gelacht und das vermisse ich sehr! Danke für Deine Freundschaft!

Ich danke Stefanie und Sabine, meinen engsten Freundinnen für ihre aufmunternden Worte in schweren Stunden und für ihren Glauben an das Gelingen meiner Arbeit. Freundschaft zeigt sich immer dann, wenn es am schwersten ist. Ich umarme Euch!

Ich danke meinen Eltern, meinen Großeltern und meiner Schwester Romy für ihre Geduld und praktische Unterstützung bei so vielen Fragen und Sorgen, die diese Zeit mit sich brachte. Mein postumer Dank geht an meine Oma Christel, die immer an mich geglaubt hat, aber meinen erfolgreichen Abschluss leider nicht mehr miterleben kann.

Ich möchte die Liste meiner Danksagungen mit dem Menschen abschließen, der mir in den letzten Jahren zum wertvollsten Partner geworden ist. Giorgio, ich danke Dir dafür, dass ich so sein darf, wie ich bin.

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	10
1.1.	ABC-Transporter	10
1.1.1.	Physiologie und Pathophysiologie der ABC-Transporter	10
1.1.2.	Aufbau der ABC-Transporter	11
1.1.2.1.	Die Substratbindepoteine der prokaryotischen ABC-Importsysteme	13
1.1.2.2.	Die integralen Transmembrandomänen	14
1.1.2.3.	Die zytoplasmatischen Nukleotidbindedomänen	17
1.1.3.	Der Transport- und ATP-Hydrolysezyklus der ABC-Transporter	20
1.2.	Der ABC-Transporter ArtMP-J aus <i>G. stearothermophilus</i>	22
1.2.1.	Der thermophile Organismus <i>G. stearothermophilus</i>	23
1.2.2.	Aufbau von ArtMP-J	23
1.3.	Strukturuntersuchungen von Membranproteinen	26
1.3.1.	Physikalische Grundlagen der NMR-Spektroskopie	31
1.3.2.	Isotopen-Markierung von Membranproteinen	32
1.3.3.	Ausgewählte Methoden in der Festkörper-NMR-Spektroskopie	33
1.4.	Festkörper-NMR-Spektroskopie am ABC-Transporter	
	ArtMP-J	36
1.5.	Motivation und Zielsetzung	38
2.	<u>Material und Methoden</u>	40
2.1.	Material	40
2.1.1.	Enzyme, Chemikalien, Materialien und Geräte	40
2.1.2.	Oligonukleotide, Plasmide und Bakterienstämme	40
2.1.3.	Verwendete Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	42
2.1.4.	Verwendete Nährmedien zur Kultivierung von <i>G. stearothermophilus</i>	42
2.2.	Molekularbiologische Methoden	43
2.2.1.	Plasmidpräparation	43
2.2.2.	Elektrophoretische Trennung von Plasmid-DNA	43
2.2.3.	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter Zellen	44
2.2.4.	Transformation von <i>E. coli</i>	44
2.2.5.	Insertion eines Stop-Codons: pQE60-artM	44
2.3.	Kultivierung von <i>G. stearothermophilus</i>	45
2.3.1.	Anzucht und Lagerung	45
2.3.2.	Hochzelldichtefermentation (HZDF) von <i>G. stearothermophilus</i>	46
2.3.3.	Lipidextraktion	47

2.4.	Herstellung rekombinanter Proteine	47
2.4.1.	Expressionsuntersuchungen	47
2.4.2.	Herstellung von ArtP	48
2.4.2.1.	Herstellung von ArtP ohne Isotopen-Markierung	48
2.4.2.2.	Markierung von ArtP mit [^{13}C , ^{15}N]-Threonin, -Tyrosin und -Prolin	48
2.4.2.3.	Uniforme Markierung von ArtP mit den Isotopen ^{13}C , ^{15}N und ^2H	49
2.4.3.	Herstellung von ArtMP	49
2.4.3.1.	Herstellung von ArtMP ohne Isotopen-Markierung	49
2.4.3.2.	Uniforme Markierung von ArtP mit den Isotopen ^{13}C , ^{15}N und ^2H	49
2.4.4.	Expression von <i>artM</i>	50
2.4.5.	Herstellung von ArtJ	50
2.5.	Präparation rekombinanter Proteine	51
2.5.1.	Reinigung von ArtP	51
2.5.2.	Reinigung von ArtMP	51
2.5.3.	Assemblierung von ArtP und ArtM	52
2.5.4.	Reinigung von ArtJ	52
2.6.	Biochemische Analyse-Methoden	53
2.6.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
2.6.2.	SDS-Gelelektrophorese zur Trennung der Proteine	53
2.6.3.	ATPase-Aktivitätstest	54
2.7.	Kristallographische Methoden	54
2.7.1.	3D-Kristallisation von ArtP	54
2.7.2.	2D-Kristallisation des Transportkomplexes ArtMP	55
2.8.	Transmissions-Elektronenmikroskopie	56
2.9.	Lösungs-NMR-Spektroskopie	56
2.9.1.	^1H -Spektren von Lipidextrakten	56
2.9.2.	1D- ^{31}P -Spektren	56
2.9.3.	2D- ^1H - ^{15}N -HSQC/TROSY-Experimente mit ArtP _{DCN}	57
2.9.4.	HNCACB- und HN(CO)CACB-Experimente mit ArtP _{DCN}	57
2.10.	Festkörper-NMR-Spektroskopie	57
2.10.1.	^{13}C - ^{13}C -PDSD-Experimente	57
2.10.2.	2D- ^1H - ^{15}N -Korrelationsexperimente	58
2.11.	Datenanalyse	58
3.	Ergebnisse	59
3.1.	Detektion von Konformationsänderungen in ArtP mit Hilfe selektiv markierter Aminosäuren	61

3.1.1.	Untersuchungen an 3D-Kristallen von ArtP	61
3.1.1.1.	Präparation des selektiv markierten ArtP _{TYP}	61
3.1.1.2.	3D-Kristallisation von ArtP _{TYP}	62
3.1.1.3.	¹³ C- ¹³ C-Korrelationen von ArtP _{TYP}	64
3.1.1.4.	ArtP _{TYP} in verschiedenen nukleotid-gebundenen Zuständen	65
3.1.2.	Untereinheiten-spezifische Markierung des Transmembran komplexes ArtMP	67
3.1.2.1.	2D-Kristallisation von ArtMP mit Lipiden aus <i>G. stearothermophilus</i>	71
3.1.2.2.	¹³ C- ¹³ C-Korrelationen von ArtM(P _{TYP}) – im prähydrolytischen Zustand	72
3.1.2.3.	Unterschiede zwischen den 3D-Kristallen von ArtP _{TYP} und 2D-Kristallen von ArtM(P _{TYP})	74
3.2.	¹H-detektierte Festkörper-NMR-Spektroskopie an ArtMP und ArtP	76
3.2.1.	Herstellung deuterierter Lipide von <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	76
3.2.1.1.	Hochzelldichtefermentation mit <i>G. stearothermophilus</i>	77
3.2.2.	Markierung von ArtMP und ArtP mit den Isotopen ² H, ¹³ C und ¹⁵ N	82
3.2.3.	Präparation der NMR-Proben: 3D-Kristallisation und 2D-Kristallisation	83
3.2.4.	H/N-Korrelationen von ArtP _{DCN} , ArtMP _{DCN} und ArtM(P _{DCN})	85
3.2.4.1.	Vergleich der H/N-Korrelationen von ArtP in verschiedenen Präparationen	85
3.2.4.2.	H/N-Korrelationen von ArtM(P _{DCN}) mit verschiedenen Nukleotiden	89
4.	Diskussion	91
4.1.	Der ABC-Transporter ArtMP-J als Modellsystem für NMR- spektroskopische Untersuchungen	92
4.2.	Herstellung protonierter und deuterierter Lipide aus <i>G. stearothermophilus</i>	93
4.3.	Spezifische Markierung der Untereinheiten und <i>in vitro</i> Assemblierung von ArtMP	94
4.4.	Konformationsänderungen in ArtP durch Nukleotid-Bindung	96
4.4.1.	3D-kristalline Präparationen von ArtP _{TYP}	96
4.4.2.	Asymmetrie oder Symmetrie innerhalb des ArtP-Dimers	98
4.4.3.	Konformationsänderungen in ArtMP und ArtM(P) durch Nukleotid-Bindung	100
4.5.	Erste H/N-Korrelationen vom ABC-Transporter ArtMP	101

4.5.1. Detektion von Konformationsänderungen durch Nukleotid-Bindung in ArtM(P _{DCN})	103
Zusammenfassung	105
Summary	108
Literaturverzeichnis	111
Abkürzungsverzeichnis	123
Lebenslauf	125
Veröffentlichungen	126
Eidesstattliche Erklärung	128

1. Einleitung

Der proteinabhängige Transport von Molekülen verschiedenster Art über die Zytoplasmamembran ist eine Grundvoraussetzung für das Leben einer Zelle, in Prokaryoten und Eukaryoten gleichermaßen. Die membranintegralen Transportsysteme gewährleisten die Aufnahme essentieller Nährstoffe, den Export und Import von Signalmolekülen für die interzelluläre Kommunikation, die Sekretion von Stoffwechselprodukten sowie von Toxinen zur Abwehr. Man unterscheidet zwischen passivem und aktivem Transport. Der passive Transport verläuft in Richtung des Konzentrationsgradienten, während beim energieabhängigen, aktiven Transport Substrate gegen das Konzentrationsgefälle befördert werden. Überdies unterscheidet man zwischen primär und sekundär aktivem Transport. Beim sekundär aktiven Transport wird die Energie aus einem elektrochemischen Gradienten gewonnen, wohingegen beim primär aktiven die Energie direkt durch Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) oder Absorption von Licht erzeugt wird (Krämer, 1994; Saier *et al.*, 2000).

Die *ATP-binding cassette*-Transporter (ABC-Transporter) stellen die umfassendste Gruppe der primär aktiven Transporter dar. Sie nutzen die Energie aus der ATP-Hydrolyse für die unidirektionale Translokation diverser Substrate über biologische Membranen und sind in zahlreichen physiologischen Prozessen involviert. Einige Vertreter dieser Protein-Familie sind von großer medizinischer und pharmakologischer Bedeutung (Hyde *et al.*, 1990; Higgins *et al.*, 1992; Davidson *et al.*, 2008, Eitinger *et al.*, 2011).

1.1. ABC-Transporter

1.1.1. Physiologie und Pathophysiologie der ABC-Transporter

Die ABC-Transportsysteme sind in allen drei Reichen des Lebens vertreten und bilden eine der größten Familien homologer Proteine. Beispielsweise wurden im Genom verschiedener Stämme von *Escherichia coli* zwischen 52 und 83, in *Arabidopsis thaliana* mehr als 120 und im Menschen 48 ABC-Transporter identifiziert (Moussatova *et al.*, 2008; Sánchez-Fernández *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 2001). In Prokaryoten gibt es Import- und Exportsysteme, während in Eukaryoten im Wesentlichen Exporter bekannt sind.

In Prokaryoten ermöglichen ABC-Transporter den Import von Kohlenhydraten, Vitaminen, Aminosäuren, Peptiden, Ionen etc. und versorgen so die Zellen mit essentiellen Grundbausteinen. Darüber hinaus sind diese Proteine an Reaktionen auf das umgebende Milieu, z.B. der Chemotaxis, der Kommunikation in Biofilmen (*Quorum-Sensing*) und in der Stressantwort involviert. Einige bakterielle ABC-Transporter sind von großer medizinischer und pharmakologischer Relevanz. Beispielsweise sind sie für die Resistenz von Bakterien gegen antimikrobielle Substanzen verantwortlich.

Für den Menschen sind ABC-Transporter unter anderem für die Translokation von Gallensalzen (SPGP), von Peptiden im Rahmen der Antigenpräsentation (TAP1/2) sowie von Phospholipiden (ABCA1) von großer Bedeutung (Dean *et al.*, 2001). Weiterhin sind einige Vertreter dieser Proteinfamilie die Ursache von Erkrankungen wie Adrenoleukodystrophie (ALDP), Cystische Fibrose (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR) und der Stargardt-Makuladegeneration (ABCA4), die durch Mutationen in den entsprechenden Genen ausgelöst werden (Dean *et al.*, 2001; Kemp *et al.*, 2011; Tsybovsky *et al.*, 2010; Kirk and Wang 2011). Die sogenannten *Multi-Drug-Transporter* exportieren diverse Xenobiotika und bereiten dadurch große Probleme in der Tumor-Therapie. Der bekannteste Vertreter ist das P-Glykoprotein (oder MRP1), das eine Vielfalt von Cytostatika transportieren kann (Cascorbi, 2011). Die Zusammenfassungen von Higgins *et al.* (1992) und Eitinger *et al.* (2011) geben einen ausführlichen Überblick über die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von ABC-Transportern.

1.1.2. Aufbau der ABC-Transporter

Obgleich sich der ABC-Transporter durch hohe Diversität in ihrer Funktion und Substratspezifität auszeichnen, weisen sie viele Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer Architektur auf (Higgins *et al.*, 1986). Ihr Aufbau ist am Beispiel der Röntgenkristallstruktur des Molybdat/Wolframat-Importers aus *Archaeoglobus fulgidus* in Abbildung 1 dargestellt. Der Translokationskanal wird aus zwei Kopien der Transmembrandomänen (TMDs) gebildet, mit der je eine cytoplasmatische Nukleotidbindedomäne (NBD, ABC-Protein) entweder kovalent gebunden oder über eine Interaktionsfläche in Kontakt ist. Das NBD-Dimer bildet die energieliefernde Einheit des Transportkomplexes. Sowohl die TMDs als auch die NBDs können als Homo- oder Heterodimer vorliegen (Higgins, 1992). Zu den bakteriellen

Importsystemen gehört zusätzlich ein extrazelluläres Substratbindeprotein (SBP) (Boos & Lucht, 1996). Darüber hinaus treten einige Importsysteme im Verbund mit einem Porin auf, um die Diffusion der Substrate in den periplasmatischen Raum Gram-negativer Bakterien zu erleichtern (Nikaido & Vaara, 1985; Nikaido, 2003). Ein prominentes Beispiel ist LamB des Maltose-Transporters MalFGK₂ (Boos & Shuman, 1998).

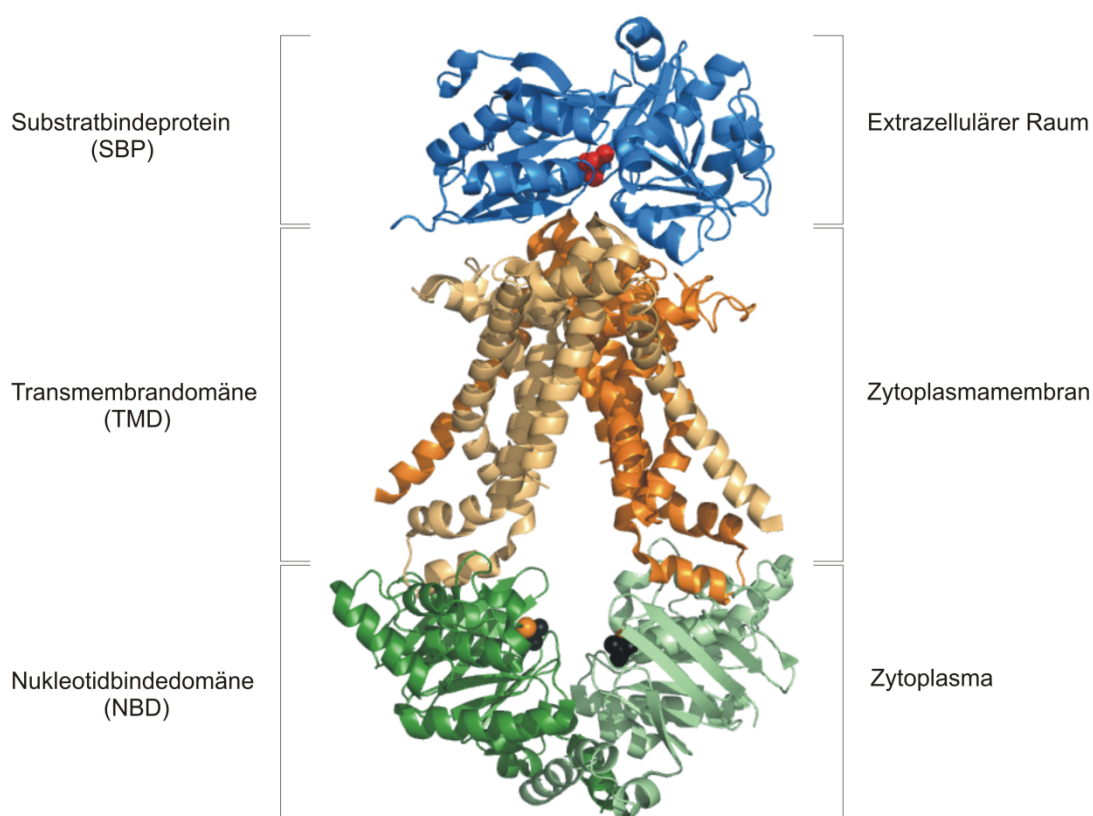


Abbildung 1: Röntgenkristallstruktur des ABC-Transporters ModBC-A aus *A. fulgidus* (Proteindatenbank (pdb): 2ONK; Hollenstein *et al.*, 2007). Die NBDs und die TMDs sind in grün bzw. orange dargestellt. Das Substratbindeprotein (blau) hat ein Wolframatmolekül (rot) gebunden und ist an den Transmembrankomplex assoziiert.

Bei Importern liegen die TMDs und NBDs meist als separate Polypeptidketten vor. Es sind aber auch Beispiele bekannt, bei denen entweder die Transmembrandomänen oder die ABC-Proteine fusioniert sind (Abb. 2A). Dagegen findet man unter den Exportsystemen sogenannte Halbtransporter, die durch eine Fusion der TMDs und NBDs gekennzeichnet sind, und Volltransporter, bei denen die NBDs und TMDs eine Polypeptidkette bilden (Abb. 2B; Eitinger *et al.*, 2011).

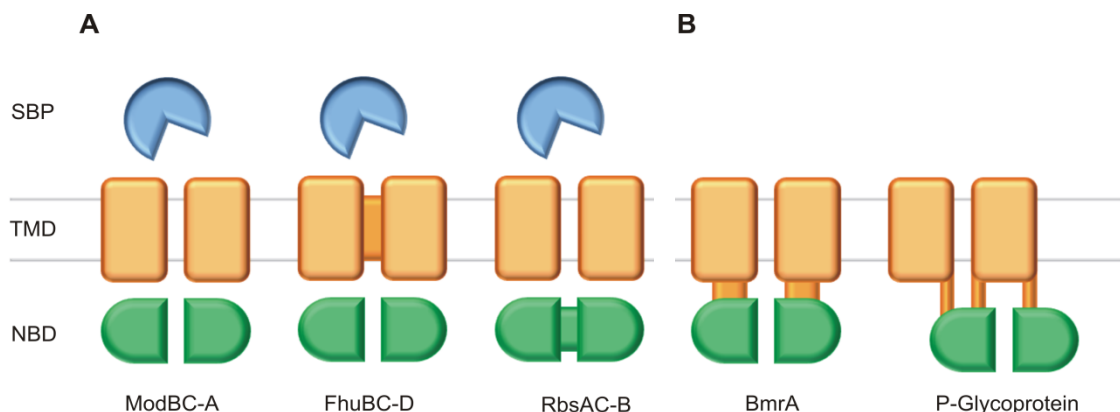


Abbildung 2: Domänenorganisation von ABC-Transportern. A) Prokaryotische Importsysteme: Die Untereinheiten liegen als separate Polypeptidketten vor, die TMDs oder die NBDs sind fusioniert. RbsAC-B transportiert Ribose, FhuBC-D Fe^{3+} -Hydroxamat und ModBC-A Molybdat/Wolfram. B) Die Exportsysteme können als Halbtransporter (BmrA, Multi-Antibiotikaresistenz) oder Volltransporter (P-Glycoprotein, *multi-drug*-Resistenz) organisiert sein.

Neben Import- und Exportsystemen existiert noch eine dritte Klasse von ABC-Proteinen, denen die Transmembrandomänen fehlen. Einige Vertreter sind in die Translation von mRNA und in DNA-Reparaturmechanismen involviert (Hopfner *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2008). Kürzlich wurden die ECF (*energy coupling factor*)-Transporter entdeckt, deren Architektur verschieden zu kanonischen ABC-Transportern ist (Rodinov *et al.*, 2006). Sie besitzen zwei ABC-Proteine und eine moderat konservierte Transmembranuntereinheit (T-Komponente). Die Substratspezifität wird durch die S-Komponente (*substrate capture protein*) vermittelt, welche in die Zytoplasmamembran eingelagert ist. Die Stöchiometrie ist unbekannt (Hebbeln *et al.*, 2007; Rodinov *et al.*, 2009; Eitinger *et al.*, 2011).

1.1.2.1. Die Substratbindeproteine der prokaryotischen ABC-Importsysteme

Die Substratbindeproteine sind verantwortlich für die Substratspezifität der prokaryotischen ABC-Importsysteme (Boos & Lucht, 1996). Sie binden Substrate wie z. B. Ionen, Zucker, Peptide und Aminosäuren mit hoher Affinität (K_D : 0,01 μM bis 0,1 μM) und führen sie dem membranintegralen Transportkomplex zu (Shilton, 2008; Wilkinson & Verschueren, 2003). Die SBPs bestehen aus zwei Domänen, die sowohl β -Faltblattstrukturen als auch α -helikale Bereiche besitzen. Die Zahl und Anordnung der Sekundärstrukturanteile bilden die Grundlage für die Unterscheidung von Typ I-

und Typ II-Substratbindeproteinen. Bei diesen beiden Klassen sind die Domänen durch eine Art Gelenk (*Linker-Region*) mit einander verbunden und formen so eine Bindetasche. Durch die Bindung des Substratmoleküls bewegen sich die beiden Domänen aufeinander zu und umschließen so das Substrat. Dieser Mechanismus wird in der Literatur mit der Venusfliegenfalle verglichen (Quioco & Ledvina, 1996; Sack *et al.*, 1989). Die 3D-Strukturen von ModA aus *Methanosarcina acetivorans* im offenen sowie im geschlossenen Zustand konnten mittels Röntgenkristallographie bestimmt werden (Abb. 3; Chan *et al.*, 2010). Aus den Strukturen wird deutlich, dass das Protein bei Substratbindung einer starken Konformationsänderung unterworfen ist. Ermöglicht wird diese große Änderung durch den flexiblen Linker, der die beiden Domänen miteinander verbindet. Das SBP BtuF des Vitamin B12-ABC-Transporters BtuCD aus *E. coli* ist ein Vertreter der Typ III-Substratbindeproteine. Diese besitzen statt eines flexiblen Gelenks zwischen den Domänen eine starre α -Helix. Der Mechanismus der Substratbindung folgt aber ebenso dem Modell der Venusfliegenfalle (Lawrence *et al.*, 1996; Kanadt *et al.*, 2006).

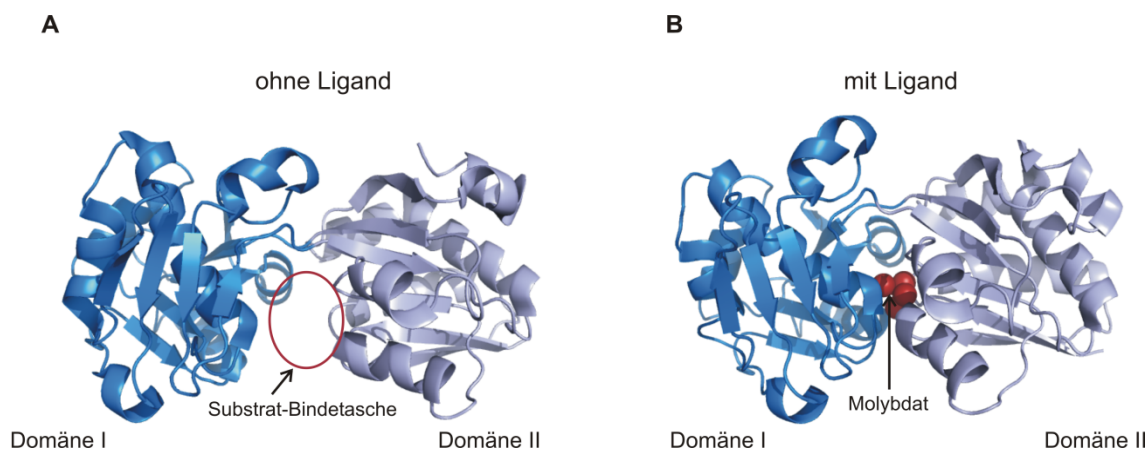


Abbildung 3: Röntgenkristallstrukturen von ModA in verschiedenen Konformationen. A) zeigt ModA ohne Liganden. Die Substratbindetasche ist offen (pdb: 3K6U, Chan *et al.*, 2010). B) ModA hat ein Molybdatmolekül (rot) gebunden (pdb: 3K6W, Chan *et al.*, 2010). Der Abstand der beiden Domänen ist hier im Vergleich zum offenen Zustand deutlich verringert.

In Gram-negativen Bakterien liegen die SBPs frei im Periplasma vor. Wohingegen die Substratbindeproteine von Gram-positiven Bakterien und Archaea N-terminal über einen Lipidanker in der Membran verankert sind. Bei einigen Archaea wurde auch eine α -Helix als Lipidanker beobachtet (van der Heide & Poolmann, 2002). Auch können die TMDs und SBPs miteinander fusioniert sein, so dass zwei oder sogar vier

Substratbindeproteine pro Transportkomplex vorkommen (Obis *et al.*, 1999; van der Heide & Poolmann, 2002; Biemanns-Oldewinkel *et al.*, 2006). Eine detaillierte Übersicht zur strukturellen Klassifizierung von Substratbindeproteinen wurde von Berntsson *et al.* (2010) zusammengestellt.

1.1.2.2. Die integralen Transmembrandomänen

Die Transmembrandomänen (TMDs) der ABC-Transporter sind im Vergleich zu den Nukleotidbindedomänen (NBD) kaum konserviert und noch wenig charakterisiert. Die geringe Sequenzkonservierung wird mit der hohen Substratspezifität der ABC-Transporter begründet. Eine TMD besteht aus 4 bis 10 Transmembranhelizes (TMHs), welche die Zytoplasmamembran durchspannen, wobei sowohl der C- als auch der N-Terminus in das Zytoplasma ragen (Boos & Lucht, 1996). Die TMHs sind durch intra- und extrazelluläre *Loops* verbunden. Die prokaryotischen Importsysteme werden nach der Anzahl der TMHs in Typ I und Typ II unterteilt (Locher, 2009). Typ I-Importer (z.B. Methionin-Transporter aus *E. coli*, MetI) besitzen 10-14 und Typ II-Transporter (z. B. BtuCD-F) bis zu 20 TMHs (Abb. 4).

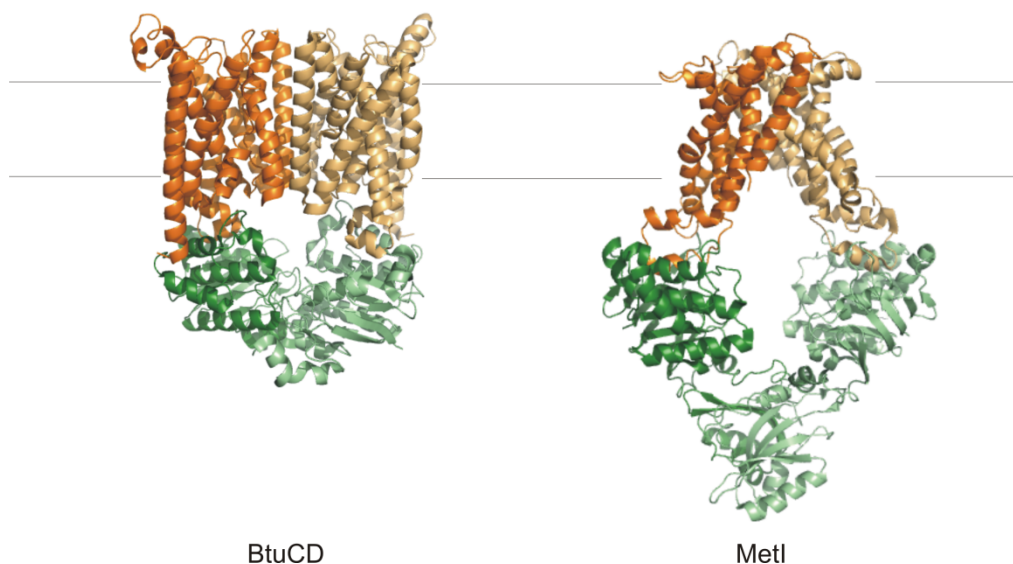


Abbildung 4: Vergleich von Typ I- und Typ II-Importer. Es sind die Kristallstrukturen von BtuCD (pdb: IL7V) und MetI (pdb: 3DHW) im nukleotidfreien Zustand abgebildet. Die TMDs sind in orange und die NBDs in grün dargestellt. Das NBD-Dimer ist in beiden Strukturen geöffnet. Jedoch gibt es deutliche Unterschiede in Zahl und Anordnung der TMHs.

Kopplungshelix einer TMD in die Grube eines NBD-Monomers ragt (pdb: 2ONK, Hollenstein *et al.*, 2007; Abb. 6). Das sogenannte EAA-Motiv konnte in Exportern nicht identifiziert werden. In Sav1866 wird der Kontakt zwischen NBD und TMD über einen *Loop* in der NBD vermittelt, der durch die Sequenz TEVGERG charakterisiert ist. Ähnliche Motive wurden auch in anderen Exportsystemen gefunden (Dawson & Locher, 2006; Jumpertz *et al.*, 2009).

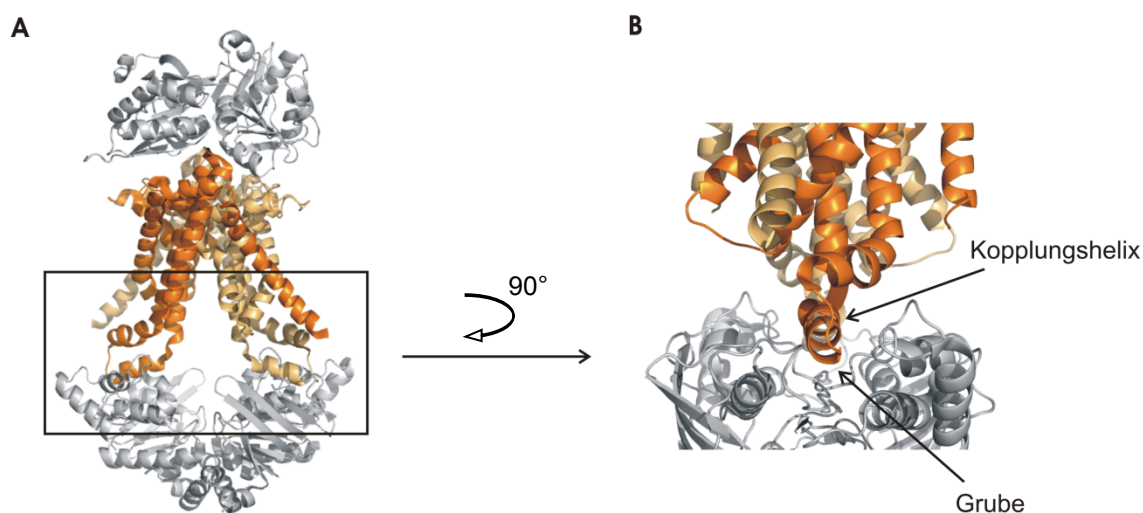


Abbildung 6: Interaktionsfläche der TMDs und NBDs des Molybat-Transporters ModBC-A (pdb: 2ONK, Hollenstein *et al.*, 2006). Der Kontaktbereich zwischen den Untereinheiten wurde aus der Struktur von ModBC-A (A) vergrößert und um 90° gedreht (B) abgebildet. Die TMDs sind in orange und die NBDs in grau dargestellt.

1.1.2.3. Die zytoplasmatischen Nukleotidbindedomänen

Die Nukleotidbindedomänen (NBDs, ABC-Proteine) sind in ABC-Importern sowie in -Exportern hoch konserviert und liefern durch ATP-Hydrolyse die Energie für den Transport von Substraten über die Zellmembran (Ames, 1992). Die Sequenzhomogenität beträgt für einige Vertreter mehr als 30 % (Abb. 7; Pinkett *et al.*, 2007). Hung *et al.* veröffentlichten 1998 mit HisP die erste Kristallstruktur einer Nukleotidbindedomäne. Danach folgten zahlreiche weitere Strukturen isolierter NBDs, die zusammen mit intensiven biochemischen Untersuchungen zum Verständnis der ABC-Proteine beigetragen haben.

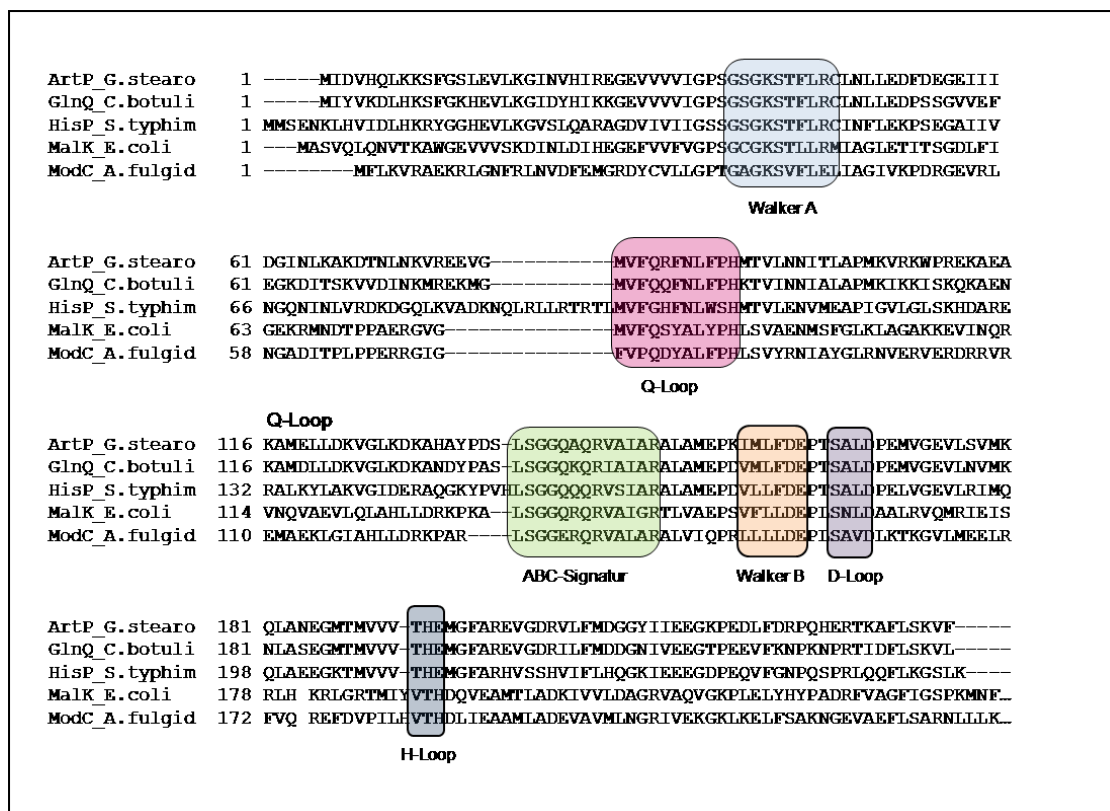


Abbildung 7: Sequenzvergleich ausgewählter ABC-Transportsysteme. Die konservierten Sequenzmotive sind farblich hervorgehoben. Die NBD-Sequenzen stammen aus: *Geobacillus stearothermophilus* (ArtP_G.stearo, acc. no. 3C41_K), *Clostridium botulinum* (GlnQ_C.botuli, acc. no. YP_001887464.1), *Salmonella typhimurium* (HisP_S.typhim, acc. no. AAA75581.1), *E. coli* (MalK_E.coli, acc. no. EGT70481.1) und *Archaeoglobus fulgidus* (ModBC-A.fulgid, acc. no. O30144.1).

Die NBDs zeichnen sich durch stark konservierte Sequenzmotive aus. Das Walker A-Motiv (GxxGxGKS/T, x kann ein beliebiger Aminosäurerest sein; Walker *et al.*, 1982) bildet einen Loop und stabilisiert über einen konservierten aromatischen Rest die Bindung des Adeninrings von ATP bzw. ADP in der Nukleotidbindetasche (Ambudkar *et al.*, 2006; Geourjon *et al.*, 2001). Das Lysin interagiert mittels Wasserstoffbrückenbindungen mit den Sauerstoffatomen der β - und γ -Phosphatgruppen vom ATP (Gaudet & Wiley, 2001; Verdon *et al.*, 2003). Das terminale Aspartat im Walker B-Motiv ($\phi\phi\phi\phi$ DE; ϕ ist ein aliphatischer Rest; Walker *et al.*, 1982) koordiniert den Kofaktor Mg^{2+} durch ein Wassermolekül. Dadurch wird die Geometrie des aktiven Zentrums des NBD-Dimers gebildet. Das Glutamat ist vermutlich als katalytische Base an der ATP-Hydrolyse beteiligt (Gaudet & Wiley, 2001; Verdon *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2007). Der Q-Loop verbindet die beiden Domänen der

NBDs und ist über ein konserviertes Glutamin an der Koordination des Mg^{2+} -Ions beteiligt. Weiterhin bilden die Q-Loops beider Monomere die Kontaktfläche im Dimer und sind an der Interaktion mit den TMDs während der Signaltransduktion beteiligt (Dawson *et al.*, 2007). Der H-Loop ist nach einem konservierten Histidinrest benannt, das mit dem γ -Phosphat des ATP interagiert (Chen *et al.*, 2003; Zaitseva *et al.*, 2005). Typisch für ABC-Proteine ist die Signatursequenz oder auch LSGGQ-Motiv genannt. Das dient der Identifizierung von Mitgliedern der ABC-Transporter-Superfamilie (Schneider & Hunke, 1998). Darüber hinaus ist dieses Motiv an der Koordination des γ -Phosphates von ATP involviert und so ein essentieller Bestandteil der Nukleotidbindetasche (Fetch & Davidson, 2002). Der D-Loop (SALD-Motiv) befindet sich C-terminal vom Walker A-Motiv und ist an der Kommunikation der beiden NBD-Monomere im Dimer beteiligt (Jumpertz *et al.*, 2009).

Die NBDs sind aus einer katalytischen und einer α -helikalen Domäne aufgebaut, welche durch zwei flexible Loops verbunden sind (Abb. 8 B). Während die katalytische Domäne ein in ATPasen verbreitetes Strukturmotiv ist, kommt die α -helikale Domäne nur in NBDs von ABC-Transportern vor (Davidson *et al.*, 2008; Eitinger *et al.*, 2011). Die Röntgenkristallstrukturen z.B. von BtuCD (Locher *et al.*, 2002), des *Drug*-Exporters Sav1866 (Dawson & Locher, 2006) und des putativen Metalchelator-Importers HI1470 (Pinkett *et al.*, 2007) zeigen, dass die katalytische Domäne aus sechs β -Faltblättern und zwei α -Helizes besteht. Die α -helikale Domäne setzt sich aus drei bis vier α -Helizes zusammen (Davidson *et al.*, 2008). Bei einigen ABC-Transportern wie z.B. MalFGK₂-E ist die NBD um eine C-terminale Domäne erweitert, die eine regulatorische Funktion besitzt (Boos & Böhm, 2000; Gerber *et al.*, 2008).

Im Dimer sind die Monomere invers zueinander ausgerichtet (*head-to-tail*). Dabei bilden das Walker A-Motiv des einen Monomers und die ABC-Signatur des anderen Monomers zwei Bindetaschen für die ATP-Moleküle (Abb. 8 B; Smith *et al.*, 2002). Durch die Bindung von ATP schließt sich das Dimer wie eine Pinzette (Chen *et al.*, 2003). Das ist notwendig, da die ATP-Hydrolyse nur im geschlossenen Dimer stattfindet. Für die Bindung von ATP in den Nukleotidbindetaschen im Inneren des Dimers wurde eine positive Kooperativität nachgewiesen (Davidson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997).

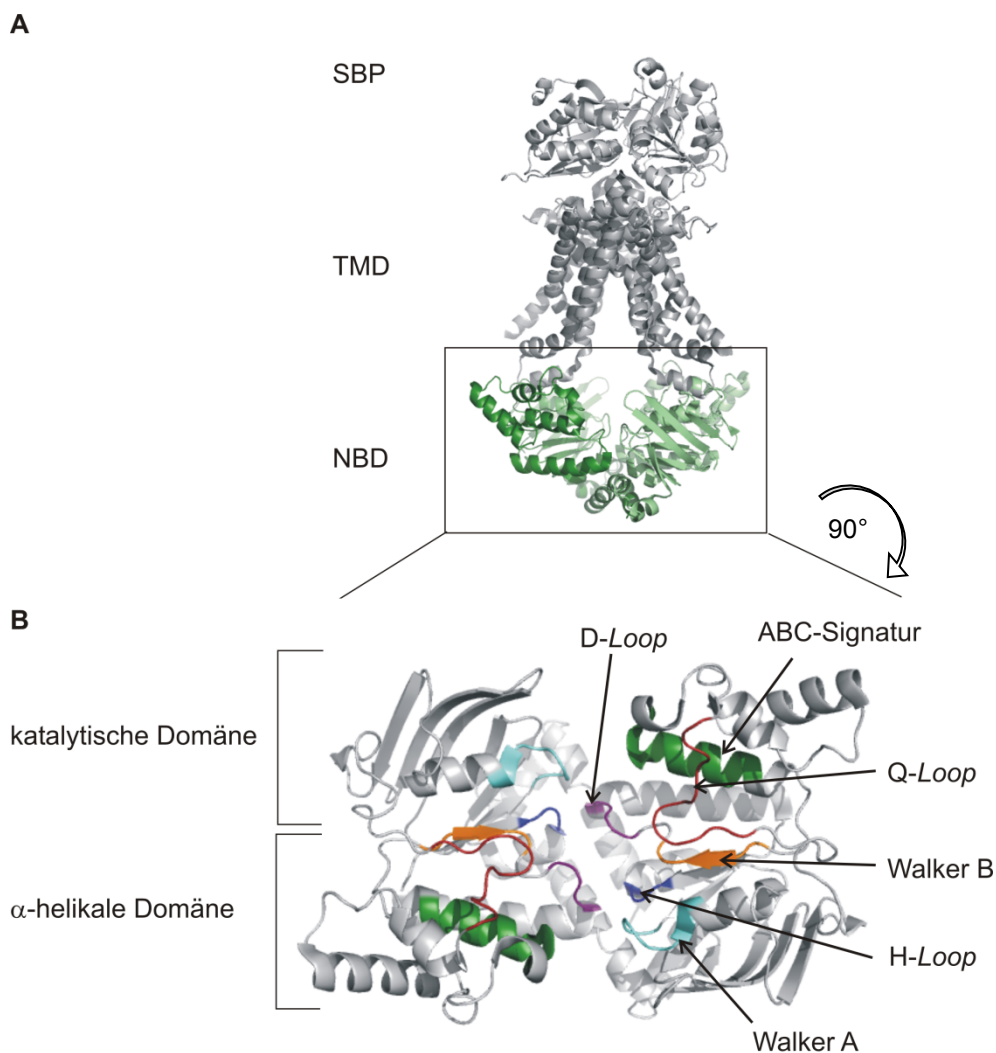


Abbildung 8: Röntgenkristallstruktur des ABC-Transporters ModBC-A mit Darstellung der konservierten Sequenzmotive in den Nucleotidbindedomänen. (A) Vorderansicht des Molybdat/Wolframat-ABC-Importers im nukleotid-freien Zustand (pdb: 2ONK; Hollenstein *et al.*, 2007). In grün sind die NBDs hervorgehoben. (B) Das NBD-Dimer ist um 90° aus der Struktur des kompletten Transportsystems herausgedreht. Im linken Monomer sind die katalytische und die α-helikale Domäne gekennzeichnet. Im rechten Monomer wurden das Walker A- (Cyan) und das Walker B-Motiv (Orange), der D-Loop (Violett), die ABC-Signatur (Grün), der Q- (Rot) und der H-Loop (Blau) markiert.

1.1.3. Der Transport- und ATP-Hydrolysezyklus der ABC-Transporter

Das erste ABC-Transportsystem, das 1982 von Higgins *et al.* beschrieben wurde, war der Histidin-Importer HisQMP₂. Seitdem wurden eine Vielzahl weiterer Vertreter dieser Proteinfamilie identifiziert und intensiv biochemisch charakterisiert. Es wurden Kristallstrukturen zahlreicher NBDs und SBPs veröffentlicht, die erste strukturelle Informationen lieferten. In den letzten zehn Jahren konnten dann auch

Kristallstrukturen vollständiger ABC-Transportsysteme gelöst werden. Sie boten erstmals den Einblick in die Konformation der membranintegralen Transportkomplexe in verschiedenen Stadien des Transportzyklus und bilden die Basis des aktuellen Modells für die Translokation von Substraten. Grundlegend für Exporter sowie Importer ist die Kopplung der ATP-Hydrolyse mit Konformationsänderungen der TMDs, wodurch der Translokationskanal entweder zum Zellinneren bzw. zum extrazellulären Raum geöffnet wird (Davidson & Chen, 2004; Davidson *et al.*; 2008; Locher *et al.*, 2009). Dieses Modell wird auch als *basic two-state scenario* bezeichnet.

Auf Grundlage der Röntgenkristallstrukturen von ModBC-A und besonders von MalFGK₂-E wurde ein möglicher Mechanismus für den Translokationsprozess von Typ I-Importern postuliert (Abb. 9; Locher, 2009; Bordignon *et al.*, 2010). Danach bindet das beladene Substratbindeprotein an den Transmembrankomplex, der zum Zellinneren geöffnet ist. Bei Bindung von ATP öffnet sich das TMD-Dimer zum extrazellulären Raum, und das Substrat wird von dem SBP in den Translokationskanal entlassen. Durch ATP-Hydrolyse werden die TMDs wieder zum Zellinneren geöffnet, so dass das Substrat in das Zytoplasma diffundieren kann. Nach Dissoziation von SBP, ADP und Phosphat befindet sich der Transporter wieder in der Ausgangskonformation. Kürzlich publizierte Röntgenkristallstrukturen von MalFGK₂-E in intermediären Zuständen unterstützen dieses Modell (Oldham & Chen, 2011a/b).

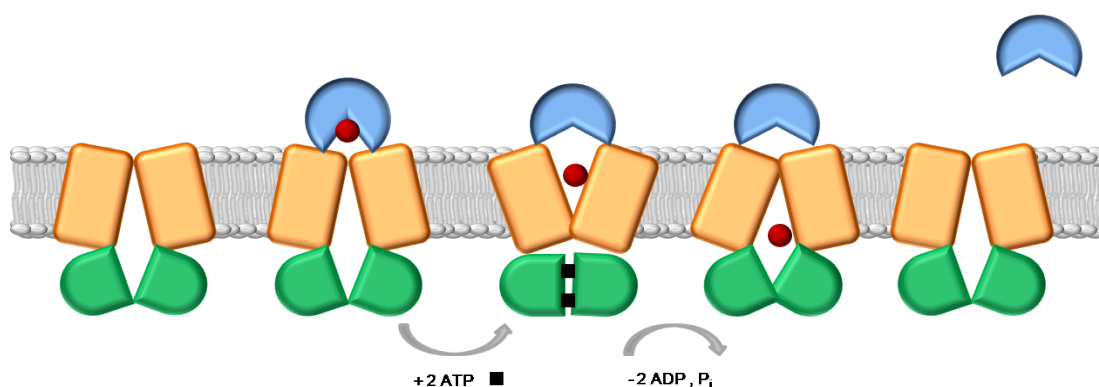


Abbildung 9: Translokationsmechanismus von Typ I-Importsystemen. Das SBP ist blau, das Substrat in rot, die TMDs sind orange und die NBDs grün dargestellt (nach Locher, 2009).

Aufgrund der hohen Konservierung der NBDs geht man davon aus, dass die ATP-Bindung und -Hydrolyse in allen ABC-Transportern nach einem ähnlichen Prinzip abläuft. Es werden zwei mögliche Mechanismen kontrovers diskutiert. Beim sogenannten *processive clamp*-Modell ist in jeder der beiden Bindetaschen des NBD-Dimers ein ATP-Molekül gebunden. Beide ATP-Moleküle werden sequentiell hydrolysiert bevor das NBD-Dimer dissoziiert (Janas *et al.*, 2003; van der Does *et al.*, 2006; Jumpertz *et al.*, 2009). Das *alternating site*-Modell geht ebenfalls von einem NBD-Dimer mit zwei gebundenen ATP-Molekülen aus. Nach der Hydrolyse des einen ATP öffnet sich das Dimer nur im Bereich der entsprechenden Bindetasche und ADP wird durch neues ATP ersetzt, worauf sich das Dimer wieder schließt. Anschließend erfolgt die Hydrolyse von ATP in der zweiten Bindetasche (Senior *et al.*, 1995; Sharma & Davidson, 2000; Oloo & Tieleman, 2004; Tomblin *et al.*, 2005; Jones & George, 2009; Jumpertz *et al.*, 2009). Beide Modelle beruhen auf den Untersuchungen verschiedener Proteine, so dass für verschiedene Transporter unterschiedliche Mechanismen möglich sind.

Die biochemische und röntgenkristallographische Charakterisierung von MalFGK₂-E in seinen verschiedenen Intermediärzuständen hat detaillierten Einblick in den Transportmechanismus des Maltose-Transporters gegeben. Es ist jedoch notwendig, vergleichbare Studien an ABC-Transportern aus verschiedenen Unterfamilien durchzuführen. Erst dann wird es möglich sein, den komplexen Translokationszyklus und damit das Zusammenspiel zwischen den einzelnen Untereinheiten für die verschiedenen Unterfamilien zu verstehen. Dabei sollten zusätzlich zu biochemischen Methoden und Röntgenkristallographie auch Techniken, wie die Festkörper-NMR-Spektroskopie eingesetzt werden, die die strukturelle und funktionelle Untersuchung von Membranproteinen in nativen Lipiden ermöglichen.

1.2 Der ABC-Transporter ArtMP-J aus *G. stearothermophilus*

In dieser Arbeit soll das ABC-Transportsystem ArtMP-J des thermophilen Bakteriums *Geobacillus stearothermophilus* mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie strukturell untersucht werden. ArtMP-J ist für den Import polarer Aminosäuren über die Zytoplasmamembran verantwortlich und gehört zur PAAT (*polar amino acid transporter*)-Familie.

1.2.1 Der thermophile Organismus *G. stearothermophilus*

Das thermophile Bakterium *G. stearothermophilus* wurde erstmals von Donk (1920) beschrieben. *G. stearothermophilus* wurde aus heißen Quellen aber auch aus Ölfeldern isoliert (Donk, 1920, Nazina *et al.*, 2001; Afzal *et al.*, 2011). Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 55 °C und 65 °C, wobei Temperaturen bis 72°C toleriert werden (Donk, 1920; Buswell & Twomey, 1975). Charakteristisch für *G. stearothermophilus* ist die Zusammensetzung der Lipidmembranen, wie sie sonst nur in kokkoiden Organismen vorkommt (Fischer, 1977; Schäffer *et al.*, 2002). Phosphatidylethanolamin (40-50 %) und Phosphatidylglycerin bilden den Hauptanteil der Phospholipide. Weiterhin besitzt der Organismus einen hohen Anteil eines seltenen Glykocardiolipins (Card, 1973; Jurado *et al.*, 1991; Schäffer *et al.*, 2002). Die Barriere zum extrazellulären Medium bildet eine Schicht aus Glykoproteinen (*surface layer*), die der Zytoplasmamembran aufgelagert ist (Schäffer *et al.*, 2002a) Die Lipidzusammensetzung thermophiler Organismen steht in direktem Zusammenhang mit hohen Temperaturen im umgebenden Milieu (Jurado *et al.*, 1991; Schäffer *et al.*, 2002b).

1.2.2 Aufbau von ArtMP-J

In Abbildung 10 ist der schematische Aufbau von ArtMP-J dargestellt. Der Translokationskanal wird aus zwei Transmembranuntereinheiten ArtM gebildet. Diese sind nicht kovalent an je eine Nukleotidbindedomäne ArtP assoziiert und liefern durch ATP-Hydrolyse die Energie für die Substrattranslokation. Zu dem Transportkomplex gehört das Substratbindeprotein ArtJ. Da der ABC-Importer ArtMP-J aus einem thermophilen Organismus stammt, ist seine ATPase-Aktivität bei 60 °C am höchsten (Fleischer *et al.*, 2005).

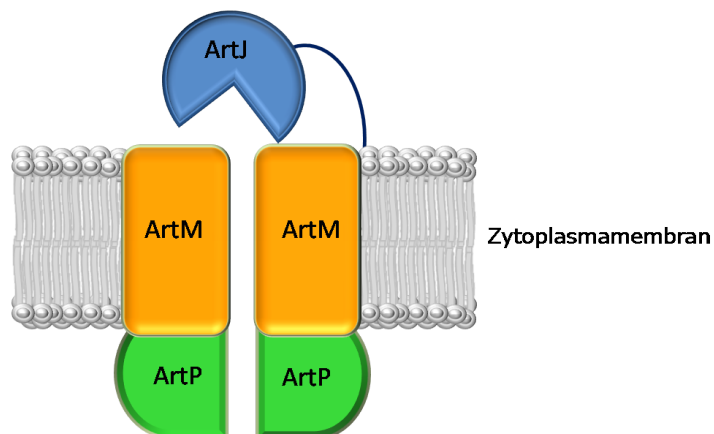


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des ABC-Transportsystems ArtMP-J aus *G. stearothermophilus*. ArtMP-J ist aus je zwei Kopien der TMD ArtM (orange) und der NBD ArtP (grün) aufgebaut. Das SBP ArtJ (blau) ist mit einem Lipidanker in der Zyttoplasmamembran befestigt.

ArtJ besitzt N-terminal einen Lipidanker, der das SBP in der Membran fixiert. Dabei ist das N-terminale Cystein mit einer Fettsäure fusioniert (Fleischer *et al.*, 2005). Bindungsstudien haben gezeigt, dass ArtJ die größte Affinität zu Arginin (39 nM) hat, aber auch Histidin (420 nM) und Lysin (490 nM) binden kann (Vahedi-Faridi *et al.*, 2008). ArtJ wurde im Komplex mit Arginin (pdb: 2Q2A; Abb. 11), Histidin (pdb: 2PVU) bzw. Lysin (pdb: 2Q2C) kristallisiert (Vahedi-Faridi *et al.*, 2008). Aus der 3D-Struktur in Abbildung 16 geht hervor, dass ArtJ aus zwei Domänen aufgebaut ist, die über einen flexiblen *Loop* (*Linker-Region*) verbunden sind. Zwischen den beiden Domänen wird die Bindetasche ausgebildet, in der das Substrat eingeschlossen wird (Vahedi-Faridi *et al.*, 2008).

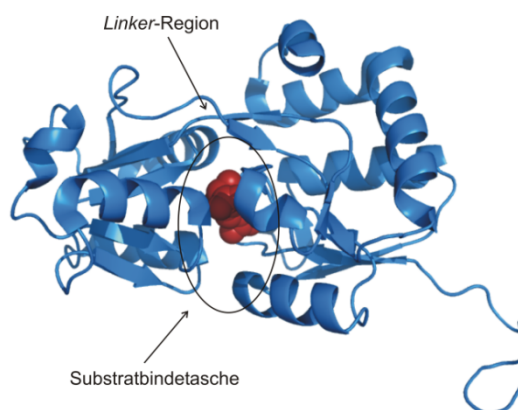


Abbildung 11: Kristallstruktur des extrazellulären Substratbindeproteins ArtJ. (pdb: 2Q2A, Vahedi-Faridi *et al.*, 2008). ArtJ liegt im geschlossenen Zustand vor und hat Arginin (rot) in der Substratbindetasche eingeschlossen.

Die Transmembrandomäne ArtM ist noch wenig erforscht. Mit Hilfe von Sekundärstrukturanalysen wurden für ArtM fünf Transmembranhelizes vorhergesagt, die über *Loops* miteinander verbunden sind (Eckey, 2009; Schneider *et al.*, 2011). Auf der Basis von Mutationsexperimenten sowie Vergleichen mit der Kristallstruktur von ModBC-A konnten Interaktionsbereiche zwischen ArtJ und dem extrazellulären *Loop 2* von ArtM nachgewiesen werden. An den Wechselwirkungen sind geladene Aminosäurereste beteiligt (Vahedi-Faridi *et al.*, 2008; Eckey *et al.*, 2010b).

Von der Nukleotidbindedomäne ArtP wurden Röntgenkristallstrukturen ohne Nukleotid (pdb: 2OUK), im prähydrolytischen (Adenylyl-Imidodiphosphat (AMPPNP)/Mg²⁺, pdb: 3C41; Abb. 12) und posthydrolytischen (ADP/Mg²⁺, pdb: 2OLJ; ADP- γ -S; pdb: 2Q0H) Zustand gelöst (Thaben *et al.*, 2008/2009).

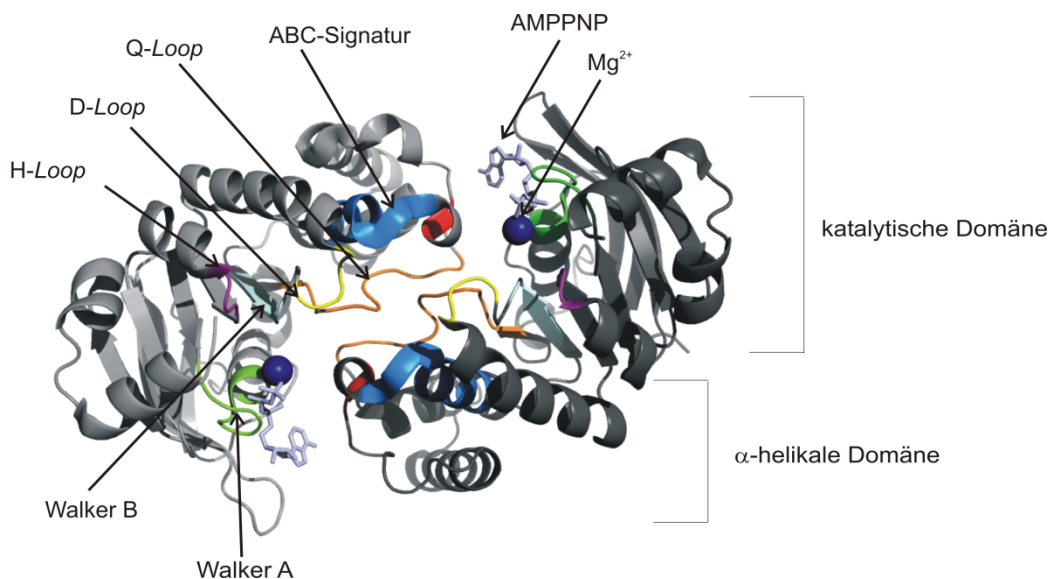


Abbildung 12: Röntgenkristallstruktur des ArtP-Dimers mit AMPPNP/Mg²⁺. (pdb 3C41, Thaben *et al.*, 2009). Die konservierten Sequenzmotive wurden farblich hervorgehoben.

Bis heute konnte keine Kristallstruktur von ArtMP oder einem anderen Mitglied der PAAT-Familie gelöst werden. So liegt die strukturelle Organisation der Transmembrandomänen noch immer im Dunkeln. Es gibt erst wenige Informationen über die Kommunikation der Untereinheiten während des Transportzyklus (Eckey *et al.*, 2010a; Eckey *et al.*, 2010b; Vahedi-Fahridi *et al.*, 2008; Lange, 2008; Lange *et al.*, 2010).

1.3 Strukturuntersuchung von Membranproteinen

In Eukaryoten kodieren 20% bis 30% des Genoms für Membranproteine (Wallin & Von-Heijne, 1998). Viele Vertreter sind in pathophysiologische Prozesse involviert und daher für die pharmakologische Forschung von besonderer Bedeutung. Jedoch sind bis heute nur ca. 1 % der in der Protein-Daten-Bank (<http://www.pdb.org>) enthaltenen Proteinstrukturen von Membranproteinen (Patching, 2011). Das liegt unter anderem daran, dass die Herstellung von Membranproteinen in ausreichend großen Mengen auf Grund ihrer hydrophoben Eigenschaften meist schwierig ist. Zum einen führt die rekombinante Überexpression, besonders in heterologen Expressionssystemen, häufig zur Aggregation der hydrophoben Proteine im Zytoplasma. Zudem ist die Herstellung eukaryotischer Membranproteine in prokaryotischen Zellen nochmals schwieriger, da

essentielle postranslationale Prozesse fehlen. Zum anderen müssen die Proteine mittels Detergenzien aus der Zytoplasmamembran präpariert oder aus Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) solubilisiert werden. Dabei hängt die Stabilität und Aktivität der Proteine stark von der Wahl eines geeigneten Detergenz ab (Seddon *et al.*, 2004). Somit ist die Etablierung effizienter Expressions- und Präparationsprotokolle häufig sehr langwierig.

Membranproteine werden heute mittels Röntgenkristallographie, Elektronenmikroskopie sowie Kernspinresonanzspektroskopie strukturell untersucht. Die Röntgenkristallographie ist bisher die erfolgreichste Methode in der Strukturaufklärung von Membranproteinen. Dabei sind 3D-Kristalle mit hoher Ordnung und Qualität die Voraussetzung. Die Kristallisation von Membranproteinen in Detergenzmizellen wird aber z.B. durch die geringere Stabilität der Membranproteine, der Heterogenität in der Probe, durch hoch flexible *Loops* sowie durch eingeschränkte Protein-Protein-Kontakte erschwert (Cherezov *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2007; Seddon *et al.*, 2004). Mit Hilfe von Antikörpern kann die hydrophile Oberfläche der Membranproteine erhöht werden, so dass die Bildung von Kristallkontakten erleichtert wird (Hunte & Michel, 2002). Zur Stabilisierung und Reduktion der Flexibilität werden häufig Mutationen eingeführt oder ungeordnete *Loops* gegen weniger flexible Konstrukte ersetzt (Lieberman *et al.*, 2011; Cherezov *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2007). Seit einiger Zeit werden weiterentwickelte Methoden, wie die Kristallisation in kubischen Lipidphasen und Bizellen, eingesetzt, um so die Stabilität der Membranproteine durch die Interaktion mit Lipidmolekülen zu erhöhen (Landau *et al.*, 1996; Zhang, *et al.*, 2003; Faham *et al.*, 2002; Cherezov *et al.*, 2007; Cherezov *et al.*, 2011). Mittels kubischen Lipidphasen konnten z.B. die Strukturen von mikrobiellen Rhodopsinen (Landau *et al.*, 2003) sowie des β -adrenergen G-Protein gekoppelten Rezeptors (Cherezov *et al.*, 2007) gelöst.

Die Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) ist eine außerordentlich vielseitige Technik zur strukturellen und dynamischen Charakterisierung von Proteinen mit atomarer Auflösung und trägt so zum Verständnis chemischer sowie biologischer Prozesse bei. Zudem erlaubt die NMR-Spektroskopie die Analyse von Protein-Protein-, Protein-Lipid- und Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Membranproteine können sowohl in Detergenzlösung als auch in Lipiden untersucht werden. Dafür sind zwei Ansätze möglich, zum einen die Lösungs-NMR- und zum anderen die Festkörper-NMR-Spektroskopie (nachfolgend mit Lösungs-NMR bzw. Festkörper-NMR abgekürzt).

Lösungs-NMR wird seit vielen Jahren für die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Proteinen verwendet. Momentan liegt das Größenlimit zur vollständigen Auflösung von Proteinstrukturen bei 300 bis 400 Aminosäureresten (Nietlispach & Gautier, 2011). Größere Moleküle führen zu stark verbreiterten NMR-Signalen, da durch langsamere, molekulare Rotationen (*molecular tumbling*) der Einfluss der Anisotropie dipolarer Kopplungen größer wird. Hohe Magnetfelder von bis zu 23,5 Tesla und die Etablierung von Methoden zur Perdeuterierung von Proteinen sowie die Entwicklung von TROSY-basierten Experimenten machen auch die Untersuchung von Membranproteinen in Detergenzmizellen möglich (Pervushin *et al.*, 1997; Gardner & Kay, 1998). So konnten 3D-Strukturen von Membranproteinen wie z. B. des humanen Anionenkanals VDAC, des humanen pentameren Phospholambans, des outer membrane protein G (OmpG) aus *E. coli*, des sensory rhodopsin II (SRII) aus *N. pharaonis*, des PagP aus *E. coli* und des disulfide bond formation protein B (DsbB) aus *E. coli* gelöst werden (Abb. 13; Hiller *et al.*, 2008; Liang & Tamm, 2007; Gautier *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2008). Wie schon zuvor beschrieben, stellen Detergenzmizellen nur eine grobe Näherung zu nativen Lipidmembranen dar und beeinflussen die Stabilität und Funktionalität von Proteinen. Die Solubilisierung von Membranproteinen in Mizellen oder sogenannten *nanodiscs* ermöglichen heute deren Untersuchung in einer Lipidumgebung (Glück *et al.*, 2009; Raschle *et al.*, 2009).

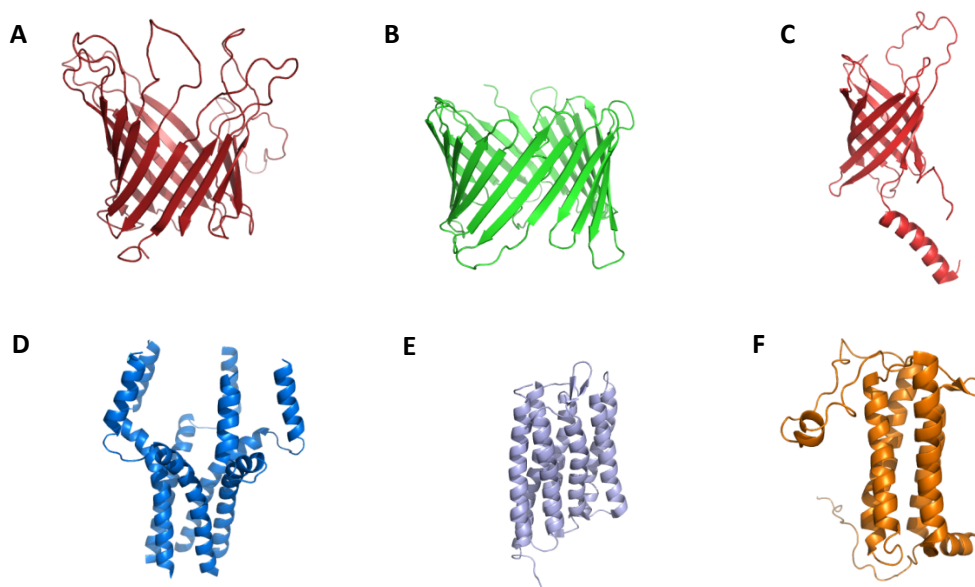


Abbildung 13: Beispiele mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie bestimmter 3D-Strukturen von Membranproteinen. Die Proteine wurden in Detergenzmizellen präpariert. A) OmpG (pdb: 2JQY), B) VDAC (pdb: 2K4T), C) PagP (pdb: 1MM5); D) Phospholamban (pdb: 1ZLL); E) Sensory rhodopsin II (pdb: 2KSY), F) DsbB (pdb: 2K73).

Festkörper-NMR-Spektroskopie wird seit einigen Jahren intensiv zur Untersuchung von unlöslichen Proteinaggregaten, wie Amyloidfibrillen sowie Membranproteinen in nativen Lipiden eingesetzt (McDermott, 2009; Tycko, 2011; Judge & Watts, 2011). In den letzten zehn Jahren konnten 3D-Strukturen mikrokristalliner und fibrillärer Proteine sowie membranintegraler Peptide (Abb. 14) bestimmt werden (z. B. Castellani *et al.*, 2002, Jaroniec *et al.*, 2004; Ferguson *et al.*, 2006; Franks *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2009; Jehle *et al.*, 2010; van Melckebeke *et al.*, 2010).

Die molekulare Rotation ist in Festkörpern eingeschränkt und so tragen orientierungsabhängige dipolare Kopplungen zur Signalverbreiterung bei. Die anisotropen Effekte können durch die schnelle Rotation der Probe reduziert werden. Dabei befindet sich die Rotationsachse in einem Winkel von $54,7^\circ$ relativ zum externen Magnetfeld (Andrew *et al.*, 1958; Hennel & Klinowski, 2005). Diese Technik wird als magic angle spinning (MAS) bezeichnet. Zusätzlich wurden Pulssequenzen zur Unterdrückung heteronuklearer Kopplungen entwickelt (Übersicht: Laws *et al.*, 2002). Meist werden beide Techniken in Kombination verwendet und ermöglichen die Aufnahme hochaufgelöster Spektren. Alternativ können Membranen auf Glasplatten immobilisiert werden und uniaxial zum externen Magnetfeld orientiert werden. Dieses

Verfahren kann sowohl unter statischen als auch MAS-Bedingungen angewendet werden und hat zur Strukturaufklärung membranintegrityaler Peptide beigetragen (Abb. 14; Übersicht: De Angelis *et al.*, 2005, Varga & Watts, 2008).

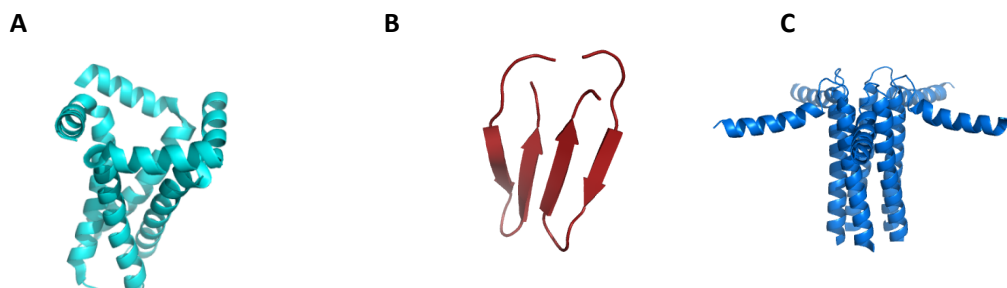


Abbildung 14: Beispiele für mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie bestimmter 3D-Strukturen von membranintegrityalen Peptiden und Proteinen. A) Influenza M2-Kanal (Residuen 22-63, pdb:2L0J; Sharma *et al.*, 2010), B) Protegrin-1 (pdb: 1ZY6; Mani *et al.*, 2006), C) humanes Phospholamban (pdb: 2KYV, Verardi *et al.*, 2011).

Die Untersuchung von Membranproteinen in nativen Lipiden stellt hohe Anforderungen an die Probenpräparation, da die Qualität der Festkörper-NMR-Spektren von der Homogenität der Probe abhängt. Denn unterschiedliche Konformationen des Proteins in der Probe führen zur Aufspaltung oder Verbreiterung von Signalen. Membranproteine wurden als 3D-Kristalle sowie eingebettet in native Lipidmembranen als 2D-Kristalle und in Proteoliposomen untersucht (Lorch *et al.*, 2005; Mason *et al.*, 2004; Etzkorn *et al.*, 2007; Hiller *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2010). Die lokale Ordnung solcher Präparationen ist ausreichend, so dass im Gegensatz zur Röntgenkristallographie Nano- und Mikrokristalle mit geringerer Qualität verwendet werden (Pauli *et al.*, 2000; Martin & Zilm, 2003; Marulanda *et al.*, 2004).

Die Untersuchung großer Membranproteine ist in der Festkörper-NMR noch keine Routine. Daher müssen oft individuelle Präparations- und Markierungsstrategien angewendet und entwickelt werden. So wurden bis heute nur wenige Membranproteine, wie z.B. Proteorhodopsin, EmrE (*multidrug*-Transporter), VDAC, Phospholamban, OmpG und *Sensory rhodopsin II* mittels Festkörper-NMR untersucht (Shi *et al.*, 2009; Argarwal *et al.*, 2007; Hiller *et al.*, 2005; Seidel *et al.*, 2008; Hiller *et*

al., 2005; Etkorn *et al.*, 2007). Kürzlich wurde die Struktur des humanen Phospholamban durch Kombination von Lösungs- und Festkörper-NMR aufgeklärt (Abb. 14; Verardi *et al.*, 2011).

1.3.1 Physikalische Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Das Phänomen der Kernmagnetresonanz wurde von Bloch und Purcell (1946) experimentell nachgewiesen. Das Verfahren beruht auf Wechselwirkungen zwischen Radiowellen und Atomkernen in einem starken externen Magnetfeld. Die Kerne (Spins) müssen ein magnetisches Moment besitzen. Für die Untersuchung von Proteinen werden bevorzugt die Kerne ^1H , ^{15}N , ^{13}C und ^{31}P verwendet, da deren Spinquantenzahl $\frac{1}{2}$ beträgt. Befinden sich die Spins in einem starken Magnetfeld (B_0), präzedieren diese mit ihrer Larmorfrequenz (ω_0) um den Feldvektor des Magnetfeldes B_0 . Diese Kerne treten in zwei Zuständen auf, $+\frac{1}{2}$ und $-\frac{1}{2}$, deren Energien in Abwesenheit eines externen Magnetfeldes gleich sind. Durch Einstrahlung von Radiofrequenzpulsen (ν_1) werden Übergänge zwischen den entsprechenden Energieniveaus induziert (Abb. 15; Übersicht: Friebolin, 2006, Chary & Govil, 2008).

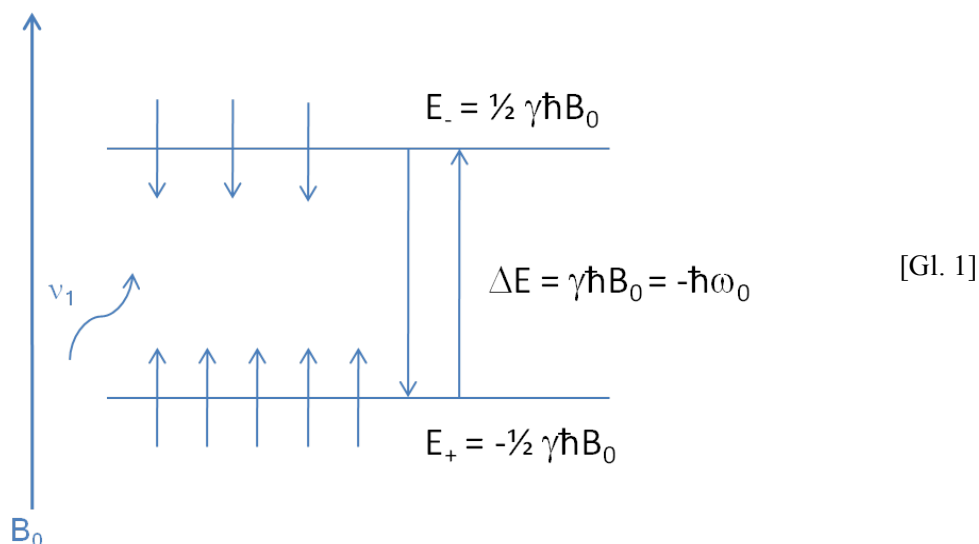


Abbildung 15: Das Phänomen der Kernspinresonanz. γ ist das gyromagnetische Verhältnis eines Kerns und h das Plancksche Wirkungsquantum.

Die detektierte Resonanzfrequenz eines Spins ist abhängig von der Stärke des Magnetfeldes. Daher wurde zur Vereinfachung die „chemische Verschiebung“ (δ) mit der Einheit *parts per million* (ppm) eingeführt (Gl. 2).

$$\delta = \frac{\nu_{\text{Probe}} - \nu_{\text{Referenz}}}{\nu_{\text{Referenz}}} \quad [\text{Gl. 2}]$$

1.3.2 Isotopen-Markierung von Membranproteinen

Die natürliche Häufigkeit der für die Untersuchung von Proteinen hauptsächlich verwendeten Kerne ist mit Ausnahme von ^1H - und ^{31}P zu gering, um Spektren mit ausreichender Sensitivität zu erhalten (Tab. 1).

Tabelle 1 Natürliche Häufigkeit ausgewählter Isotope. (Chary & Govil, 2008)

Isotop	Spinquantenzahl I	Natürliche Häufigkeit [%]
^1H	$\frac{1}{2}$	99,985
^2H	1	0,015
^{13}C	$\frac{1}{2}$	1,11
^{15}N	$\frac{1}{2}$	0,37
^{31}P	$\frac{1}{2}$	100,00

Aus diesem Grund werden die Proteine zumeist während der rekombinanten Expression in *E. coli* oder in zellfreien Expressionssystemen mit den Isotopen ^{13}C , ^{15}N und ^2H angereichert. Aber auch die heterologe Expression in eukaryotischen Zelllinien, welche ein größeres Repertoire von posttranslationalen Prozessen bereitstellen, finden immer häufiger Anwendung (Übersicht: Renault *et al.*, 2010). Zur uniformen Markierung von Proteinen mit ^{13}C und ^{15}N in *E. coli* werden als einzige Kohlenstoffquelle ^{13}C -Glukose oder ^{13}C -Glycerin und als Stickstoffquelle ^{15}N -

Ammoniumsalze verwendet (McIntosh & Dahlquist, 1990). Zusätzlich können die Proteine deuteriert werden. Dieses Verfahren wird sowohl in der Lösungs-NMR als auch in der Festkörper-NMR zur Untersuchung makromolekularer Strukturen verwendet (LeMaster, 1990; Gardner & Kay, 1998; 1992; Renault *et al.*, 2010; Reif, 2010). Dazu wird im Anzuchtsmedium für *E. coli* Wasser durch Deuteriumoxid ersetzt, wobei ein Deuterierungsgrad von 70 % bis 80 % erreicht wird. Um einen möglichst hohen Deuterierungsgrad zu erhalten, wird zusätzlich deuterierte Glukose verwendet, wodurch sich der Eintrag von Protonen durch die Glukose verringert (LeMaster, 1990; Lian & Middleton, 2001).

Die uniforme Markierung von großen Proteinen führt jedoch häufig zu starken Signalüberlagerungen im NMR-Spektrum. So können alternativ [1-¹³C]-Glukose, [1,3-¹³C]-, [2-¹³C]- sowie [3-¹³C]-Glycerin als Kohlenstoffquelle eingesetzt werden. Dieses Verfahren führt zur Reduktion der Signalanzahl und zu einer charakteristischen Verteilung von Kreuzsignalen für bestimmte Aminosäuregruppen (Higman *et al.*, 2009, Hong *et al.*, 1999; Renault *et al.*, 2010). Die selektive Markierung bestimmter Aminosäuretypen ist eine weitere Strategie die Anzahl der Signale zu verringern. Dadurch wird die gezielte Untersuchung topologisch interessanter Regionen möglich (Jelinski *et al.*, 1985; Mason *et al.*, 2004; Lange *et al.*, 2010).

1.3.3 Ausgewählte Methoden in der Festkörper-NMR-Spektroskopie

Protonen sind wegen ihres hohen gyromagnetischen Verhältnisses die sensitivsten Kerne und werden aus diesem Grund in der Lösungs-NMR intensiv genutzt. Jedoch bilden Protonen ein starkes Netzwerk homo- und heteronuklearer dipolarer Kopplungen, die zu ¹H-Linienbreiten im kHz-Bereich führen. Daher werden in der konventionellen Festkörper-NMR hauptsächlich die Kerne ¹⁵N und ¹³C verwendet. Dennoch wurde in den letzten Jahren eine Strategie entwickelt, die die Detektion von Protonen mit hoher Auflösung in der Festkörper-NMR möglich macht. Diese wird im zweiten Teil des Abschnitts vorgestellt.

¹⁵N und ¹³C haben ein geringeres gyromagnetisches Verhältnis als ¹H und lange T₁-Relaxationszeiten, wodurch lange Aquisitionzeiten erforderlich werden, um ausreichende Signalintensitäten sowie spektrale Auflösung zu erhalten (Drechsler & Separovic, 2003). Aus diesem Grund wird die Kreuzpolarisation (CP, *cross polarisation*) zum Magnetisierungstransfer von einem stark polarisierten Kern (meist

Protonen) auf einen schwach polarisierten Kern (^{15}N oder ^{13}C) durch den Raum über dipolare Kopplungen verwendet (Pines *et al.*, 1972). Durch die heteronukleare Entkopplung von Protonen während der Aquisition werden schließlich hochaufgelöste ^{13}C - oder ^{15}N -Signale erhalten. Die Kombination aus MAS, CP und heteronuklearer Entkopplung bildet die Grundlage der protonenverstärkten NMR-Spektroskopie und findet daher in vielen Pulssequenzen (z.B. PDS, DARR, NCA, NCO) Anwendung (Szeverenyi *et al.*, 1982; Takegoshi *et al.*, 2001; Baldus *et al.*, 1998).

Die Zuordnung der Signale im NMR-Spektrum zur entsprechenden Aminosäure in der Polypeptidkette ist die Grundvoraussetzung für die strukturelle Untersuchung von Proteinen. Hierfür können zunächst zweidimensionale ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen, basierend auf *proton driven spin diffusion* (PDS) oder *dipolar assisted rotational resonance* (DARR) aufgenommen werden (Abb. 16). Bei dieser Technik wird das stark koppelnde Protonennetzwerk in der Probe ausgenutzt, um die Spindiffusion (Mischzeit) zwischen ^{13}C -Kernen, die sich in räumlicher Nähe befinden, zu ermöglichen. Abhängig von der Länge der Mischzeit werden C-Atome eines Spinsystems (kurze Mischzeit) oder weiter voneinander entfernter Kerne (lange Mischzeit) korreliert (Szeverenyi *et al.*, 1982; Takegoshi *et al.*, 2001). Experimente mit kurzen Mischzeiten ermöglichen so die Zuordnung der charakteristischen ^{13}C -chemischen Verschiebungen von Aminosäuretypen (Ulrich *et al.*, 2008). Durch die Verwendung von Experimenten mit langen Mischzeiten können interresiduale Kontakte identifiziert werden, welche Informationen für die Zuordnung und die Strukturaufklärung beinhalten (Abb. 16).

Zur sequentiellen Zuordnung des Proteinrückgrates werden heteronukleare Korrelationsexperimente (^{15}N - ^{13}C) zur Verbindung von Spinsystemen eingesetzt. So wird mittels NCA das Stickstoffatom mit dem $\text{C}\alpha$ des selben Aminosäurerestes (i) und mit NCO das Stickstoffatom mit dem Carbonyl-Kohlenstoff des vorherigen Restes (i-1) korreliert (Abb. 16; Baldus *et al.*, 1998). Diese Experimente können zur Zuordnung der Seitenketten erweitert werden (NCACX, NCOCX; Pauli *et al.*, 2001).

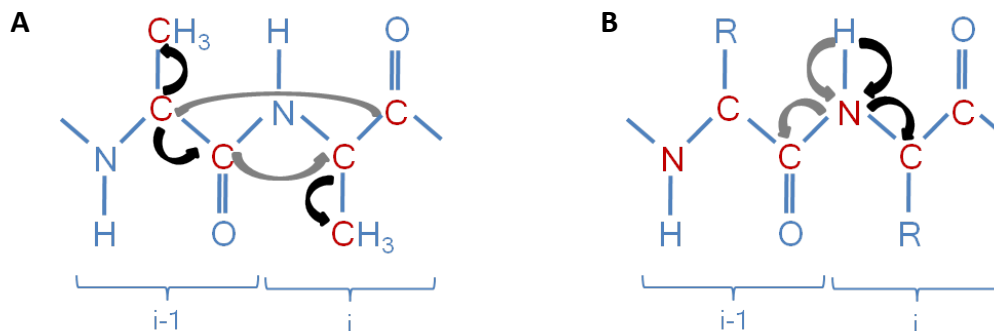


Abbildung 16: Schematische Darstellung homo- und heteronuklearer Korrelationsexperimente. A) PDSD/DARR-basierte ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen mit kurzen (schwarz) und langen (grau) Mischzeiten. Die stark involvierten Protonen wurden der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet. B) NCA (schwarz) und NCO (grau) Korrelationen. R ist eine beliebige Seitenkette.

Wie zuvor beschrieben wurden Protonen in der Festkörper-NMR lange nur zur Übertragung von Magnetisierung auf andere Kerne verwendet. In den letzten Jahren wurden zwei Strategien entwickelt, die die starken dipolaren Kopplungen der Protonen reduzieren. Zum einen ist es möglich hoch aufgelöste ^1H -detektierte NMR-Spektren mittels hoher MAS-Rotationsfrequenzen von 40 kHz bis 70 kHz aufzunehmen (Zhou *et al.*, 2007; Holland *et al.*, 2010). Alternativ dazu können die ^1H - ^1H -dipolaren Kopplungen durch Reduktion der Protonendichte in der Probe unterdrückt werden (Übersicht: Reif, 2010). Dazu werden alle nichtaustauschbaren Protonen während der rekombinanten Expression in *E. coli* durch Deuteriumatome ersetzt. Anschließend wird ein Teil der austauschbaren Deuterone wieder gegen Protonen ausgetauscht (Morcombe *et al.*, 2005; Chevelkov *et al.*, 2006; Linser *et al.*, 2007). Der optimale Protonierungsgrad liegt nach Akbey *et al.* (2010) zwischen 30% und 40%. Diese Markierungsstrategie in Kombination mit MAS macht es möglich klassische Lösungs-NMR-Experimente wie HNCA, HNCOC und HNCACB (Kay *et al.*, 1990; Grzesiek & Bax, 1992; Wittekind & Müller, 1993) unter MAS-Bedingungen von festen Proben aufzunehmen (Linser *et al.*, 2008; Reif, 2010). Bei diesen Methoden kann die Magnetisierung sowohl mittels CP als auch mittels *Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer* (INEPT) übertragen werden. INEPT vermittelt den Magnetisierungstransfer über skalare Kopplungen, also chemische Bindungen (Morris & Freeman, 1979). So wurden diese Techniken erfolgreich für die Zuordnung des Proteinrückgrates der α -Spektrin SH3-Domäne verwendet (Linser *et al.*, 2008). Darüber hinaus haben Linser *et al.* (2011) erfolgreich

^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren mit hoher Auflösung von den Membranproteinen OmpG und Bacteriorhodopsin aufgenommen.

1.4 Festkörper-NMR-Spektroskopie am ABC-Transporter ArtMP-J

Festkörper-NMR wurde in der Vergangenheit nur selten zur strukturellen Untersuchung von ABC-Transportsystemen herangezogen. Die Hauptursache dafür ist das große Molekulargewicht der Transportproteine. Die ersten mittels Festkörper-NMR untersuchten Proteine sind Homodimere wie das LmrA aus *L. lactis* und ArtMP-J aus *G. stearothermophilus* (Mason *et al.*, 2004; Hellmich *et al.*, 2008; Siarheyeva *et al.*, 2007; Lange, 2008; Lange *et al.*, 2010).

Am Beispiel von LmrA wurde mittels Deuterium-Festkörper-NMR der Einfluss der ATP-Bindung und -Hydrolyse auf die Mobilität der NBDs untersucht (Siarheyeva *et al.*, 2007, Lorch *et al.*, 2005). Weiterhin konnte die Kinetik der ATP-Hydrolyse durch LmrA mit zeitaufgelöster ^{31}P -Festkörper-NMR bestimmt werden (Hellmich *et al.*, 2008).

Erste Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen am ABC-Transporter ArtMP-J wurden von Lange (2008) durchgeführt. Darin wurde die isolierte NBD ArtP sowie der vollständige Transmembrankomplex ArtMP selektiv mit den Aminosäuren [^{13}C , ^{15}N]-Threonin, -Tyrosin und -Prolin (TYP) und mittels Festkörper-NMR als 3D-kristalline (ArtP_{TYP}) bzw. 2D-kristalline Präparationen (ArtMP_{TYP}) untersucht. Die Spektren beider Präparationen zeigten eine gute Auflösung der einzelnen Signale, wodurch es möglich war die Aminosäuren (AS) Tyr 133/ 213, Pro 134/ 163 und Thr 164 von ArtP zuzuordnen. Die AS Tyr 133 und Pro 134 sind dabei von besonderem Interesse, da sie sich direkt vor der ABC-Signatur in der Nukleotidbindetasche von ArtP befinden und somit als Monitore für Konformationsänderungen in Festkörper-NMR-Untersuchungen während des Translokationszyklus verwendet werden können (Abb. 17). So konnten mit Hilfe von ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsexperimenten an 3D-kristallinem ArtP ohne Nukleotid als auch mit ATP deutliche Änderungen der chemischen Verschiebungen für die Reste Pro 134 und Tyr 213 gezeigt werden. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob ATP möglicherweise während des Kristallisationsprozesses hydrolysiert wurde.

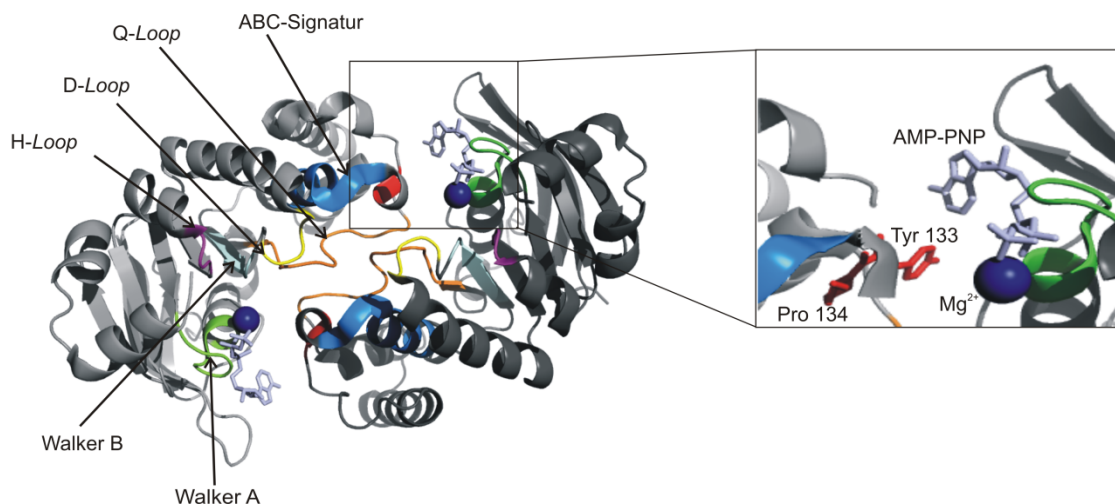


Abbildung 17: Röntgenkristallstruktur des ArtP-Dimers mit AMPPNP/Mg²⁺ (pdb 3C41, Thaben *et al.*, 2009). In A) ist das ArtP-Dimer dargestellt und die konservierten Sequenzmotive wurden farblich markiert. B) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt einer der beiden Nucleotidbindetaschen im ArtP-Dimer. Die Aminosäurereste Tyr 133 und Pro 134 sowie das Nucleotid AMPPNP und das Magnesiumion sind hervorgehoben.

Die polycistronische Expression von *artMP* stellt hinsichtlich der Häufigkeit verschiedener Aminosäuretypen im Proteinkomplex (Tab. 2) ein Problem für die Auswertung der gewonnenen NMR-Daten dar, da diese zu starken Signalüberlagerungen führt. Versuche zur Trennung der Untereinheiten in ArtMP mit chaotropen Agenzien und die anschließende Reassemblierung einer markierten und einer unmarkierten Untereinheit, waren nicht erfolgreich (Lange, 2008).

Tabelle 2 Häufigkeit ausgewählter Aminosäuren in ArtMP.

Aminosäuretyp	ArtMP	ArtM	ArtP
Alanin	37	21	16
Leucin	53	29	24
Phenylalanin	28	16	12
Glycin	35	16	19
Serin	25	15	10

1.5 Motivation und Zielstellung

ABC-Transporter sind in mutationsbedingte Erbkrankheiten involviert oder bewirken die Resistenz von Bakterien gegenüber Antibiotika. Ein medizinisch besonderes Problem stellt ihre Rolle beim Export von Xenobiotika dar. Der molekulare Mechanismus der Kopplung von Substrattranslokation und ATP-Bindung bzw. -Hydrolyse ist bis heute nicht im Detail verstanden. Dabei sind insbesondere die Rolle der Lipidumgebung, die Veränderung des Translokationskanals bzw. der Nukleotidbindedomänen und die Identifizierung von Substratbindestellen im TMD-Dimer von Interesse.

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Entwicklung verschiedener Konzepte zur strukturellen Untersuchung von ABC-Transportern mittels Festkörper-NMR unter Verwendung von ArtMP-J aus *G. stearothermophilus* als Modellsystem. Den Ausgangspunkt bildet die Arbeit von Lange (2008). Darin wurden sowohl die isolierte cytoplasmatische NBD ArtP als auch der vollständige Transmembrankomplex ArtMP selektiv mit bestimmten Aminosäuren ^{13}C , ^{15}N -markiert, um Konformationsänderungen durch ATP-Bindung zu verfolgen (Abschn. 1.4). Im Zuge dieser Arbeit sollen diese Untersuchungen weitergeführt werden. Dabei soll ArtP allein als auch im Komplex mit ArtM in verschiedenen Konformationen während der ATP-Hydrolyse charakterisiert werden.

Um eine bessere Trennung der NMR-Signale von ArtP und ArtM im aktiven Transportkomplex zu erreichen, erfordert dies die Herstellung eines Transmembrankomplexes ArtMP, welcher aus einer markierten und einer unmarkierten Untereinheit zusammengesetzt ist. So soll ein Präparationsprotokoll entwickelt werden, das die separate Herstellung der Membranuntereinheit ArtM und deren Assemblierung (*in vitro*) mit ArtP zu einem funktionalen Proteinkomplex ermöglicht, der anschließend in native Lipide rekonstituiert werden kann.

Die Festkörper-NMR-Spektren von großen, uniform ^{13}C , ^{15}N -markierten Proteinkomplexen wie ArtMP zeigen meist starke Signalüberlagerungen, so dass die Auswertung der NMR-Daten erschwert wird (Abschn. 1.4). Anhand der α -Spektrin SH3-Domäne wurde gezeigt, dass ^1H -detektierte Festkörper-NMR-Spektren mit ähnlicher Auflösung wie in der Lösungs-NMR erhalten wurden (Abschn. 1.3.3). Mit Einführung der Protonen als zusätzliche Dimension werden so zum einen die Dispersion der chemischen Verschiebungen verbessert und zum anderen Dreifachresonanz-Experimente möglich, wie sie in der Lösungs-NMR routinemäßig verwendet werden.

Damit kann die sequentielle Zuordnung der Signale im NMR-Spektrum vereinfacht werden.

Daraufhin soll in einem weiteren Ansatz getestet werden, inwieweit diese Methode zur strukturellen Untersuchung von ArtMP eingebettet in native Lipide geeignet ist. Dafür soll das Verfahren der reduzierten Protonendichte durch Deuterierung der Proteine verwendet und auf den Membranproteinkomplex angewendet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme, Chemikalien, Materialien und Geräte

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe), Biomol (Hamburg) und VWR International (Darmstadt) in höchst möglicher Reinheit bezogen. Die Detergenzien wurden von Glycon Biochemicals (Luckenwalde), das Sojamehlpepton von Oxoid Ltd. (Basingstoke, Hampshire, England), das Säulenmaterial Superdex 75 für die Gelfiltration von Amersham Biosciences (Little Chalfont, GB), das TALON-Material für die Affinitätschromatographie von BD Biosciences Clontech (Palo Alto, USA), die gepackten 1ml His Gravi Trap™ Nickel-Sepharosesäulen und PD10 Sephadex™ G-25 von GE-Healthcare Biosciences AB (Uppsala, Schweden) bezogen. Die uniform ¹³C-, ¹⁵N-markierten Aminosäuren wurden von Cambridge Isotopes und Spectra Stable Isotopes (Columbia, USA), ¹³C-Glukose, d7-¹³C-Glukose, ¹⁵N-Ammoniumchlorid und Deuteriumoxid von Euroisotop (Saint-Aubin Cedex, Frankreich), Cambridge Isotopes (Andover, MA, USA), Sigma-Aldrich/ISOTEC (München) geliefert. Das Zubehör für die Protein-Kristallisation stammte von der Firma Hampton Research (Laguna Niguel, USA). Für die Amplifikation von DNA wurden Enzyme und Chemikalien der Firmen New England Biolabs (Schwalbach), Novagen/Merck (Darmstadt) und Invitrogen (Darmstadt), für die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen das *Montage DNA Gel Extraction Kit* von Millipore (Bedford, USA) und für die Reinigung von Plasmid-DNA das NucleoSpin® Plasmid Kit von Macherey & Nagel (Düren) verwendet.

Für die Zellernte und Proteinreinigung wurden folgende Zentrifugen verwendet:

Beckman Coulter, Brea, CA mit den Rotoren Avanti® J25.50 und JLA10.500

Ultrazentrifuge Optima™ TLX mit dem Rotor TLA45

Ultrazentrifuge Optima™ LE80K mit den Rotoren 45Ti und 70.1 Ti

Weitere Geräte werden in den entsprechenden Abschnitten angeführt.

2.1.2 Oligonukleotide, Plasmide und Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biotex (Berlin) bezogen.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide für Mutagenese (von der Firma Biotex, Berlin)

Bezeichnung	Sequenz
ArtMSTOP-fw35	5'-GAA-GTA-TTC-AAC-CCA-ATA-GAG-ATC-TCA-TCA-CCA-TC-3'
ArtMSTOP-rev35	5'-GAT-GGT-GAT-GAG-ATC-TCT-ATT-GGG-TTG-AAT-ACT-TC-3'

Tabelle 4 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pVL4-P1	<i>artP</i> aus <i>G. stearothermophilus</i> auf pET46 Ek/LIC, N-terminaler 6x His-Tag, T7 Promotor, Amp ^R	Lange <i>et al.</i> , 2010
pRF2	<i>artMP</i> aus <i>G. stearothermophilus</i> auf pQE60 C-terminaler 6x His-Tag, T5 Promotor, Amp ^R	Fleischer <i>et al.</i> , 2005
pSS1	<i>artJ</i> aus <i>G. stearothermophilus</i> auf pET15b N-terminaler 6x His-Tag, T7 Promotor, Amp ^R	Vahedi-Faridi <i>et al.</i> , 2008
pVE15	<i>artM</i> aus <i>G. stearothermophilus</i> auf pQE60 C-terminaler 6x His-Tag, T5 Promotor, Amp ^R	Eckey <i>et al.</i> , 2010b
pQE60- <i>artM</i>	<i>artM</i> aus <i>G. stearothermophilus</i> auf pQE60 Stop-Codon nach <i>artM</i> , 6x His-Tag, T5 Promotor, Amp ^R	diese Arbeit

Tabelle 5 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5α	F ⁻ φ80 <i>lac</i> 15 D(<i>lacZY A-argF</i>) U169 <i>recA1 hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺) <i>phoA supE44 λ thi1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
JM109	<i>e14'</i> (<i>mcrA</i>) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺) <i>supE44 relA1 D(lac-proAB)</i> F' <i>traD36 proAB lacI^q lacZDM15</i>]	Yanish-Peron <i>et al.</i> , 1985; Stratagene
BL21(DE3)	F ⁻ <i>lon ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal λ</i> (DE3)	Studier & Moffat, 1986; Novagen
Rosetta(DE3)pLysS	F ⁻ <i>lon ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal (dcm) λ</i> (DE3) pRARE(Cm ^R) pLysS(Cm ^R)	Novagen
<i>G. stearothermophilus</i>		
DSM 13240	Wildtyp	DSMZ; Nazina <i>et al.</i> , 2001

2.1.3 Verwendete Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Das LB-Medium setzte sich aus 1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt und 1 % NaCl zusammen. Die LB-Kultur-Platten enthielten zusätzlich 1,5 % Agar-Agar (Miller, 1972).

Das 32Y-Medium bestand aus 3,2 % Hefeextrakt, 0,8 % Pepton und 0,58 % NaCl (Sambrook *et al.*, 1989).

Das TB-Medium (Terrific Broth) wurde aus 1,2 % Pepton, 2,4 % Hefeextrakt, 72 mM K_2HPO_4 , 17 mM KH_2PO_4 , and 0,4 % Glycerin hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989). Der pH-Wert der Medien wurde mit NaOH auf 7,3 eingestellt.

Zur Herstellung von autoinduzierenden Medien wurden nach Studier (2005) dem 32Y-Medium 0,5 % Glycerin, 0,05 % Glukose, 0,2 % Laktose und dem TB-Medium 0,05 % Glukose sowie 0,2 % Laktose zugesetzt.

Das grundlegende M9-Minimalmedium enthielt 51 mM Na_2HPO_4 , 15 mM KH_2PO_4 , 8,5 mM NaCl, 1 mM $MgSO_4$, 0,3 mM $CaCl_2$, 4,4 μ M Thiamin, 6,1 μ M Biotin, 0,1 mM EDTA, 33 μ M $FeSO_4$, 3,7 μ M $ZnCl_2$ und 0,6 μ M $CuSO_4$. Zusätzlich wurde das Medium mit weiteren Spurenelementen (50 μ M $FeCl_3$, 10 μ M $MnCl_2$, 10 μ M $ZnSO_4$, 2 μ M $CoCl_2$, 2 μ M $CuCl_2$, 2 μ M $NiCl_2$, 2 μ M Na_2MoO_4 , 2 μ M $NaSeO_3$ und 2 μ M H_3BO_3) angereichert (Studier, 2005). Als Kohlenstoffquelle wurde D-Glukose und als Stickstoff-Quelle Ammoniumchlorid verwendet, wobei die eingesetzten Konzentrationen abhängig vom Experiment waren. Zur Herstellung des ^{13}C -, ^{15}N -, 2H - markierten Transportkomplexes ArtMP und der isolierten Untereinheit ArtP wurden 6 g $d7$ - ^{13}C -Glukose und 1 g ^{15}N -Ammoniumchlorid zu einem Liter Minimalmedium gegeben. Zur effektiven Deuterierung der Proteine wurden die Spurenelemente lyophilisiert und in Deuteriumoxid (D_2O) aufgenommen. Für die spezifische Markierung einzelner Aminosäuren in ArtMP bzw. ArtP wurden 200 mg/l uniform markiertes ^{13}C , ^{15}N -Tyrosin, -Threonin und -Prolin verwendet und alle weiteren essentiellen Aminosäuren unmarkiert in gleicher Menge eingesetzt.

Zur Plasmidselektion wurden entsprechend der Resistenzen der Plasmide die Antibiotika Carbenicillin und Chloramphenicol in den Endkonzentrationen 60 μ g/ml bzw. 34 μ g/ml verwendet.

2.1.4 Verwendete Nährmedien zur Kultivierung von *G. stearothermophilus*

Die Anzucht von *G. stearothermophilus* in Schüttelkulturen erfolgte in Vollmedium, das sich aus 1,5 % Pepton (aus Casein), 0,5 % Sojamehlpepton und 0,5 % NaCl

zusammensetzte. Der pH Wert wurde auf 7,3 mit Natriumhydroxid eingestellt (nach Empfehlung der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ). Für die Kultivierung mit dem Hochzellichtefermentationsverfahren (HZDF) setzte sich das Minimalmedium wie folgt zusammen: 29 mM K_2HPO_4 , 37 mM KH_2PO_4 , 1,7 mM $MgSO_4$, 0,1 mM EDTA, 33 μM $FeSO_4$, 3,7 μM $ZnCl_2$, 0,6 μM $CuSO_4$, 50 μM $FeCl_3$, 10 μM $MnCl_2$, 10 μM $ZnSO_4$, 2 μM $CoCl_2$, 2 μM , $CuCl_2$, 2 μM $NiCl_2$, 2 μM $NaMO_4$, 2 μM $NaSeO_3$, 2 μM H_3BO_3 . Als Kohlenstoffquelle wurde Glukose und als Stickstoffquelle Ammoniumchlorid abhängig vom Verbrauch eingesetzt. Der pH wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Das Medium wurde auf Basis von Al-Qodah (2006) und Studier (2005) zusammengestellt.

Zur Deuterierung der Lipide in *G. stearothermophilus* wurden die Salze und Spurenelemente lyophilisiert und anschließend in D_2O gelöst. Um einen möglichst hohen Deuterierungsgrad zu erhalten, wurde die kommerziell erworbene D7-Glukose lyophilisiert und in D_2O gelöst, um die austauschbaren Protonen gegen Deuteriumatome zu tauschen (D12-Glukose). Der pH-Wert wurde mit NaOD eingestellt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem „NucleoSpin[®] Plasmid“-Kit der Firma Macherey & Nagel (Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Zur Kontrolle wurde die Plasmid-DNA auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abschn. 2.2.3).

2.2.2 Elektrophoretische Trennung von Plasmid-DNA

Die präparative und analytische Auftrennung von Plasmid-DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook, 1989). Dazu wurden 1,5 % Agarose-Gele in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) verwendet, die 0,0004 % Ethidiumbromid zur Färbung der DNA enthielten. Die DNA-Proben wurden 1:5 mit Probenpuffer (50 % (v/v) Glycerin, 1 % (w/v) SDS, 0,1 M EDTA pH 8,0, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Als Größenstandard wurde der *1 kb/plus-DNA Ladder*

(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V. Anschließend wurde die DNA im Agarose-Gel mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Für präparative Anwendungen wurde die Plasmid-DNA mit dem Montage DNA Gel Extraction Kit[®] (Millipore, Bedford, USA) aus dem Agarosegel extrahiert.

2.2.3 Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen

Zur Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen wurden die *E. coli*-Stämme auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen (Sambrook, 1989). Von dieser Agarplatte wurde eine Startkultur beimpft, die bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert wurde. Anschließend wurde die Hauptkultur auf eine OD_{600nm} 0,1 inokuliert und bei 37 °C, 160 rpm geschüttelt. Nachdem die Kultur eine OD_{600nm} von 0,3 erreicht hatte, wurden die Zellen für 30 min auf Eis abgekühlt und im nächsten Schritt bei 4°C, 2500 x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/10 des Ausgangsvolumens in 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend bei 4°C, 2500 x g für 10 min pelletiert und die Zellen in 1/20 des Startvolumens in 0,1 M CaCl₂ und 10 % Glycerin aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden direkt transformiert oder bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurde die CaCl₂-Methode nach Sambrook (1989) verwendet. 100 µl kompetente Zellen wurden mit 100 ng bis 200 ng Plasmid-DNA gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis gestellt und nachfolgend mit 1 ml LB-Medium versetzt. Nach einer Stunde Inkubation der Kultur bei 37°C wurden 50 – 100 µl des Ansatzes auf einer LB-Selektions-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.5 Insertion eines Stop-Codons: pQE60-*artM*

Die Einführung eines Stop-Codons in pVE15 (Eckey *et al.*, 2010) zwischen der Sequenz von ArtM und des His-Tags wurde in Anlehnung an das Quick Change[®]-

Protokoll der Firma Stratagene (La Jolla, USA) durchgeführt. Die Oligonukleotide enthielten die Sequenz für das Stop-Codon TAG (Tab. 3). Das daraus resultierende Plasmid trägt den Namen pQE60-*artM*. Der Mutagenese-Ansatz setzte sich zusammen aus:

1 x	KOD-Polymerase-Puffer
65 ng	pVE15 (Eckey <i>et al.</i> , 2010)
125 ng	ArtMSTOP-fw35
125 ng	ArtMSTOP-rev350
0,4 mM	dNTPs
2 mM	MgSO ₄
2,5 Units	KOD-Hotstart-DNA-Polymerase (Novagen)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit dem Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Es wurde nachstehendes Reaktionsprofil verwendet.

1 Zyklus	Denaturierung	95°C	30 sec
16 Zyklen	Denaturierung	95°C	30 sec
	Primer-Anlagerung	55°C	1 min
	Elongation	68°C	2 min
Lagerung		4°C	

Die Insertion der Nukleotide wurde im Anschluss mittels Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung wurde von der Firma Invitak (Berlin) durchgeführt.

2.3 Kultivierung von *Geobacillus stearothermophilus*

2.3.1 Anzucht und Lagerung

Die Anzucht von *G. stearothermophilus* in Schüttelkulturen erfolgte nach Fleischer *et al.* (2005) für sechs Stunden bei 55°C in Vollmedium (Abschn. 2.1.4). Die Kontrolle des Zellwachstums erfolgte durch die Messung der Optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600nm}) an einem mit einem *Ultrospec*TM 10 *Cell Density Meter* (GE Healthcare, Amersham Biosciences).

Die Dauerkulturen von *G. stearothermophilus* wurden mit 20 % Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

2.3.2 Hochzelldichtefermentation (HZDF) von *G. stearothermophilus*

Die Hochzelldichtefermentation von *G. stearothermophilus* wurde mit der Bioreaktoranlage fedbatch-pro® der Firma Dasgip durchgeführt. Die verwendeten Reaktoren hatten ein Volumen von 400 ml. Das Startvolumen betrug max. 250 ml. Zunächst wurde das entsprechende Minimal-Medium (Abschn. 2.1.4) in den Reaktoren temperiert. Die optimale Temperatur betrug 52 °C. Zur pH-Statierung wurde ein Sollintervall von pH 7,3 bis 7,5 festgelegt und durch automatische Zugabe von NaOH (1 M) eingestellt. Die Sauerstoffzufuhr wurde mit 20 sl/min festgelegt und die Sauerstoffregulation während des Prozesses automatisch mittels Magnetrührer zwischen 500 rpm und 1000 rpm je nach Sauerstoffkonzentration im Medium angepasst.

Zellanzucht für die Herstellung protonierter Lipide

Aus einer Dauerkultur von *G. stearothermophilus* wurde eine Schüttelkultur (Vollmedium, Abschn. 2.1.4) angesetzt und über Nacht bei 55 °C und 160 rpm inkubiert. Daraus wurde eine weitere Vorkultur auf eine OD_{600nm} 0,1 beimpft und bei 55°C mit 160 rpm geschüttelt. Nach Erreichen einer OD_{600nm} zwischen 1 und 2 wurden die Zellen bei 2500 x g bei Raumtemperatur für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde umgehend im Minimalmedium resuspendiert und zur Inokulation der Startkulturen (OD_{600nm} 0,5-1) für die HZDF verwendet. Für die Kultivierung in protonierten Medium betrug die Ausgangskonzentration für Glukose (C) 3 g/l und für Ammoniumchlorid (N) 1,25 g/l (C/N: 2,4:1). Die Regulation der Nährstoffzufuhr erfolgte über den Sauerstoffgehalt in der Kultur. Die Stocklösung für die Nährstoffdosierung basierte auf dem Minimalmedium (Abschn. 2.1.4) und enthielt 250 g/l Glukose sowie 62,5 g/l (C/N: 4:1).

Der Sauerstoffverbrauch diente der Beobachtung des Zellwachstums und somit der automatisierten Regulation der Nährstoffdosierung. Nach Absinken des Sauerstoffgehalts unter 50 % (Schwelle 1) und dem nahezu vollständigen Verbrauch der vorhandenen Nährstoffquellen, musste zunächst eine zweite Schwelle von 70 % überschritten werden, bevor mit einer Verzögerung von einer Minute die Nährstoffdosierung mit einer Flussrate von 2 ml/h einsetzte.

Während der Prozessoptimierung wurden die Glukose- und die Ammoniumchloridkonzentration mittels Glukose- und Ammonium-Teststäbchen (Merck, Darmstadt) überprüft. In Ergänzung wurde die Zelldichte photometrisch bei 600nm bestimmt.

Nach Verbrauch aller Nährstoffe und dem damit verbundenen Anstieg der Sauerstoffkonzentration in der Kultur wurden die Zellen bei 5000 x g und 4°C geerntet. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert.

Zellanzucht für die Herstellung deuterierter Lipide

Hier werden nur die Abweichungen zum oben beschriebenen Protokoll aufgeführt. Es wurde vollständig deuterierte D12-Glukose und Deuteriumoxid statt Wasser verwendet (Abschn. 2.1.4). Die Glukose- und die Ammoniumchloridkonzentrationen in der Startkultur betragen 8 g/l bzw. 0,8 g/l (C/N: 10:1). Die pH-Regulation erfolgte mit NaOD (1 M Stocklösung). Die Nährstoffdosierung wurde nicht über die Sauerstoffkonzentration reguliert, sondern auf 10 h nach der Inokulation im Programm festgelegt.

2.3.3 Lipidextraktion

Die Lipide aus *G. stearothermophilus* wurden nach dem Protokoll von Folch *et al.* (1957) extrahiert. Aus einem Gramm Biofeuchtmasse konnten 10 mg bis 20 mg Lipid präpariert werden. Die Lipide wurden mit einer Konzentration von 20 mg/ml in Chloroform bei -20°C gelagert.

2.4 Herstellung rekombinanter Proteine

2.4.1 Expressionsuntersuchungen

Die für die Überexpression der Proteine verwendeten Klone wurden zunächst im 3 ml-Maßstab auf stabile Proteinexpression getestet. Dazu wurde zunächst die Transformation mit den entsprechenden Plasmiden und Bakterienstämmen durchgeführt. Es wurden stets zwischen zehn und zwanzig Kolonien ausgewählt und jeweils 3 ml LB-Medium, dem das entsprechende Antibiotikum zur Selektion zugesetzt wurde, beimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Davon wurden wiederum 3 ml LB-Kulturen auf eine OD_{600nm} 0,1 inokuliert und bei der

gewünschten Temperatur inkubiert. Die Induktion erfolgte zwischen OD_{600nm} 0,5 und 1 mit 0,5 mM bis 1 mM IPTG. Vier Stunden nach Induktion wurden die Kulturen bei 5000 x g, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2x-SDS-Probenpuffer (mit 4 % (w/v) SDS, 25 % Sammelgelpuffer, 30 % Glycerin (v/v), 10 % (v/v) Mercaptoethanol und 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) resuspendiert und bei 95°C für 20 Minuten erhitzt. Anschließend wurde die Expression mittels SDS-Gelelektrophorese (Abschn. 2.6.2) analysiert. Für die Herstellung von ArtMP und ArtM wurde *E. coli* BL21(DE3) jeweils neu mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Für die Herstellung von ArtP und ArtJ wurden Dauerkulturen hergestellt, die über einen Zeitraum von ca. einem Jahr eine gleichbleibende Expression zeigten.

2.4.2 Herstellung von ArtP

2.4.2.1 Herstellung von ArtP ohne Isotopen-Markierung

Die Expression von *artP* erfolgte von pVL4-P1 in Zellen des *E. coli*-Stammes BL21(DE3). Die unmarkierte Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Medium in 2 l-Kulturflaschen á max. 500 ml Kulturmedium. Die Kulturen wurden von einer LB-Über-Nacht-Kultur beimpft und bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Die Expression wurde, nach Erreichen von OD_{600nm} 0,3 - 0,5, durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und vier Stunden bei 37°C und 160 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C für 15 Minuten geerntet. Das Zellpellet wurde bis zu weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.4.2.2 Markierung von ArtP mit [u - ^{13}C , ^{-15}N]-Threonin, -Tyrosin und -Prolin

Die Aminosäure-spezifische Markierung von ArtP mit [u - ^{13}C , ^{-15}N]-Threonin, -Tyrosin und -Prolin wurde nach dem Protokoll von Lange (2008) durchgeführt. Dazu wurde von einer Transformationsplatte oder aus einer Dauerkultur eine LB-Vorkultur beimpft und bei 37°C 160 rpm über Nacht inkubiert. Daraus wurde eine LB-Kultur angesetzt und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} 0,6 bis 0,8 kultiviert. Die Zellen wurden bei 2500 x g und 20°C für 10 min zentrifugiert und anschließend mit M9-Minimalmedium gewaschen und nochmals pelletiert (2500 x g, 20°C, 10 min). Anschließend wurde das Zellpellet in der Hälfte des Ausgangsvolumens in dem mit Aminosäuren angereicherten M9-Minimalmedium (Abschn. 2.1.3) resuspendiert. Die markierten Aminosäuren wurden in

einem Überschuss von 200 mg/l eingesetzt. Um deren Metabolisierung zu unterdrücken, wurden die übrigen der 20 essentiellen Aminosäuren unmarkiert in das Medium gegeben (200 mg/l). Die Kultivierung wurde bei 37°C und 130 rpm durchgeführt. Die Induktion der Expression erfolgte 30 min nach dem Wechsel des Mediums durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die Ernte erfolgte wie in Abschnitt 2.4.2.1 beschrieben vier Stunden nach der Geninduktion.

2.4.2.3 Uniforme Markierung von ArtP mit den Isotopen ^{13}C , ^{15}N und ^2H

Die Herstellung von uniform ^{13}C , ^{15}N , ^2H -markierten ArtP erfolgte in 2 l-Kulturflaschen á 200 ml Medium. Zunächst wurde eine M9-Vorkultur (unmarkiert) von einer LB-Kultur auf $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,1 beimpft. Anschließend wurde der Ansatz bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,7 bis 0,8 wurden die Zellen bei 20°C und 2500 x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde im Ausgangsvolumen in dem [^2H , ^{13}C , ^{15}N]-M9-Medium (Abschn. 2.1.3) resuspendiert und bei 37 °C und 160 rpm kultiviert. In der Hauptkultur wurden 6 g/l ^{13}C -Glukose als Kohlenstoffquelle, 1 g/l ^{15}N -Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle eingesetzt und H_2O wurde durch D_2O ersetzt (Abschn. 2.1.3). Die Geninduktion erfolgte bei $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,8 bis 0,9 mit 1 mM IPTG. Die Expression fand bei 30°C und 160 rpm statt. Die Ernte der Kultur erfolgte nach 20 bis 24 Stunden.

2.4.3 Herstellung von ArtMP

2.4.3.1 Herstellung von ArtMP ohne Isotopen-Markierung

Die Expression von *artMP* wurde von pRF2 in den Zellen des *E. coli*-Stammes BL21(DE3) durchgeführt. Die Anzucht erfolgte, wie in Abschnitt 2.4.2.1 für die isolierte NBD ArtP beschrieben. Die Expression von *artMP* wurde mit 0,5 mM IPTG gestartet.

2.4.3.2 Uniforme Markierung von ArtMP mit den Isotopen ^{13}C , ^{15}N und ^2H

Die Expression von *artMP* wurde von pRF2 in den Zellen des *E. coli*-Stammes BL21(DE3) durchgeführt. Die Anzucht erfolgte, wie in Abschnitt 2.4.2.3 für die isolierte NBD ArtP beschrieben. Die Expression von *artMP* wurde mit 0,5 mM IPTG ausgelöst.

2.4.4 Expression von *artM*

Herstellung von ArtM mit sechsfachem Histidin-Tag (pVE15) in *E. coli* BL21(DE3)

Ausgehend von einer frischen Transformationsplatte wurden 100 ml LB-Medium beimpft und bei 37°C und 160 rpm über Nacht inkubiert. Daraus wurde die Hauptkultur (LB-Medium) auf OD_{600nm} 0,1 bis 0,2 beimpft. Die Anzucht erfolgte in 2l-Kulturflaschen á 500 ml LB-Medium bei 30°C und 160 rpm. Die Expression von *artM* wurde bei Erreichen von OD_{600nm} 0,5 mit 0,5 mM IPTG gestartet. Sechzehn Stunden nach der Geninduktion wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C für 15 Minuten geerntet. Das Zellpellet wurde bis zu weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Während der Optimierung der Bedingungen wurden Temperaturen von 25°C bis 37°C getestet, wobei die höchste Zelldichte und das größte Expressionsniveau bei 30 C erreicht wurden.

Herstellung von ArtM ohne Histidin-Tag (pQE60-artM) in *E. coli* BL21(DE3)

Für die Herstellung von ArtM ohne Affinitäts-Tag wurden die Anzuchtsmedien LB, 32Y und TB getestet (Abschn. 2.1.3). Die Kultivierung erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie für BL21(DE3)<pVE15>. Zusätzlich wurden die verwendeten Medien nach Studier (2005) zu Autoinduktionsmedien modifiziert (Abschn. 2.1.3). Diese wurden ebenfalls von einer LB-Über-Nacht-Kultur auf OD_{600nm} 0,1 bis 0,2 beimpft und für mindestens 24 Stunden bei 30°C und 130 rpm inkubiert. Für die Anzucht wurden 2l-Kulturflaschen á 500 ml Kulturmedium verwendet. Im 32Y-Medium wurde die höchste Biomasse erhalten und aus diesem Grund nachfolgend als Standardmedium verwendet. Das Expressionsniveau war für alle getesteten Medien vergleichbar. Die optimierten Anzuchtsbedingungen wurden in Tabelle 9 (Abschn. 3.1.2) zusammengefasst.

2.4.5 Herstellung von ArtJ

ArtJ wurde von pSS1 in den Zellen des *E. coli*-Stammes Rosetta(DE3)pLysS exprimiert. Die Anzucht wurde analog zu der Expression von ArtP durchgeführt (Abschn. 2.4.2.1).

2.5 Präparation rekombinanter Proteine

Der Transportkomplex ArtMP, die nukleotid-bindende Untereinheit ArtP sowie das Substratbindeprotein ArtJ wurden mit einem sechsfachen Histidin-*Tag* exprimiert. Die Reinigung der Proteine erfolgte nach Lange (2008).

2.5.1 Reinigung von ArtP

Das Zellpellet wurde in 50 mM TrisHCl, 5 % Glycerin, pH8,0 resuspendiert und in dem Zellaufschlussgerät (EmulsiFlex-C3, Avestin Europe GmbH, Mannheim)aufgeschlossen. Im Anschluss wurden das Lysat bei 22 000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Filtration (0,45 µM) direkt zur Reinigung von ArtP mittels Metallchelate-Chromatographie verwendet. Dazu wurden Gravitationssäulen sowie die Chromatographieanlage Profinia der Firma Biorad verwendet. Das Säulenmaterial war entweder mit Nickel (II)-Ionen oder mit Cobalt (II)-Ionen beladen. Das Chromatographiematerial wurde vor der Benutzung gereinigt, wieder mit den entsprechenden Ionen beladen und anschließend mit 50 mM TrisHCl, 5 % Glycerin, pH 8,0 äquilibriert. Die Bindung des Proteins erfolgte unter leichtem Schütteln bei 8°C für eine Stunde. Daraufhin wurden unspezifisch gebundene Proteine mit zehn Säulenvolumen 50 mM TrisHCl, 5 % Glycerin, pH 8,0 von der Säule gewaschen. In zwei weiteren Waschschrritten wurden dem Puffer 5 mM bzw. 10 mM Imidazol pH 8,0 zugesetzt. Die Elution erfolgte mit 150 mM Imidazol bei Verwendung der Gravitationssäulen und bei Nutzung der Profinia mit 250 mM Imidazol in 50 mM TrisHCl, 5 % Glycerin, pH 8,0. Im Anschluss wurde ArtP während der Gelfiltration (Superdex 75, 320 ml) entsalzt. Bei diesem Schritt wurde auch bei Bedarf auch das Puffersystem gewechselt. ArtP wurde bei nicht sofortiger Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

2.5.2 Reinigung von ArtMP

Präparation der Cytoplasmamembranen

Der Zellpellet wurde in 50 mM TrisHCl, 5 % Glycerin, pH 8,0 resuspendiert und im Homogenisator (EmulsiFlex-C3, Avestin Europe GmbH, Mannheim) aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 5000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Die Cytoplasmamembranen wurden mittels Ultrazentrifugation (100.000 x g, 4°C, 1 h) vom

Cytoplasma getrennt. Die pelletierten Membranen wurden in 50 mM TrisHCl, 5 % Glycerin gewaschen und erneut bei 100.000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurde das Membranpellet wieder in 50 mM TrisHCl, 5 % Glycerin, pH 8,0 resuspendiert und bei Bedarf bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Solubilisierung der Cytoplasmamembranen und Reinigung von ArtMP

Die in 50 mM TrisHCl, 5 % Glycerin, pH 8,0 resuspendierten Membranen wurden mit 1 % DDM (n-Dodecyl- β -Maltosid) für eine Stunde bei 8°C solubilisiert. Das Solubilisat wurde mittels Ultrazentrifugation (100.000 x g, 4°C, 30 min) von festen Bestandteilen getrennt. Die Reinigung von ArtMP wurde wie in Abschnitt 2.5.1 für ArtP beschrieben durchgeführt. Es wurden ausschließlich Gravitationsssäulen verwendet. Dem Chromatographie-Puffer (50 mM TrisHCl, 5 % Glycerin, pH 8,0) wurde 0,4 % DM (n-Decyl- β -Maltosid) zugefügt. Zur Herstellung von ArtMP zur Durchführung von Protonen-Detektionsexperimenten mittels Festkörper-NMR sollten die austauschbaren Gruppen der Aminosäurereste zu 30 % protoniert und zu 70 % deuteriert vorliegen. Dazu wurde ab der Solubilisierung der Membranen der Puffer (50 mM TrisHCl, 5% Glycerin, pH 8,0) in 30 % Wasser (H₂O) und 70 % schwerem Wasser (D₂O) angesetzt. ArtMP wurde bei nicht sofortiger Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

2.5.3 Assemblierung von ArtP und ArtM

Präparation der Cytoplasmamembran

Der Zellaufschluss und die Extraktion der Cytoplasmamembran mit überexprimiertem ArtM aus dem Zelllysate wurde wie für den koexprimierten membranintegralen Komplex ArtMP durchgeführt (Abschn. 2.5.2).

Assemblierung von ArtP und ArtM

Die Cytoplasmamembran wurde in 50 mM TrisHCl, 5% Glycerin, pH 8,0 resuspendiert und wurde mit 1 % DDM bei 8°C für eine Stunde solubilisiert. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation bei 100.000 x g und 4°C für 30 min. Zur Assemblierung des Komplexes wurde zu dem Solubilisat, welches das gelöste ArtM (aus einem Liter Kultur) enthielt gereinigtes ArtP-His (15 mg) zugesetzt. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend konnte der Assemblierungsansatz direkt zur Reinigung mittels Metallchelate-Chromatographie verwendet werden.

Reinigung von ArtM(P)

Die Reinigung des assemblierten Transportkomplexes ArtMP erfolgte wie in Abschnitt 2.5.2 für das koexprimierte ArtMP beschrieben.

2.5.4 Reinigung von ArtJ

Das Substratbindeprotein ArtJ wurde nach dem in Abschnitt 2.5.1 für die Präparation von ArtP aufgeführten Protokoll gereinigt. Dazu wurden ausschließlich mit Co^{2+} -beladenes Säulenmaterial und Gravitationssäulen verwendet (Lange, 2008).

2.6 Biochemische Analyse-Methoden

2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Absorption bei 250 nm gemessen. Dazu wurde das UV/VIS-Spektralphotometer *NanoDrop* ND1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Zur Berechnung der Konzentration wurde das Lambert-Beersche Gesetz $A = c \cdot d \cdot \epsilon$. A beschreibt dabei die Absorption, d die Schichtdicke der Küvette [cm], ϵ den molaren Extinktionskoeffizienten [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] des Zielproteins und c die zu bestimmende Konzentration des Proteins [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]. Die Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten erfolgte mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.ch).

2.6.2 SDS-Gelelektrophorese zur Trennung der Proteine

Gereinigte Proteine und Zellaufschlussproben wurden analytisch mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Vorschrift von Laemmli (1970) aufgetrennt. Die Polyacrylamid-Gele hatten eine Trennlänge von 6 cm. Die Elektrophorese erfolgte mit dem System *Mighty Small SE250* der Firma Hoefer (San Francisco, USA) bei einer Spannung von 150 V. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 1 % SDS (Natrium-Dodecyl-sulfat) und der pH-Wert wurde auf 8,3 eingestellt. Das Sammelgel setzte sich aus 4,9 % Acrylamid, 0,13 % Bisacrylamid, 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 8 mM EDTA, 4 % SDS und das Trenngel (15%) aus 15 % Acrylamid, 0,39 % Bisacrylamid 1,5 M TrisHCl, pH 8,8, 8 mM EDTA und 0,4 % SDS

zusammen. Zur Polymerisation wurden TEMED (Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) verwendet. Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese mit 4 % (w/v) SDS, 25 % Sammelgelpuffer, 30 % Glycerin (v/v), 10 % (v/v) Mercaptoethanol und 0,002 % (w/v) Bromphenolblau versetzt.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit 70 % Ethanol und 10 % Essigsäure fixiert. Im nächsten Schritt wurden die Proteine mit 0,02 % *Coomassie* in 10 % Essigsäure angefärbt und im Anschluss die überschüssige Farbe mit 10 % Essigsäure entfernt (Schägger & Jagow, 1988). Der Größenstandard wurde von der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen.

2.6.3 ATPase-Aktivitätstest

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität erfolgte des solubilisierten ArtMP wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Nikaido *et al.* (2007) in Mikrotiterplatten (Costar, *Ultra low cluster, 96 well flat bottom*, Corning Incorporated, USA) durchgeführt, wobei freiwerdendes Phosphat durch eine colorimetrische Reaktion nachgewiesen wird. Als Standard wurde Na_2HPO_4 mit Endkonzentrationen von 2 nmol bis 14 nmol mitgeführt. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden 25 μl 12 %-ige SDS-Lösung gegeben, die zum Abstoppen der Hydrolyse-Reaktion diente. Der Messansatz hatte ein Volumen von 125 μl und enthielt den Messpuffer (50 mM TrisHCl, pH 8,0), 10 μg ArtMP (50 mM TrisHCl, pH 8,0; 5 % Glycerin; 0,4 % DM), 1 mM Arginin (50 mM TrisHCl, pH 8,0), 50 μg ArtJ. Der Ansatz wurde für eine Minute auf 60°C temperiert, bevor die Reaktion mit 3 mM ATP und 5 mM MgCl_2 gestartet wurde. Zu vier Zeitpunkten (1, 2, 3 und 4 min) wurden 25 μl abgenommen und in die Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden 50 μl der Färbelösung A (3 % Ascorbat in 1 M HCl; 0,5 % Ammoniummolybdat) zu den Proben gegeben. Nach einer Inkubation von 5 min wurde die Nachweisreaktion mit 75 μl der Lösung B (2 % Natriumcitrat; 2 % Natriumarsenat, 2 % Essigsäure) gestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte nach 20 min bei einer Wellenlänge von 750 nm (Safire, Tecan, Crailsheim). Als Kontrollen wurden alle Komponenten einzeln gemessen, um Phosphat-Verunreinigungen auszuschließen.

2.7 Kristallographische Methoden

2.7.1 3D-Kristallisation von ArtP

Die 3D-Kristallisation von ArtP erfolgte mit der *sitting drop*-Methode auf Basis der Dampfdiffusion (Übersicht: Drenth, 1999). Die Kristallisation wurde wie bei Lange (2008) durchgeführt. ArtP wurde mit *Amicon Ultra Centrifugational Filter*-Konzentratoren (Millipore, Bedford, USA) auf 28 mg/ml konzentriert. Der Reservoirpuffer setzte sich aus 25 % PEG 3350, 0,1 M BisTris, pH 6 und 2 % Glycerin zusammen. ArtP und der Reservoirpuffer wurden im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Das Maximalvolumen des Kristallisationstropfens betrug 500 µl. Der Kristallisationsansatz wurde für 3 Wochen bei 16 °C inkubiert. Für die Präparation von ArtP-Kristallen mit AMPPCP, AMPPCP/Mg²⁺ und ADP/Mg²⁺ wurde ArtP zuvor 30 Minuten mit den Nukleotiden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Endkonzentrationen an Nukleotid und MgCl₂ können der Tabelle 5 entnommen werden (Abschn. 3.1.1.2).

2.7.2 2D-Kristallisation des Transportkomplexes ArtMP

Die 2D-Kristallisation von ArtMP bzw ArtM(P) in Lipiden aus *G. stearothermophilus* wurde nach Lange (2008) durchgeführt. Die in Chloroform gelagerten Lipide wurden mit Stickstoff begast, um das Lösungsmittel zu entfernen. Die Lipide wurden anschließend in 50 mM TrisHCl, pH 8,0, 150 mM NaCl und 2 % Octylglykosid (OG) mit einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst und 2 Stunden im Ultraschallbad (Bandelin, Sonarex) beschallt. Der Proteinkomplex wurde im Reinigungspuffer (50 mM TrisHCl, pH 8,0; 5 % Glycerin, 0,4 % DM) auf eine Konzentration von 2 mg/ml eingestellt. Die Lipid- und Proteinlösungen wurden in einem Lipid-zu-Protein-Verhältnis von 1:2 (w/w) gemischt und der Ansatz in einen Dialyseschlauch (Ausschlussvolumen: 6-8 kDa, Roth, Karlsruhe) gefüllt. Der grundlegende Dialysepuffer I setzte sich aus 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 5 % Glycerin und 0,01 % Natriumazid zusammen. Die 2D-Kristallisationsansätze wurden durchschnittlich 3 Wochen bei Raumtemperatur inkubiert. Das Dialysevolumen betrug 1 Liter. In den Dialysepuffer wurden zusätzlich etwa 5 g *Biobeads*® (SM-2 Absorbent, Bio-Rad, München) gegeben, welche alle drei Tage gegen neue *Biobeads*® getauscht wurden. Diese sollten das Detergenz binden und somit die Effizienz der 2D-Kristallisation erhöhen.

Die Herstellung von 2D-Kristallen für ¹H-detektierte Festkörper-NMR-Untersuchungen erfolgte im Dialysepuffer II (20 mM TrisHCl, pH 8,0; 300 mM NaCl; 5 % Glycerin; 0,1 %

Natriumazid; 70 % D₂O). Anschließend wurde der Ansatz für zwei Tage bei pH 6,7 dialysiert (20 mM TrisHCl, pH 6,7; 300 mM NaCl; 5 % Glycerin; 0,1 % Natriumazid; 70 % D₂O).

Für die Präparation von ArtMP bzw. ArtM(P) im nukleotid-gebunden Zustand wurden 400 µM AMPPCP bzw. ADP und 1 mM MgCl₂ sowohl in den Kristallisationsansatz als auch in den Dialysepuffer gegeben.

Die 2D-Kristalle wurden bei 40.000 x g, 4°C für 4 Stunden geerntet und anschließend in NMR-Rotoren gefüllt.

2.8 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Vor den NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden Aliquots der 2D-kristallinen Präparationen mittels Elektronenmikroskopie auf regelmäßigen Proteinabbau überprüft. Die Messungen wurden an einem EM 902A (Carl Zeiss, Jena) bei einer Beschleunigungsspannung von max. 80 kV durchgeführt. Die Probe lag im entsprechenden Kristallisationspuffer (Abschn. 2.8) vor und wurde auf Grids (Gitternetzgröße 400 Maschen mit Kohle-Trägerfilm) aufgetragen. Die Negativfärbung erfolgte mit 5 µl 2 % Uranylacetat. Überschüssiges Uranylacetat wurde durch einmaliges Waschen mit 5 µl H₂O entfernt.

2.9 Lösungs-NMR-Spektroskopie

Die Lösungs-NMR-Experimente wurden an Bruker Avance 600 MHz-Spektrometern (14,1 Tesla; Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) durchgeführt. Es wurden 5 mm NMR-Röhrchen (NORELL[®], Landisville, NJ, USA) verwendet.

2.9.1 ¹H-Spektren von Lipidextrakten

Die 1D-¹H-Spektren wurden bei einer Temperatur von 300 K aufgenommen. Dafür wurden 20 mg Lipidextrakt in 600 µl deuteriertem Chloroform aufgenommen.

2.9.2 1D-³¹P-Spektren

Um Nukleotidverunreinigungen in den ArtP-Präparationen auszuschließen, wurden eindimensionale ³¹P-Spektren aufgenommen. Für die Messungen lag ArtP (0,2 mM) in 50 mM TrisHCl, pH 8,0 und 5 % Glycerin vor. Der Ansatz mit ArtMP-J (0,04 mM ArtMP; 0,4 mM ArtJ; 3 mM ATP) enthielt zusätzlich 0,4 % DM. Die Messungen erfolgten bei der Phosphorfrequenz von 243 MHz und einer Temperatur von 300 K.

2.9.3 2D-¹H-¹⁵N-HSQC/TROSY-Experimente mit ArtP_{DCN}

(HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Coherence*; Bodenhausen & Ruben, 1980)

(TROSY: *Transverse Relaxation-Optimised Spectroscopy*; Pervushin *et al.*, 1997)

Die Messungen erfolgten an einem 600 MHz-Spektrometer (Protonenfrequenz) der Firma *Bruker* bei Temperaturen von 280 K bis 300 K durchgeführt. ArtP lag in 50 mM TrisHCl, pH 8,0 in Konzentrationen von 100 µM bis 200 µM vor. Für die Messungen wurde ArtP mit den Isotopen ²H, ¹⁵N und ¹³C markiert. Der Messansatz wurde zusätzlich mit 10 % D₂O versetzt und hatte ein Volumen von 600 µl.

2.9.4 HNCACB- und HN(CO)CACB-Experimente mit ArtP_{DCN}

Zur sequentiellen Zuordnung der Signale von ArtP wurden HNCACB- und HN(CO)CACB-Experimente aufgenommen (Grzesiek & Bax, 1992). Die Messungen erfolgten bei 300 K. Da ArtP in glycerinfreiem 50 mM TrisHCl über den Messzeitraum nicht stabil war, wurde Natriumphosphatpuffer (200 mM) mit 50 mM Natriumchlorid verwendet. Die Messungen wurden von Dr. Peter Schmieder durchgeführt. Die Konzentration von ArtP betrug 1 mM. Die Zuordnung erfolgte durch Eliza Ploskon-Arthur.

2.10 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die Festkörper-NMR-Experimente wurden an Bruker Avance 900, 700 und 600 MHz Spektrometern (entsprechend 21,1, 16,4, 14,1 Tesla) durchgeführt. Für die Messungen wurden 3.2 mm und 4 mm Dreifachresonanz-MAS-Probenköpfe verwendet. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Trent Franks, PhD und Dr. Matthias Hiller durchgeführt.

2.10.1 ^{13}C - ^{13}C -PDSD-Experimente

Die ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsspektren der 3D-Kristalle von ArtP_{TYP} und der 2D-Kristalle von ArtM(P_{TYP}) wurden bei 280 K unter Verwendung von *proton-driven spin-diffusion* (PDSD; Szeverenyi *et al.*, 1982) aufgenommen. Dabei wurde eine Mischzeit von 20 ms gewählt. Die Messungen erfolgten mit einem 4 mm Dreifachresonanz-Probenkopf und einer Rotationsfrequenz von 12,5 kHz.

2.10.2 2D- ^1H - ^{15}N -Korrelationsexperimente

Die Messungen der ^1H - ^{15}N -Korrelationen von ArtP_{DCN} (3D-Kristalle) und ArtM(P_{DCN}) (2D-Kristalle) erfolgten mit einem 3.2 mm Dreifachresonanz-Probenkopf bei 275 K. Der Rotor wurde mit einer Frequenz von 20 kHz gedreht. Es wurden zum Magnetisierungstransfer sowohl Kreuzpolarisation (Pines *et al.*, 1972; Schäfer & Steijskal, 1976) als auch Inensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer verwendet (Morris & Freeman, 1979). Es wurden die Pulssequenzen von Rasmus Linser (Linser *et al.*, 2008; Linser, 2010) verwendet.

2.11 Datenanalyse

Die NMR-Spektren wurden mit dem Software-Programm Topspin 2.1 (Bruker) ausgewertet. Für die Darstellung der Spektren erfolgte mit Sparky 3.1 (T. D. Goddard und D. G. Kneller, Universität von Kalifornien, USA), Xwinplot (Bruker Corporation) und Coreldraw® 10 (Corel Corporation, Ottawa, Ontario).

Die Abbildungen von Proteinstrukturen wurden mit der Software *Pymol* (DeLano scientific LLC, San Francisco, USA) angefertigt.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit werden verschiedene Ansätze zur Untersuchung der Nukleotidbindedomäne ArtP des ABC-Transporters ArtMP-J aus *G. stearothermophilus* in verschiedenen Konformationen während des Translokationszyklus beschrieben. Den Ausgangspunkt bildete die Arbeit von Dr. Vivien Lange (2008). Darin wurden die isolierte NBD ArtP sowie der Transmembrankomplex ArtMP selektiv mit den Aminosäuren [^{13}C , ^{15}N]-Threonin, -Tyrosin und -Prolin markiert (TYP). Für die Festkörper-NMR-Untersuchungen wurde ArtP_{TYP} 3D-kristallisiert und ArtMP_{TYP} in nativen Lipiden aus *G. stearothermophilus* 2D-kristallisiert. Es konnten die Aminosäuren Tyr 133, Tyr 213, Pro 134, Pro 163 und Thr 164 zugeordnet werden. Dabei waren die Reste Tyr 133 und Pro 134 von besonderem Interesse, da sich diese direkt vor der ABC-Signatur in der Nukleotidbindetasche befinden (Abschn. 1.4).

^{13}C - ^{13}C -Korrelationsspektren von 3D-kristallinem ArtP ohne Nukleotid und mit ATP (Adenosintriphosphat) wiesen deutliche Unterschiede für die Reste Pro 134 und Tyr 213 auf, wobei nicht geklärt werden konnte, ob ATP möglicherweise während des Kristallisationsprozesses hydrolysiert wurde (Lange *et al.*, 2010). Daraufhin wurde ArtP mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogikum AMPPCP (Adenylyl- β,γ -Methylen-Diphosphat) zur Untersuchung des prähydrolytischen und mit ADP (Adenosindiphosphat) zur Darstellung des posthydrolytischen Zustandes kristallisiert und NMR-spektroskopisch untersucht (Abschn. 3.1.1).

Weiterführend sollte ArtP im Komplex mit den Transmembranuntereinheiten in nativen Lipidmembranen untersucht werden. Von Lange (2008) wurde der vollständige Transportkomplex ArtMP_{TYP} in Lipiden von *G. stearothermophilus* ohne Nukleotid sowie mit ATP 2D-kristallisiert. Durch die zusätzlichen Signale von den markierten Aminosäuren aus ArtM war die Auflösung der Spektren geringer als für die 3D-Kristalle, da einige Bereiche deutlich mehr Signalüberlagerungen zeigten. Zur Verringerung der Signalanzahl wurden in dieser Arbeit die separate Präparation von ArtM und die *in vitro*-Assemblierung von ArtM mit ArtP zu einem aktiven Transportkomplex etabliert. So wurde eine Untersuchung der NBD ArtP in einer nativen Lipidumgebung möglich. Es konnten erfolgreich erste ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen von ArtP_{TYP} im Komplex mit unmarkiertem ArtM (ArtM(P_{TYP})) in nativen Lipidmembranen aufgenommen werden (Abschn. 3.1.2).

Im zweiten Teil der Arbeit wurden erstmals 2D- ^1H - ^{15}N -Korrelationensspektren (nachfolgend: H/N-Korrelationen) von ArtMP mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie aufgenommen (Abschn. 3.2), wobei das Verfahren der reduzierten Protonendichte in der Probe gewählt wurde (Abschn. 1.3.3). Diese Untersuchungen wurden sowohl an 3D-Kristallen von ArtP als auch am *in vitro* assemblierten Komplex ArtM(P) in nativen Lipiden von *G. stearothermophilus* durchgeführt. Dazu mussten Protokolle zur Markierung der Proteine mit ^{13}C , ^{15}N und ^2H optimiert (Abschn. 3.2.2) und die Deuterierung der Lipide in *G. stearothermophilus* etabliert werden (Abschn. 3.1.2). In Abschnitt 3.2.4 werden zum einen die NMR-spektroskopischen Ergebnisse der verschiedenen Präparationsformen miteinander verglichen. Zum anderen wurden auch H/N-Korrelationen von ArtM(P_{DCN}) im nukleotidfreien, prähydrolytischen und posthydrolytischen Zustand gemessen. Darüber hinaus konnte die Zuordnung einiger Signale aus Lösungs-NMR-Spektren von ArtP auf die Festkörper-NMR-Spektren übertragen werden (Abschn. 3.2.4).

Nachfolgend werden die einzelnen Probenotypen mit den in Tabelle 6 definierten Abkürzungen bezeichnet.

Die Lösungs-NMR-Untersuchungen wurden unter Anleitung von Dr. Peter Schmieder und die Festkörper-NMR-Experimente in Zusammenarbeit mit Trent Franks, PhD sowie Dr. Matthias Hiller durchgeführt.

Tabelle 6 Definition der Abkürzungen für verschiedene Präparationen

Abkürzung	Markierung	Markierte Untereinheit	Präparationstyp
ArtP _{TYP}	[^{13}C , ^{15}N]- Threonin, -Tyrosin, -Prolin	ArtP	3D-Kristalle
ArtMP _{TYP}		ArtMP	2D-Kristalle
ArtM(P _{TYP})		ArtP	2D-Kristalle
ArtP _{DCN}	^2H , ^{13}C , ^{15}N Protonierungsgrad bezogen auf austauschbare Protonen: 30 %	ArtP	3D-Kristalle
ArtMP _{DCN}		ArtMP	2D-Kristalle
ArtM(P _{DCN})		ArtP	2D-Kristalle

3.1 Detektion von Konformationsänderungen in ArtP mit Hilfe selektiv markierter Aminosäuren

3.1.1 Untersuchungen an 3D-Kristallen von ArtP

Zunächst wurde die isolierte Nukleotibindedomäne ArtP untersucht, um im Spektrum Signalüberlagerungen durch Aminosäurereste aus der Membranuntereinheit zu vermeiden. So wurde ArtP_{TYP} mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogikum AMPPCP (prähydrolytisch) und ADP/Mg²⁺ (posthydrolytisch) kristallisiert. Zusätzlich wurden 3D-Kristalle von ArtP mit AMPPCP/Mg²⁺ präpariert, um den Einfluss des für die ATP-Hydrolyse essentiellen Kofaktors Mg²⁺ zu untersuchen.

3.1.1.1 Präparation des selektiv markierten ArtP_{TYP}

Zunächst wurde das ABC-Protein ArtP mit den Aminosäuren [¹³C, ¹⁵N]-Tyrosin, -Threonin und -Prolin markiert. Die Expression in *E. coli* (Abschn. 2.4.2.2) und die Reinigung mittels Metallchelatchromatographie (Kap 2.5.1) erfolgte nach dem Protokoll von Lange (2008). Abbildung 18 A zeigt das isolierte ArtP nach seiner Präparation in einem SDS-Gel.

Für die Charakterisierung von ArtP in verschiedenen nukleotid-gebundenen Zuständen musste zuvor sichergestellt werden, dass die ArtP-Präparation frei von Nukleotiden war. Dazu wurden 1D-³¹P-NMR-Spektren von ArtP in Lösung aufgenommen (Abb. 18 B; Abschn. 2.9.2). Da die natürliche Häufigkeit von ³¹P 100% beträgt, war eine Anreicherung nicht notwendig. Das graue Spektrum wurde von einer Probe aufgenommen, die ArtMP, ArtJ und ATP enthielt. Darin sind deutlich die Signale der drei Phosphatgruppen (α , β , γ) von ATP erkennbar. Signale für ADP, deren chemische Verschiebungen im Bereich des α - und γ -Phosphat von ATP liegen, konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Für das gereinigte ArtP (schwarz) konnten keine ³¹P-Signale detektiert werden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass während der Präparation von ArtP Nukleotide koeluiert wurden.

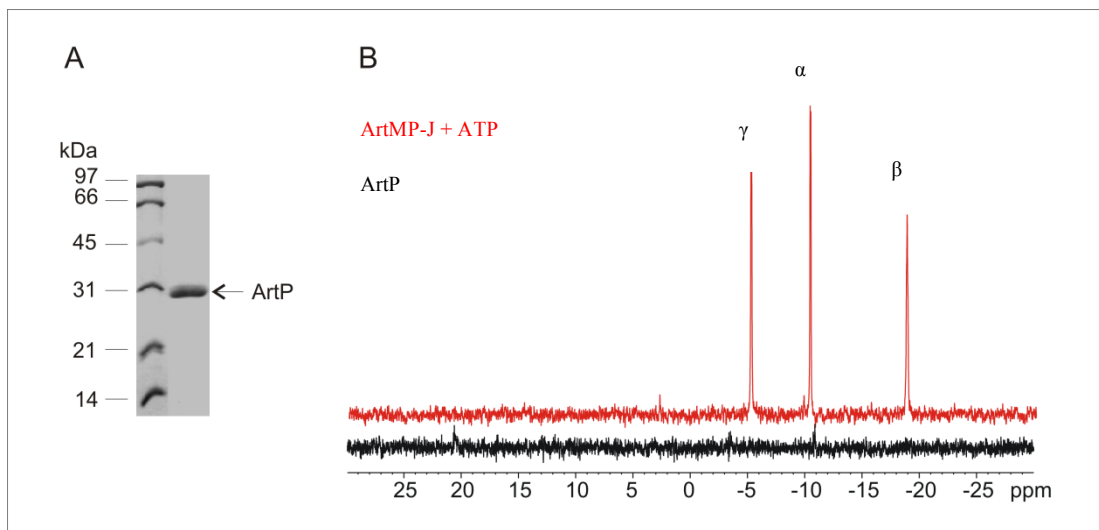


Abbildung 18: Präparation von ArtP. A) Das gereinigte ArtP wurde zusammen mit einem Größenstandard elektrophoretisch in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt. B) ³¹P-NMR-Spektren von ArtP ohne Nukleotid und ArtMP-J mit ATP in Lösung. Die Untersuchungen erfolgten in 50 mM TrisHCl, pH 8,0 und 5 % Glycerin bei einer Frequenz von 243 Hz und 300 K. Im Ansatz mit ArtMP waren zusätzlich 0,4 % DM enthalten.

3.1.1.2 3D-Kristallisation von ArtP_{TYP}

Von Lange (2008) wurden bereits dreidimensionale Kristalle von ArtP mit und ohne ATP hergestellt und mit Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit ArtP mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogen AMPPCP sowie AMPPCP/Mg²⁺ und ADP/Mg²⁺ kokristallisiert. Die 3D-Kristallisation von ArtP mit dem jeweiligen Nukleotid erfolgte nach der Methode des sitzenden Tropfens (Abschn. 2.7.1). Die Kristallisationsansätze und -bedingungen wurden in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7 Bedingungen für die 3D-Kristallisation von ArtP

Komponenten	AMPPCP	AMPPCP/Mg ²⁺	ADP/Mg ²⁺
Proteinkonzentration	28 mg/ml	28 mg/ml	28 mg/ml
Proteinmenge	15 mg	15 mg	18 mg
Kristallisationspuffer	25 % PEG 3350 0,1 M Bis-Tris, pH 6 2 % Glycerol 1,3 mM AMPPCP 0,1 mM EDTA	25 % PEG 3350 0,1 M Bis-Tris, pH 6 2 % Glycerol 1,3 mM AMPPCP 5 mM MgCl ₂	25 % PEG 3350 0,1 M Bis-Tris, pH 6 2 % Glycerol 5 mM ADP 5 mM MgCl ₂
Temperatur	16°C		
Zeitraum	21 Tage		

Die erhaltenen 3D-Kristalle von ArtP mit AMPPCP (ArtP_{TYP}^[AMPPCP/-]) und ArtP mit AMPPCP/Mg²⁺ (ArtP_{TYP}^[AMPPCP/Mg²⁺]) waren nadelförmig (Abb. 19 A), wie sie auch für ArtP ohne Nukleotid (ArtP_{TYP}^[-/-]) und ArtP mit ATP (ArtP_{TYP}^[ATP/-]) beobachtet wurden (Lange, 2008). Im Gegensatz dazu kristallisierte ArtP zusammen mit ADP/Mg²⁺ (ArtP_{TYP}^[ADP/Mg²⁺]) in schmetterlingsartiger Form (Abb. 19 B). Die 3D-Kristalle waren sehr stabil. So konnten nach eineinhalb Jahren Lagerung bei 4°C bis 8°C NMR-Spektren mit gleicher Qualität, wie kurz nach der Präparation aufgenommen werden (Daten nicht gezeigt).

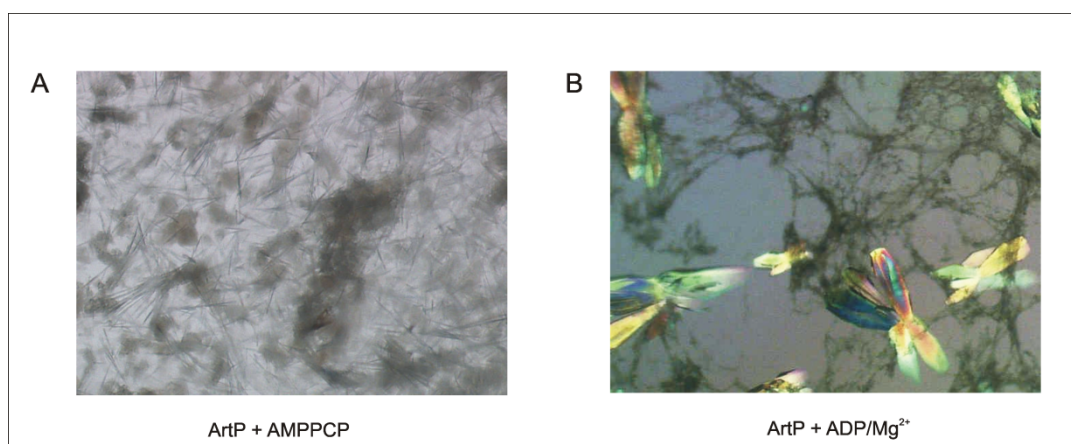


Abbildung 20: 3D-Kristalle von ArtP in verschiedenen nukleotid-gebundenen Zuständen.

A) ArtP mit AMPPCP und B) ArtP mit ADP/Mg²⁺ kokristallisiert.

3.1.1.2 ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen von ArtP_{TYP} mit AMPPCP

Es wurden von den 3D-Kristallen von ArtP PDSB-basierte ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsspektren aufgenommen, die nachfolgend kurz als PDSB-Spektren benannt werden (Abschn. 1.3.3 & 2.10.1). Die Zuordnungen der Aminosäurereste Tyr 133, Pro 134 und Tyr 213 konnten von Lange (2008) übertragen werden. In Abbildung 20 sind die Bereiche der Carbonyl- sowie der aliphatischen Kohlenstoffatome des PDSB-Spektrums von ArtP_{TYP}^[AMPPCP/-] dargestellt. Das Spektrum zeigt gut aufgelöste Signalsätze für Proline, Tyrosine und Threonine. Die $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ -Kreuzsignale der Tyrosine erscheinen zwischen 54-55 ppm/ 36-40 ppm (ω_1/ω_2) und des Pro 134 bei 64 ppm/ 50 ppm (ω_1/ω_2). Für das Tyr 133, das in der Nukleotidbindetasche von ArtP liegt, wurden zwei Signale detektiert. Die Intensität des zusätzlichen Signals Tyr' 133 ist geringer als von Tyr 133 und ist um 0,2 ppm in der indirekten Dimension (ω_1) sowie um 1 ppm in der direkten Dimension (ω_2) verschoben. Die Aufspaltung des Signals deutet auf zwei verschiedene Konformationen des Proteins hin. Möglicherweise führt die Bindung von AMPPCP zur Bildung eines asymmetrischen Dimers, in dem die chemischen Umgebungen des Tyr 133 in den beiden Nukleotidbindetaschen unterschiedlich sind.

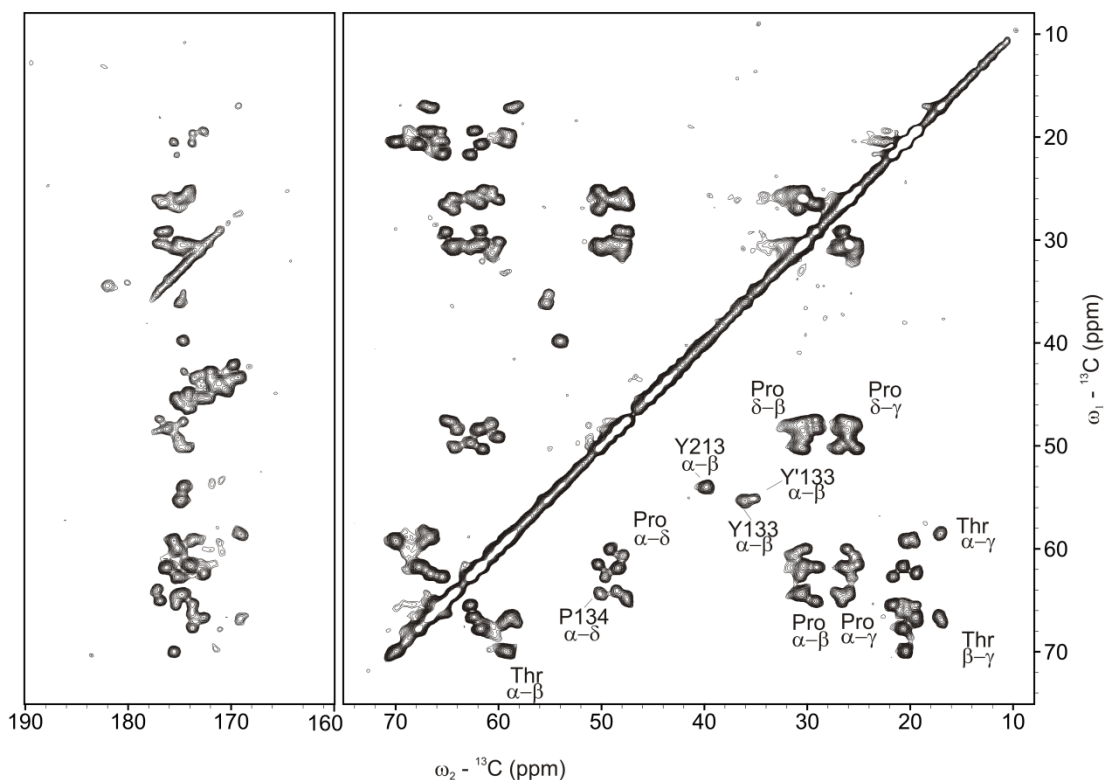


Abbildung 20: PDSB-Spektrum der 3D-Kristalle von ArtP_{TYP}^[AMPPCP/-]. Die Messung erfolgte bei 700 MHz (16,4 Tesla), 280 K und 20 ms Mischzeit und 12,5 kHz Rotationsfrequenz.

3.1.1.4 ArtP_{TYP} in verschiedenen nukleotid-gebundenen Zuständen

Es wurden ebenfalls PDSD-Spektren von den dreidimensionalen ArtP_{TYP}-Kristallen mit gebundenen AMPPCP, AMPPCP/Mg²⁺ bzw. ADP/Mg²⁺ aufgenommen. Die Qualität der NMR-Spektren ist vergleichbar mit den Ergebnissen für das nukleotid-freie ArtP_{TY} und ArtP_{TYP} im ATP-gebundenen Zustand (Lange, 2008). Signifikante Unterschiede beim Vergleich der verschiedenen nukleotid-gebundenen Zustände traten besonders für die Cα-Cβ-Kreuzsignale der Tyrosinreste und der Cα-Cδ-Prolinsignale auf. Daher wird nachfolgend der Fokus auf diese Bereiche gelegt (Abb. 21). In den folgenden Betrachtungen werden Änderungen der chemischen Verschiebungen über 0,3 ppm als signifikant angenommen. Die chemischen Verschiebungen von Tyr 133 und Tyr 213 (Cα-Cβ) sowie von Pro 134 (Cα-Cδ-) wurden in Tabelle 8 zusammengefasst.

Lange (2008) konnte zeigen, dass sich die chemischen Verschiebungen der beiden Tyrosinreste sowie des Pro 134 im ATP-gebundenen Zustand im Vergleich zur nukleotid-freien Präparation von ArtP_{TYP} verändern (Abb. 21 A). Besonders fällt auf, dass das Signal für Tyr 213 gedoppelt (Tyr' 213) ist. Die Aufspaltung des Kreuzsignals für Tyr 213 wurde für keine der anderen Präparationen beobachtet. Weiterhin ist das Pro 134-Signal deutlich in der indirekten Dimension verschoben.

Im AMPPCP-gebundenen Zustand hat das Tyr 213-Signal die gleiche chemische Verschiebung wie für die nukleotid-freie Präparation (Abb. 21 B). Dagegen spaltet das Signal für Tyr 133 auf (Tyr' 133). Auch sind die Positionen der Signale von Tyr 133 sowie von Pro 134 in beiden Präparationen unterschiedlich. In den Spektren von ArtP_{TYP}^[AMPPCP/Mg²⁺] und ArtP_{TYP}^[/-] haben sowohl die Signale für Tyr 213 als auch für Tyr 133 unterschiedliche chemische Verschiebungen (Abb. 21). Ebenso wie für ArtP_{TYP}^[AMPPCP/-] wurde die Aufspaltung des Signals für Tyr 133 beobachtet. Die Überlagerung der Spektren von ArtP_{TYP}^[AMPPCP/Mg²⁺] und von ArtP_{TYP}^[AMPPCP/-] zeigen, dass die beiden Tyrosine, Pro 134 sowie weitere Prolinreste durch den Kofaktor Mg²⁺ beeinflusst wurden (Abb. 21 D).

Das PDSD-Spektrum der 3D-Kristalle von ArtP_{TYP} mit ADP/Mg²⁺ zeigt keine Signalaufspaltungen (Abb. 21 E). Dennoch sind die Kreuzsignale für Tyr 133 und Pro 134 im Vergleich zu ArtP_{TYP}^[/-] signifikant verschoben.

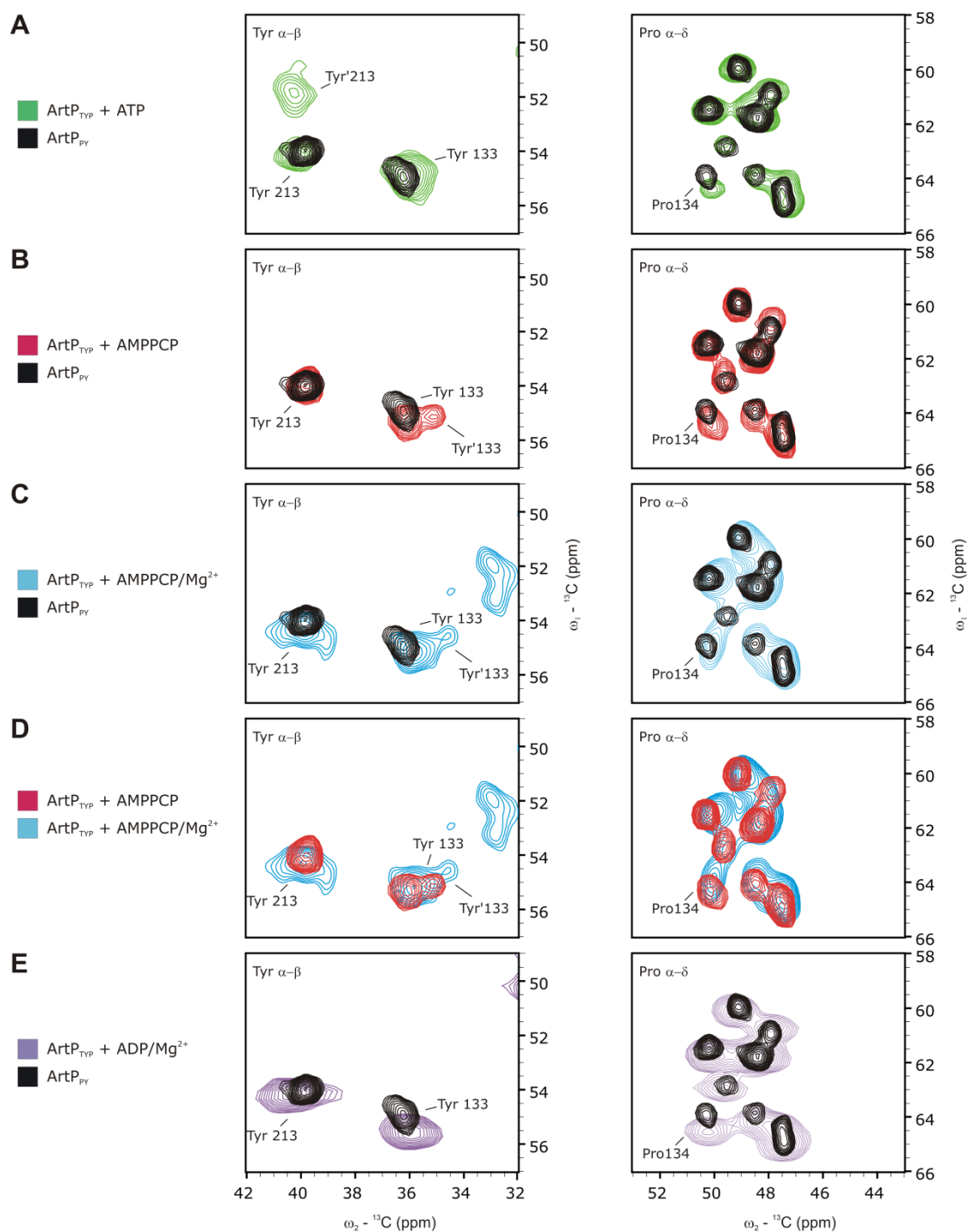


Abbildung 21: Ausschnitte aus PDS-D-Spektren von ArtP_{TYP}-3D-Kristallen. A-C) zeigt Überlagerungen der Spektren von ArtP_{TYP} ohne Nukleotid (schwarz) mit ArtP_{TYP}, das mit verschiedenen Nukleotiden präpariert wurde: mit ATP (grün), AMPPCP (rot), AMPPCP/Mg²⁺ (blau). D) Vergleich der AMPPCP und AMPPCP/Mg²⁺-gebundenen ArtP_{TYP}-Präparationen. E) Vergleich des nukleotid-freien und dem ADP/Mg²⁺-gebundenen Zustand von ArtP_{TYP} (violett). Die Spektren wurden bei 600MHz, 700 MHz bzw. 900 MHz Protonenfrequenz aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei 280 K, einer Rotationsfrequenz von 12 kHz und einer Mischzeit von 20 ms.

Tabelle 8 Chemische Verschiebungen von Tyr 133, Tyr 213 und Pro 134

	Tyr 213	Tyr' 213	Tyr 133	Tyr' 133	Pro 134
	w1/w2 [ppm]	w1/w2 [ppm]	w1/w2 [ppm]	w1/w2 [ppm]	w1/w2 [ppm]
ArtP_{PY}	53,9 / 39,8	- / -	54,8 / 36,2	- / -	63,8 / 50,2
ArtP_{TYP} + ATP	54,1 / 40,1	51,7 / 40,2	54,8 / 36,0	- / -	64,3 / 50,0
ArtP_{TYP} + AMPPCP	53,9 / 39,7	- / -	55,2 / 36,0	55,0 / 35,0	64,3 / 50,0
ArtP_{TYP} + AMPPCP/Mg²⁺	54,2 / 39,9	- / -	55,1 / 35,8	54,5 / 34,6	63,8 / 50,0
ArtP_{TYP} + ADP/ Mg²⁺	54,0 / 40,2	- / -	55,4 / 35,9	- / -	64,4 / 50,1

Das aktuelle Modell des Translokationszyklus legt die Kopplung von Konformationsänderungen in den NBDs und TMDs zu Grunde (Abschn. 1.1.3). Daher könnte der fehlende Kontakt zu den Membranuntereinheiten zu artifiziellen Konformationsänderungen in ArtP führen. Im folgenden Abschnitt wird eine Methode beschrieben, die die Untersuchung von markiertem ArtP im Komplex mit unmarkiertem ArtM in nativen Lipiden möglich macht.

3.1.2 Untereinheiten-spezifische Markierung des Transportkomplexes ArtMP

Die Markierung einzelner Untereinheiten im ABC-Transporter ArtMP ermöglicht die Untersuchung des vollständigen Transmembrankomplexes in nativen Lipiden bei reduzierter Signalanzahl. Im Falle von ArtP sind das 240 Aminosäurereste statt 458 für das vollständig markierte ArtMP-Monomer.

Hierfür wurden sowohl ArtM als auch ArtP separat hergestellt, *in vitro* assembliert und anschließend in Lipide aus *G. stearothermophilus* rekonstituiert. (Abb. 22).

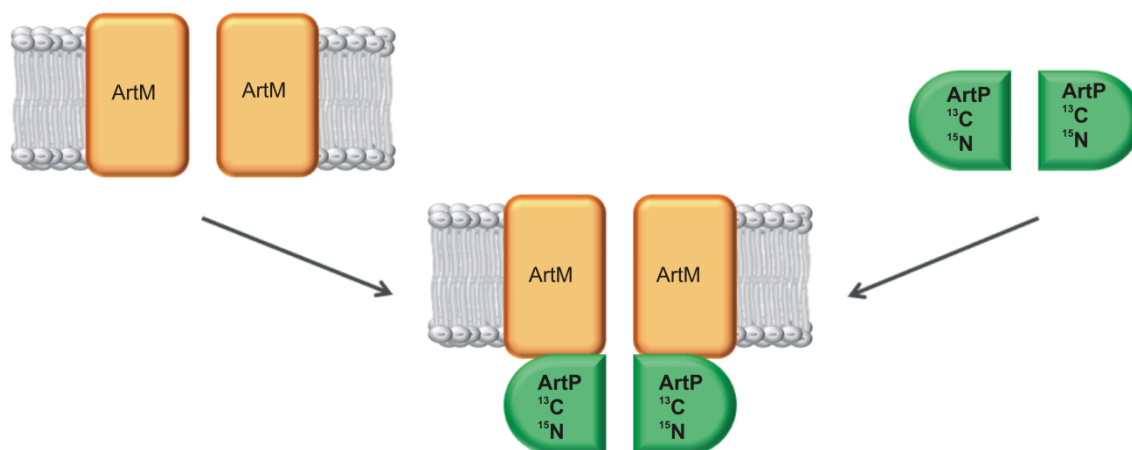


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Untereinheiten-spezifischen Markierung von ArtMP. Die Transmembrandomäne ArtM und die Nukleotidbindedomäne ArtP werden getrennt voneinander hergestellt. Anschließend werden das unmarkierte ArtM mit dem ^{13}C - und ^{15}N -markierten ArtP zu einem intakten Transportsystem assembliert.

Die separate Präparation und Reinigung von ArtP erfolgte nach Lange (2008). Die Herausforderung war die effiziente Herstellung des Membranproteins ArtM. Eckey *et al.* (2010) veröffentlichten erstmals eine Methode zur Herstellung der isolierten TMD ArtM. Jedoch sind die so gewonnenen 0,2 mg ArtM aus einem Liter Kulturmedium zu gering für die Herstellung einer Festkörper-NMR-Probe, für die mindestens 15 mg bis 20 mg ArtMP notwendig sind. Infolgedessen musste die Expression von *artM* erhöht und eine effiziente Methode zur Assemblierung von ArtM und ArtP zu einem aktiven Transportkomplex etabliert werden. Das Plasmid pVE15, welches das Gen für ArtM mit einem sechsfachen Histidin-Tag trägt (Eckey *et al.*, 2010), wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Erwin Schneider (Humboldt-Universität zu Berlin) zur Verfügung gestellt.

Als Erstes wurde die Expression von *artM* untersucht. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21(DE3) gewählt und die Standardbedingungen für die Anzucht von ArtMP in LB-Kulturen verwendet (Abschn. 2.4.4). Die Induktionsdauer wurde von vier auf sechzehn Stunden ausgeweitet, um den Zeitpunkt der größten Expression zu bestimmen. Nach drei bis vier Stunden konnte eine eindeutige Proteinbande für ArtM mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden. Nach fünfzehn bis sechzehn Stunden war die Expression am höchsten (Abb. 23 A).

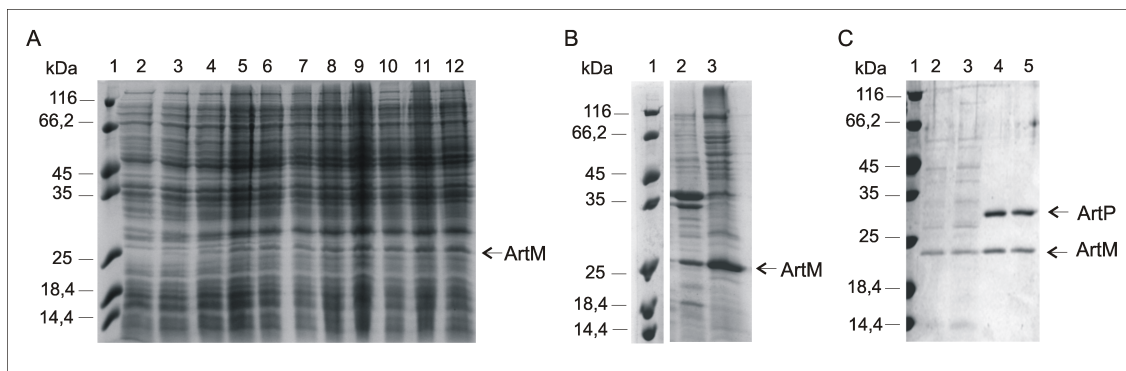


Abbildung 23: Präparation von ArtM und Assemblierung mit ArtP zu ArtMP. A) Expression von *artM* in LB-Medium: Zellysate von *E. coli* BL21(DE3) mit pVE15 zu bestimmten Zeitpunkten nach der Induktion mit IPTG. Spur 2 – vor der IPTG-Induktion, Spuren 3-8 – ein bis sechs Stunden nach der IPTG-Induktion, Spuren 9-12 – 13 bis 16 Stunden nach der Geninduktion. B) Membranpräparation und Solubilisierung von ArtM. Spur 2 – Membranfraktion, Spur 3 – Solubilisat. C) Metallchelatchromatographie von ArtM sowie Koelution von ArtP und ArtM: Spuren 2-3 – Elution von ArtM (stark konzentriert); Spuren 4-5 – Elution des vor der Affinitätschromatographie assemblierten Komplexes ArtM(P). Es wurden 15 %ige SDS-Gele verwendet. In Spur 1 wurde jeweils ein Größenstandard aufgetragen.

Die Membranpräparation und die Solubilisierung von ArtM wurden erfolgreich nach dem Protokoll für den Transportkomplex ArtMP (Lange, 2008) durchgeführt (Abb. 23 B). Anschließend erfolgte die Reinigung von ArtM mittels Metallchelatchromatographie. Dabei hat ArtM nur in geringen Mengen an die Nickel-Matrix gebunden. Auch die Verringerung der Detergenzkonzentration konnte das Bindungsverhalten nicht verbessern. Erst durch starke Konzentration der Eluatfraktionen konnte ArtM mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 23 C, Spuren 2 und 3). Zur Stabilisierung der Transmembrandomäne wurde das Solubilisat direkt mit gereinigtem ArtP, das ebenfalls einen Histidin-Tag trug, versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte der assemblierte Transportkomplex ArtMP mittels Metallchelatchromatographie erfolgreich koeluiert werden (Abb. 23 C, Spuren 4 und 5). Es wurden 4 mg ArtMP pro Liter einer ArtM-Kultur erhalten. Somit konnte die Transmembrandomäne ArtM erfolgreich separat produziert und während des Reinigungsprozesses mit ArtP zu dem Proteinkomplex ArtM(P) assembliert werden.

Die Koelution von ArtM durch ArtP machte den Histidin-Tag am Membranprotein überflüssig. Aus diesem Grund wurde auf dem Plasmid pVE15 C-terminal von *artM* ein Stopcodon eingefügt, um so ArtM ohne Histidin-Tag herzustellen. Dadurch sollten zusätzliche Reinigungsschritte zur Entfernung des Affinität-Tags und damit

verbundenem Proteinverlust vermieden werden. Das entstandene Konstrukt wurde pQE60-artM genannt. Die erfolgreiche Insertion des Stopcodons wurde mittels Gensequenzierung überprüft. Das Expressionsniveau von *artM* in LB-Medium auf pQE60-artM war mit dem von pVE15 vergleichbar (Eckey *et al.*, 2010). Anschließend wurden die Anzucht- und Expressionsbedingungen für BL21(DE3)<pQE60-artM> optimiert. Hierzu wurden zunächst verschiedene Anzuchtmedien, u.a. auch Autoinduktionsmedien, vergleichend betrachtet. Die optimierten Bedingungen wurden in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9 Aufstellung der optimierten Bedingungen für die Expression von *artM*

Bedingungen	
<i>E. coli</i> - Expressionsstamm	BL21(DE3)
Anzuchtmedium	32Y-Autoinduktionsmedium
Expressionstemperatur	30°C
Zeitpunkt der Geninduktion	Autoinduktion
Dauer der Kultivierung	min. 24 Stunden

Die Membranpräparation, Solubilisierung und Assemblierung von ArtM und ArtP wurde erfolgreich nach dem zuvor für ArtM mit Histidin-Tag entwickelten Protokoll durchgeführt (Abb. 24 A). Zusätzlich wurde das ungebundene ArtP vom assemblierten Transportkomplex ArtMP mittels Größenausschlusschromatographie getrennt. Durch Modifizierung und Optimierung der Expressions- und Präparationsverfahren konnten aus einem Liter ArtM-Kultur 25 mg ArtM(P) hergestellt werden, was ca. 11 mg ArtM je Liter entspricht. So konnte die ArtM-Menge 50fach gesteigert werden. Anschließend wurde die ATPase-Aktivität von ArtM(P) nach Nikaido *et al.* (1997) bestimmt. Der *in vitro* assemblierte Komplex ArtM(P) zeigte 87% der Aktivität von nativem ArtMP, das durch polycistronische Expression produziert wurde (Abb. 24 B). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Angaben von Eckey *et al.* (2010).

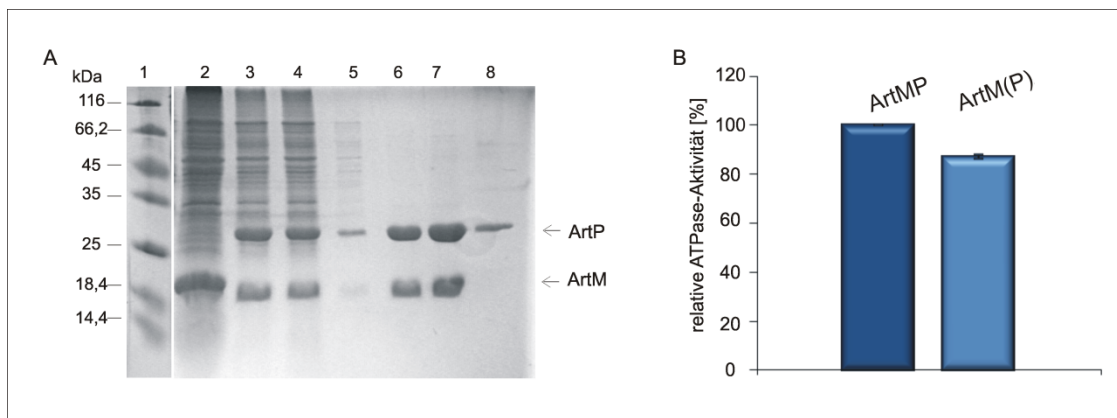


Abbildung 24: Herstellung und Bestimmung der ATPase-Aktivität von ArtM(P). A) Präparation des Komplexes ArtM(P) durch *in vitro*-Assemblierung der isolierten Untereinheiten ArtM und ArtP: Spur 1 - Größenstandard; Spur 2 - Solubilisat nach der Ultrazentrifugation; Spur 3 & 4 - Assemblierungsansatz aus Solubilisat und ArtP; Spur 5 - Waschschrift mit 20 mM Imidazol; Spur 6 - Eluatfraktion enthielt den Komplex ArtMP; Spur 7 - ArtMP nach der Größenausschlusschromatographie; Spur 8 - separiertes ArtP nach der Größenausschlusschromatographie. Es wurde ein 15 %iges SDS-Gel verwendet. B) Vergleich der ATPase-Aktivitäten von ArtMP und ArtM(P).

Nachfolgend wird die markierte Untereinheit mit entsprechender Isotopen-Markierung in Klammern gesetzt, z. B. ArtM(P_{TYP}). Mit dem optimierten Verfahren wurde als erstes ArtP_{TYP} mit unmarkiertem ArtM assembliert. Für die Untersuchung mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie wurde ArtM(P_{TYP}) in Lipiden aus *G. stearothermophilus* 2D-kristallisiert.

3.1.2.1 2D-Kristallisation von ArtMP mit Lipiden aus *G. stearothermophilus*

2D-Kristalle des Transportkomplexes von ArtMP wurden bereits erfolgreich NMR-spektroskopisch untersucht (Lange, 2008). In 2D-Kristallen sind die Proteine dicht in Lipidmembranen rekonstituiert. Dadurch werden die lokale Ordnung und eine hohe Proteindichte in der NMR-Probe erhalten. Für die 2D-Kristallisation von ArtMP wurden Lipide verwendet, die zuvor mittels Methanol und Chloroform aus dem Bakterium *G. stearothermophilus* extrahiert wurden (Abschn. 2.3.3). Die 2D-Kristallisation erfolgte durch Dialyse des in Detergenz solubilisierten Protein-Lipid-Ansatzes. Dabei betrug das Lipid-zu-Protein-Verhältnis 1:2 (w/w). In dieser Arbeit wurden 2D-Kristalle von ArtM(P_{TYP}) mit AMPPCP/Mg²⁺ hergestellt (ArtM(P_{TYP})^[AMPPCP/Mg²⁺]). AMPPCP wurde in einem zehnfachen Überschuss zur Probe und zum Dialysepuffer gegeben. Zum

Dialysepuffer wurden zusätzlich *Biobeads*[®] hinzugefügt, um das Detergenz zu absorbieren. So wurden die Detergenzien effektiv aus dem Ansatz entfernt und die Rekonstitution gefördert (Abschn. 2.7.2). Der Erfolg der 2D-Kristallisation wurde mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie überprüft. Es konnten sowohl groß- als auch kleinflächige gitterartige Bereiche nachgewiesen werden (Abb. 25; Abschn. 2.8).

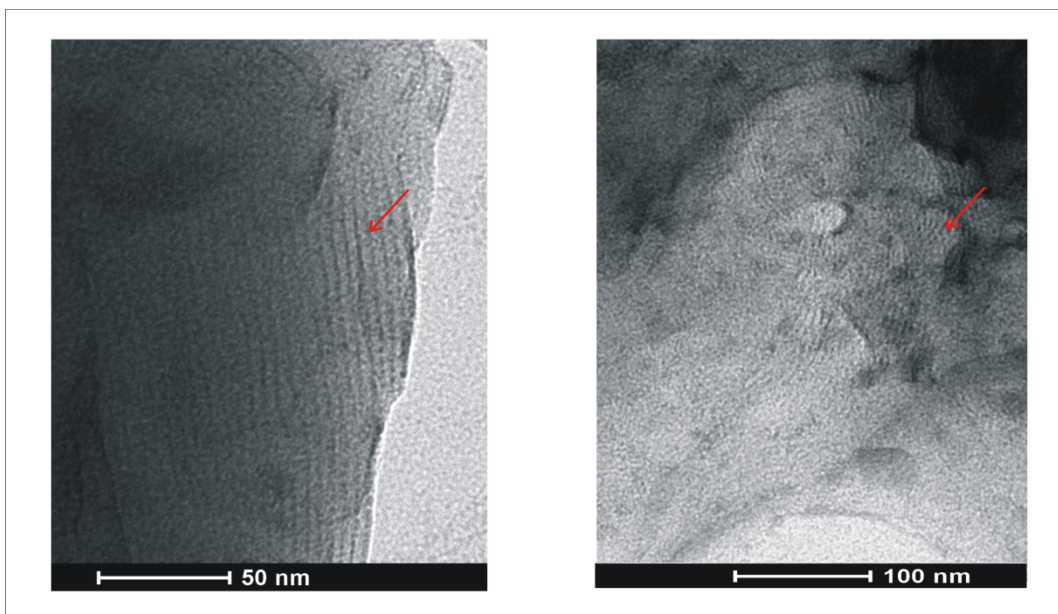


Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der 2D-Kristalle von ArtM(P_{TYP}). ArtM(P_{TYP}) wurde mit AMPPCP/Mg²⁺ in Lipiden von *G. stearothermophilus* kokristallisiert. Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus zwei verschiedenen Bereichen der Probe in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Dorothea Lorenz (AG Cellular Imaging, FMP Berlin) durchgeführt.

3.1.2.2 ¹³C-¹³C-Korrelationen von ArtM(P_{TYP}) – im prähydrolytischen Zustand

Das Spektrum ist sehr gut aufgelöst und enthält die erwarteten Signalsätze für die markierten Aminosäuren. Die PDSD-Spektren von ArtM(P_{TYP})^[AMPPCP/Mg²⁺] und ArtMP_{TYP}^[ATP/-] von Lange (2008) zeigen große Übereinstimmung hinsichtlich der Kreuzsignale für die markierten Aminosäuren in ArtP (Abb. 26). Im Spektrum von ArtMP_{TYP}^[ATP/-] treten zusätzliche Signale auf. Diese können der Membranuntereinheit ArtM, die in dieser Präparation ebenfalls markiert war, zugeordnet werden. Die sehr gute Übereinstimmung der ArtP-Signale in den Spektren beider Proben hat gezeigt, dass die Assemblierung der Untereinheiten nach der getrennten Expression keine

detektierbaren Veränderungen der Konformation von ArtP im Transportkomplex ArtMP bewirkt hat.

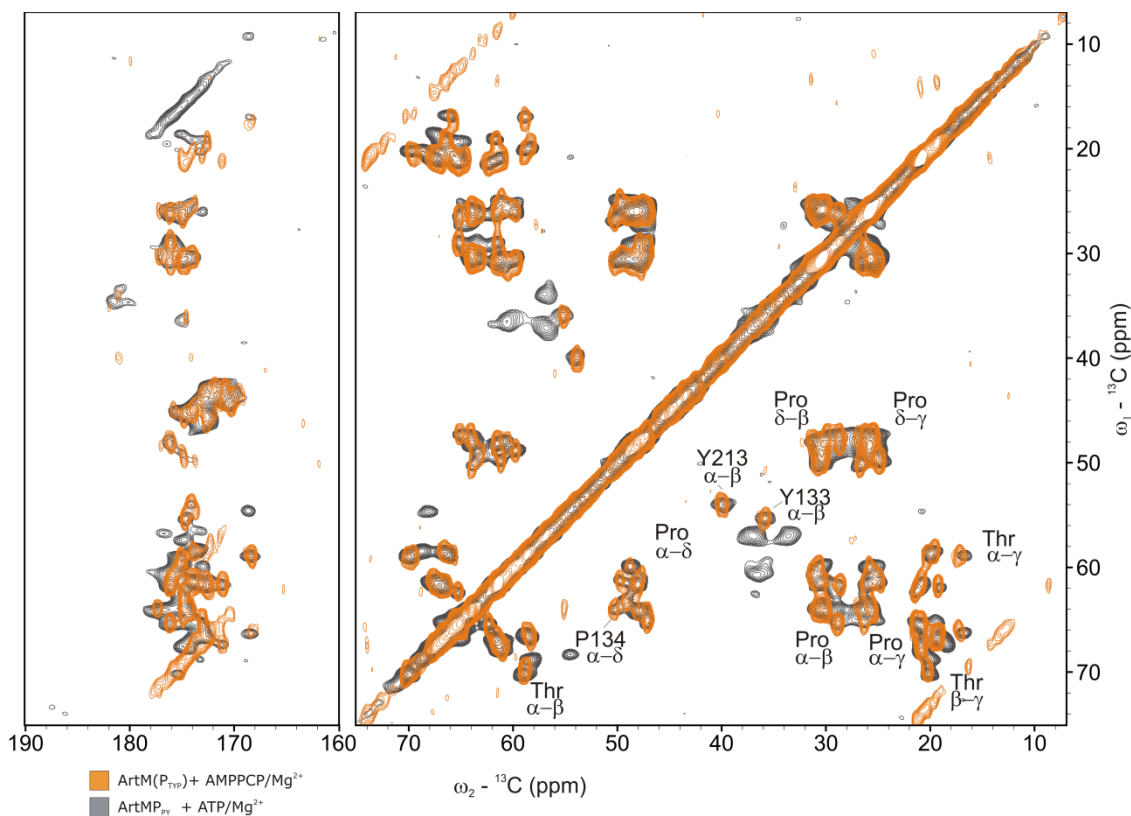


Abbildung 26: Vergleich der PDS-Spektren von ArtM(P_{TYP}) und ArtMP_{TYP} in Nukleotid-gebundenen Zustand. Überlagerung der Spektren von ArtMP_{TYP}^[ATP/-] in schwarz und ArtM(P_{TYP})^[AMPPCP/Mg²⁺] in orange. Die NMR-Messungen erfolgten bei 600 MHz bzw. 900 MHz, 280 K, einer Rotationsfrequenz von 12 kHz und einer Mischzeit von 20 ms.

In den PDS-Spektren von nukleotid-freiem ArtMP_{PY} (Lange, 2008) und ArtM(P_{TYP}) im AMPPCP/Mg²⁺-gebundenen Zustand unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen der Kreuzsignale für Tyr 133 und Tyr 213 nicht und für Pro 134 nur geringfügig (Abb. 27).

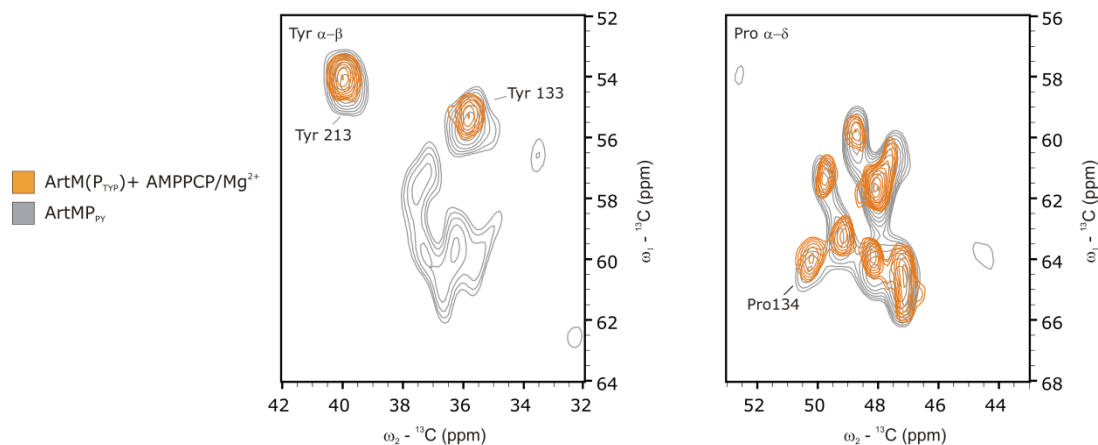


Abbildung 27: Vergleich der PDS-D-Spektren von ArtM(P_{TYP}) mit AMPPCP/Mg²⁺ und ArtMP_{PY} ohne Nukleotid. Vergleich der Spektren von ArtMP_{PY}^[⁻] in grau (Lange, 2008) und ArtM(P_{TYP})^[AMPPCP/Mg²⁺] in orange. Die NMR-Messungen erfolgten bei 600 MHz bzw. 900 MHz, 280 K, einer Rotationsfrequenz von 12 kHz und einer Mischzeit von 20 ms.

In der folgenden Tabelle wurden die chemischen Verschiebungen für die Kreuzsignale von Tyr 133 und Tyr 213 (C α -C β) sowie von Pro 134 (C α -C δ -) für die 2D-kristallinen Präparationen zusammengefasst.

Tabelle 10 Chemische Verschiebungen von Tyr 133, Tyr 213 und Pro 134

	Tyr 213	Tyr 133	Pro 134
	w1/w2[ppm]	w1/w2 [ppm]	w1/w2 [ppm]
ArtMP _{PY} ^[⁻]	54,1 / 39,9	55,5 / 35,8	64,3 / 50,2
ArtMP _{TYP} ^[ATP/-]	54,0 / 39,8	55,3 / 35,8	64,3 / 50,2
ArtM(P _{TYP}) ^[AMPPCP/Mg²⁺]	54,0 / 40,0	55,2 / 35,8	63,9 / 50,1

3.1.2.3 Unterschiede zwischen den 3D-Kristallen von ArtP_{TYP} und 2D-Kristallen von ArtM(P_{TYP})

In Abbildung 28 wurden die PDS-D-Spektren von ArtP_{TYP}-Kristallen und von ArtM(P_{TYP}) in Lipiden überlagert. Beide Proben wurden in Gegenwart von AMPPCP/Mg²⁺ hergestellt. Es gibt deutliche Unterschiede im Bereich der aliphatischen sowie der Carbonyl-Kohlenstoffatome (Abb. 28 A). Die chemischen Verschiebungen der C α -C β -Kreuzsignale für Tyr 133 stimmen für beide Präparationen überein (Abbildung 28 B).

Jedoch spaltet das Tyr 133-Signal nur im Spektrum der 3D-Kristalle des isolierten ABC-Proteins auf. Der assemblierte Komplex ArtM(P) zeigt weder Signalverdopplungen noch Linienverbreiterungen, was auf eine sehr hohe Homogenität der Probe schließen lässt. Überdies weisen einige $\text{C}\alpha\text{-C}\delta$ -Prolin-Signale und das $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ -Signal von Tyr 213 unterschiedliche chemische Verschiebungen in den beiden Spektren auf (Abb. 28 B). Die zusätzlichen Signale im Spektrum von $\text{ArtP}_{\text{TYP}}^{[\text{AMPPCP}/\text{Mg}^{2+}]}$ (grau) resultieren vermutlich aus der Metabolisierung der markierten Aminosäuren während der Expression.

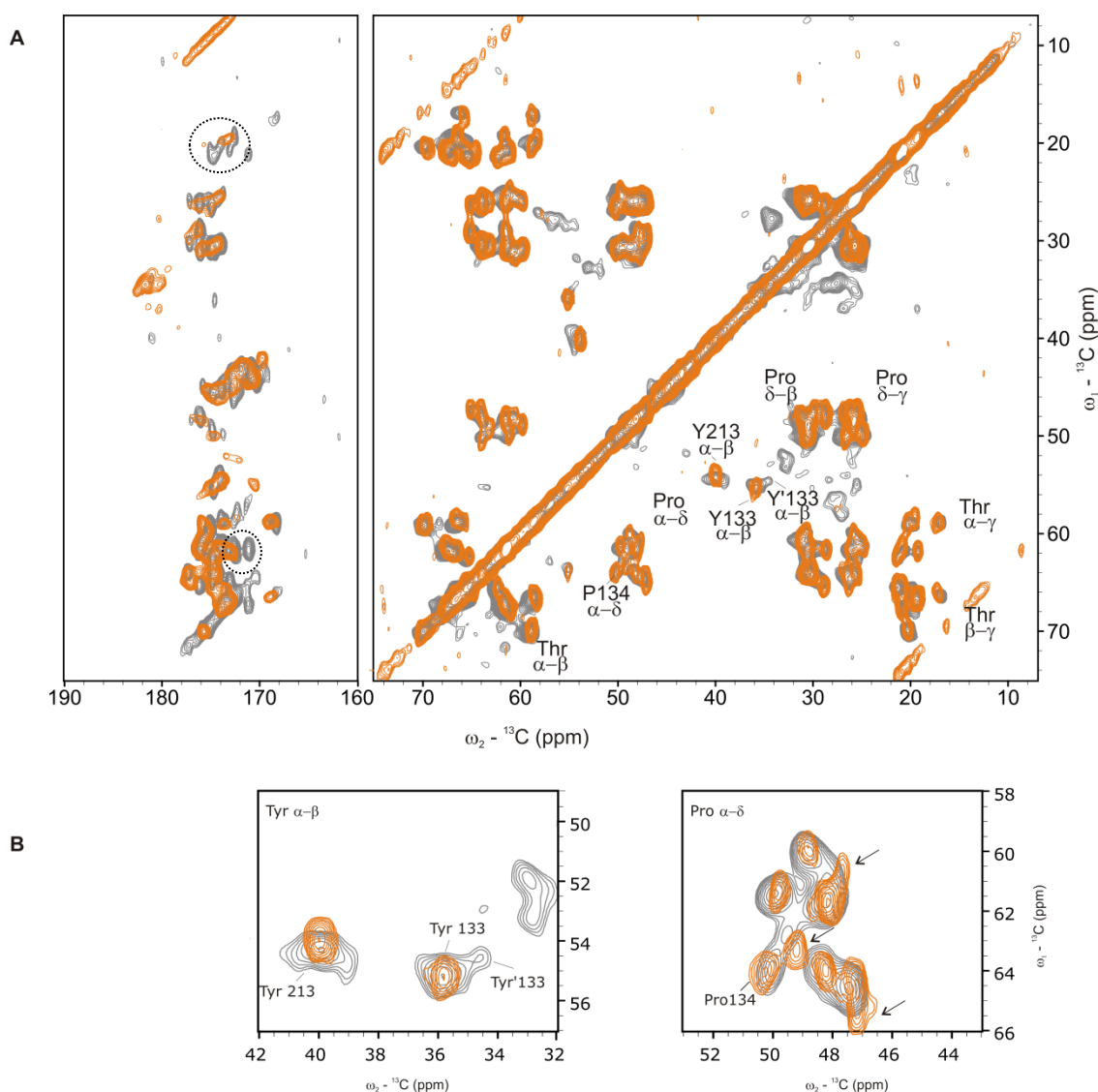


Abbildung 28: PDSD-Spektren – Vergleich der Spektren von ArtP_{TYP} und $\text{ArtM}(\text{P}_{\text{TYP}})$, kristallisiert mit $\text{AMPPCP}/\text{Mg}^{2+}$. A) Überlagerung der Spektren von ArtP_{TYP} in grau und $\text{ArtM}(\text{P}_{\text{TYP}})$ in orange B) Vergrößerte Ausschnitte der Tyrosin- und Prolinsignale. Die NMR-Messungen erfolgten bei 600 MHz bis 900 MHz, 280 K, einer Rotationsfrequenz von 12 kHz und einer Mischzeit von 20 ms.

3.2 ¹H-detektierte Festkörper-NMR-Spektroskopie an ArtMP und ArtP

In diesem Abschnitt werden die ersten H/N-Korrelationsspektren von ArtP-Kristallen sowie von ArtMP und ArtM(P) in Lipiden von *G. stearothermophilus* vorgestellt, die mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie aufgenommen wurden. In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob die Verwendung deuterierter Lipide in den 2D-kristallinen Präparationen einen Einfluss auf die Qualität der H/N-Spektren hat (Abschn. 3.2.1). In Abschnitt 3.2.2 werden die Ergebnisse zur Herstellung der ²H, ¹³C, ¹⁵N markierten ArtMP und ArtP Proben dargestellt. Der Protonierungsgrad bezogen auf die austauschbaren Protonen betrug für alle hier untersuchten Proben 30 %.

Für die Untersuchung von ArtP_{DCN} im *in vitro* assemblierten Transmembrankomplex ArtM(P_{DCN}) wurde unmarkiertes ArtM eingesetzt. Zum Vergleich der verschiedenen Präparationstypen wurden ArtP, ArtMP und ArtM(P) ohne Nukleotide 3D- bzw. 2D-kristallisiert (Abschn. 3.2.3). Im weiteren Verlauf wurde ArtM(P_{DCN}) sowohl mit AMPPCP/Mg²⁺ als auch mit ADP/Mg²⁺ präpariert, um Konformationsänderungen durch Nukleotidbindung zu verfolgen (3.2.4).

Von allen Präparationen wurden sowohl CP- als auch INEPT-basierte 2D-H/N-Korrelationen aufgenommen. Zusätzlich wurden von ArtP_{DCN} H/N-Korrelationen und Dreifachresonanz-Experimente mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie zur sequentiellen Zuordnung von ArtP durchgeführt. Die Zuordnung erfolgte durch Eliza Ploskon-Arthur (Abschn. 3.2.4).

3.2.1 Herstellung deuterierter Lipide von *Geobacillus stearothermophilus*

Wie vorausgegangene Untersuchungen zeigten, eigneten sich die Lipide von *G. stearothermophilus* von allen getesteten Lipiden am besten zur 2D-Kristallisation von ArtMP (Lange, 2008). Im Rahmen der protonendetektierten Festkörper-NMR-Experimente sollte der Einfluss deuterierter Lipide auf die Qualität der NMR-Spektren untersucht werden. Hierfür musste eine Methode zur Herstellung deuterierter Lipide in *G. stearothermophilus* entwickelt werden, da diese nicht kommerziell erhältlich sind. Bislang wurde *G. stearothermophilus* in einem Vollmedium (Abschn. 2.1.4) bei 55°C in einer Schüttelkultur angezogen (Fleischer *et al.*, 2005). Ebenso wie für Proteine musste auch für die Herstellung Isotopen-markierter Lipide ein Minimalmedium mit definierter Kohlenstoff- und Stickstoffquelle verwendet werden. In Schüttelkulturen konnten jedoch nur geringe Zelldichten von maximal OD_{600nm} 1 erreicht werden. In

einem deuterierten Medium würde sich das Wachstum der Zellen durch den zusätzlichen Stress nochmals verlangsamen. In Folge dessen sollten die Anzuchtbedingungen für *G. stearothermophilus* mittels Hochzellichtefermentation optimiert werden. Die bietet die Möglichkeit, die Temperatur, den pH-Wert, die Sauerstoffzufuhr und die Zuführung von Nährstoffen zu regulieren. Zusätzlich wurde von Matthias Dorn (AG Peter Schmieder, FMP Berlin) ein Lufttrockner entwickelt, der verhindert, dass Wasser von außen mit der Luft in die Kultur eingetragen wird. Das ist besonders wichtig, wenn ein hoher Deuterierungsgrad angestrebt wird.

3.2.1.1 Hochzellichtefermentation mit *G. stearothermophilus*

Die Etablierung eines effizienten Protokolls für die Anzucht von *G. stearothermophilus* wurde zunächst in unmarkiertem Medium durchgeführt. In dem für *E. coli* verwendeten M9-Minimalmedium war *G. stearothermophilus* jedoch nicht kultivierbar. Daraufhin wurde in Anlehnung an Al-Qodah (2006) ein Kaliumphosphat-basiertes Medium verwendet, das mit MgSO_4 , FeSO_4 und MnSO_4 supplementiert wurde. Im Verlauf der Etablierung wurde das Medium um weitere Spurenelemente nach Studier (2005) erweitert (Tab. 11). Es wurden Glukose und Ammoniumchlorid als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle eingesetzt.

Während der Hochzellichtefermentation wurde der Sauerstoffgehalt in der Kultur kontinuierlich gemessen und diente als Indikator für das Zellwachstum. Bei niedriger Sauerstoffkonzentration ist die Stoffwechselaktivität der Zellen hoch. Bei Nährstoffmangel steigt der Sauerstoffgehalt wieder und das System beginnt mit der Dosierung neuer Nährstoffe. Für die Kultivierung von *G. stearothermophilus* mit diesem Verfahren war die Konzentration von Ammoniumchlorid im Nährmedium kritisch und hemmte das Zellwachstum. Dieser Einfluss von Ammoniumchlorid auf *G. stearothermophilus* wurde auch von Al-Qodah (2006) beschrieben. Die Bestimmung des Glukose- und Ammoniumgehaltes während der Anzucht ergab, dass Glukose schneller verbraucht und die Zufütterung mit neuen Nährstoffen (Glukose-Ammoniumchlorid-Gemisch) ausgelöst wurde. Das hatte zur Folge, dass die Ammoniumchloridkonzentration anstieg und sich so vermutlich hemmend auf die Kultur auswirkte. Das optimale Verhältnis, bei dem Kohlenstoff- und Stickstoffquelle gleichzeitig verbraucht wurden, betrug in der Startkultur 2,4:1 (w/w) und bei der Zufuhr neuer Nährstoffe war das Verhältnis 4:1 (w/w). Bei höheren Glukosekonzentrationen (6-8 g/l) verlängerte sich die Prozesszeit, ohne dass die erreichte Biomasse gesteigert

werden konnte. Durch Bestimmung der Minimalkonzentration an Glukose in der Startkultur (3 g/l) konnte die Prozesszeit von etwa 43 Stunden auf 24 Stunden reduziert werden, wodurch auch der Verbrauch teurer Isotopen-markierter Glukose minimiert wurde.

Von der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen) wird die optimale Wachstumstemperatur von *G. stearothermophilus* mit 55°C angegeben. Bei dieser Temperatur konnte jedoch kein signifikantes Zellwachstum beobachtet werden. Worauf verschiedene Temperaturen zwischen 52°C und 60°C getestet wurden. Nur bei 52 °C war Zellwachstum zu beobachten und die Dosierung von Kohlenstoff- und Stickstoffquelle konnte durch das System automatisch an Hand des Sauerstoffverbrauchs reguliert werden (Abb. 29). Die detaillierten Angaben zum Protokoll und zur Programmierung der Regulation sind in Abschnitt 2.3.2 aufgeführt. Es wurden Zelldichten von OD_{600nm} 20-24 erreicht. Das entsprach einer Biofeuchtmasse von 24-28 g pro Liter Kultur.

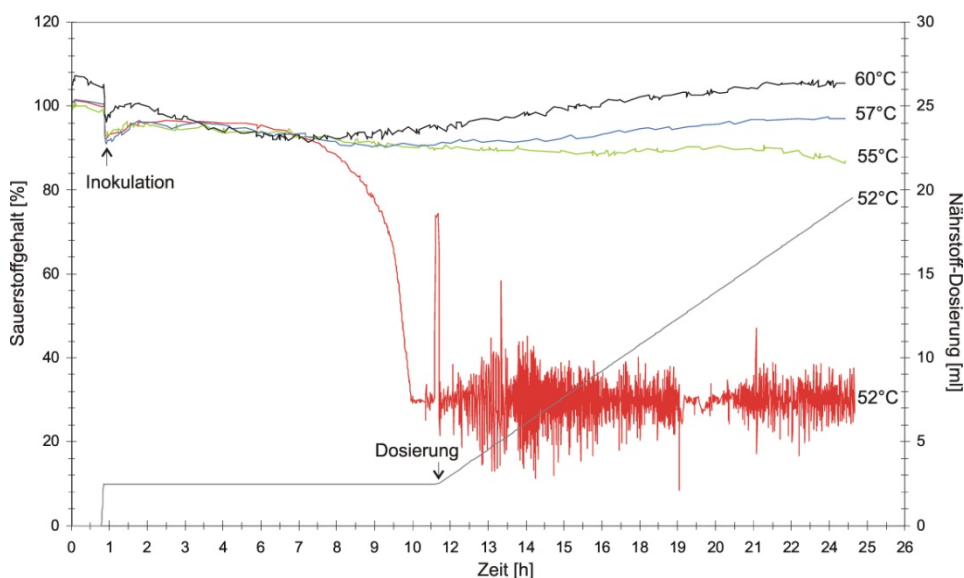


Abbildung 29: Hochzelldichtefermentation mit *G. stearothermophilus* bei verschiedenen Temperaturen. Profile für den Sauerstoffgehalt in der Kultur bei 52°C (rot), 55°C (grün), 57°C (blau) und 60°C (schwarz). Die Zeitpunkte für die Inokulation von *G. stearothermophilus* und der Start der Dosierung (grau) von Glukose und Ammoniumchlorid im Reaktor mit 52°C sind gekennzeichnet.

Für die Herstellung deuterierter Lipide wurden alle Komponenten des Anzuchtsmediums in Deuteriumoxid gelöst und als Kohlenstoffquelle wurde vollständig deuterierte Glukose (D12-Glukose) eingesetzt. Das Wachstumsverhalten von *G. stearothermophilus* war im D₂O-basierten Medium deutlich anders als im H₂O-basierten. Aus diesem Grund mussten der Gehalt von Glukose und das Verhältnis zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffquelle erneut angepasst werden. Die Glukosemenge wurde auf 8 g/l erhöht und 0,8 g/l Ammoniumchlorid eingesetzt (Tab. 11). Die Regulation der Nährstoffdosierung erfolgte nicht über den Sauerstoffverbrauch. Die Auslösung der Nährstoffzufuhr wurde auf 10 Stunden nach der Inokulation festgelegt. Es wurden durchschnittliche Zelldichten von OD_{600nm} 12 erreicht, was durchschnittlich 17 g/l Biomasse entsprach. Daraus konnten 100 mg Lipidextrakt gewonnen werden. Die erreichten Zelldichten in den verschiedenen Kultivierungsmedien wurden in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 11 Aufstellung der Parameter für die Hochzelldichtefermentation von *G. stearothermophilus*

Parameter	H ₂ O-basiert	D ₂ O-basiert
Medium	29 mM K ₂ HPO ₄ , 37 mM KH ₂ PO ₄ , 1,7 mM MgSO ₄ , 0,1 mM EDTA, 33 µM FeSO ₄ , 3,7 µM ZnCl ₂ , 0,6 µM CuSO ₄ , 50 µM FeCl ₃ , 10 µM MnCl ₂ , 10 µM ZnSO ₄ , 2 µM CoCl ₂ , 2 µM CuCl ₂ , 2 µM NiCl ₂ , 2 µM NaMO ₄ , 2 µM NaSeO ₃ , 2 µM H ₃ BO ₃ , pH 7,4	
Kohlenstoffquelle	Glukose	D12-Glukose
Stickstoffquelle	Ammoniumchlorid	Ammoniumchlorid
Startkultur	3 g/l Glukose 1,25 g/l NH ₄ Cl	8 g/l Glukose 0,8 g/l NH ₄ Cl
Dosierung von Kohlenstoff- und Stickstoffquelle	pro Reaktor à 250 ml Kultur: 0,5 g/h Glukose & 0,13 g/h NH ₄ Cl	
Temperatur	52°C	
Rührgeschwindigkeit	500 – 1000 rpm	
Luftzufuhr	20 sl/min	

Tabelle 12 Durchschnittliche Zelldichten (OD_{600nm}) von *G. stearothermophilus* in verschiedenen Kulturmedien

Medium	OD_{600nm}
Minimalmedium – H ₂ O	22
Minimalmedium – D ₂ O	12

Anschließend wurde überprüft, ob die Deuterierung der Lipide erfolgreich war. Dazu wurden $1D-^1H$ -Spektren von protonierten und deuterierten Lipidextrakten aufgenommen (Abschn. 2.9.1). Das Spektrum der Lipide aus der deuterierten Anzucht (Abb. 30, rot) zeigt deutlich weniger bis keine Signale für beispielsweise ungesättigte Fettsäuren (6,7 ppm bis 7,7 ppm), Methylengruppen (1 ppm bis 2 ppm) und terminalen Methylgruppen (0,8 ppm – 1 ppm). So konnten mit diesem Verfahren hoch deuterierte Lipide aus *G. stearothermophilus* hergestellt werden.

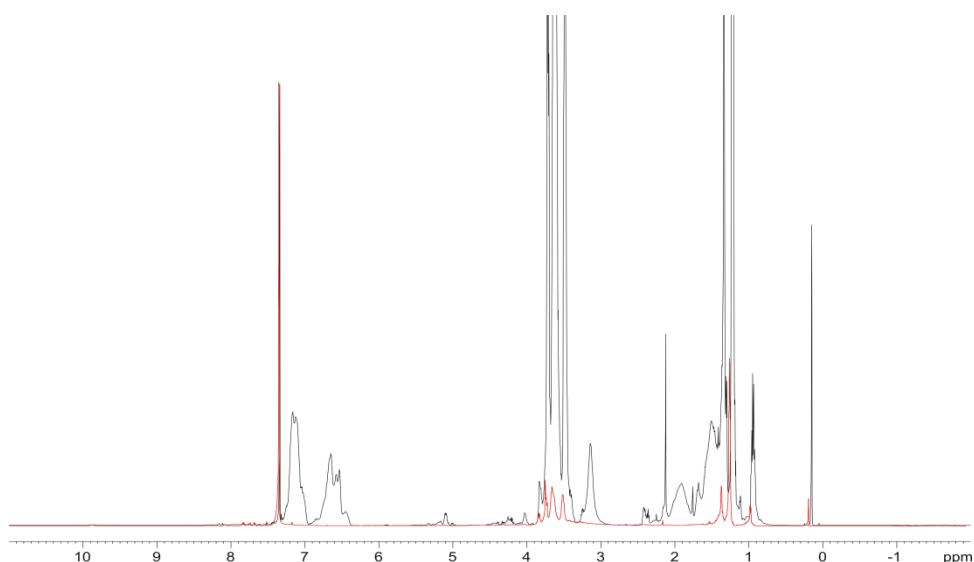


Abbildung 30: 1H -Spektren von Lipidextrakten: Vergleich protonierter (schwarz) und deuterierter (rot) Lipidextrakte aus *G. stearothermophilus*. Die Lipide waren in Chloroform gelöst. Die Messungen erfolgten bei 300 K.

Nachfolgend wurde der Einfluss der zwei verschiedenen Lipidpräparationen auf die Qualität von H/N-Korrelationspektren von ArtMP_{DCN} untersucht. Dazu wurde [²H, ¹³C ¹⁵N]-ArtMP sowohl in protonierten als auch in deuterierten Lipiden 2D-kristallisiert (Abschn. 3.2.2). Von beiden Proben wurden INEPT-basierte H/N-Korrelationspektren aufgenommen (Abb. 31; Abschn. 2.10.2). In beiden Spektren sind die Signale gut aufgelöst. Jedoch funktionierte in beiden Messungen die Wasserunterdrückung schlecht, so dass das Wassersignal bis in den Bereich der Proteinsignale hineinragt. Dennoch wird deutlich, dass sich die Auflösung der Spektren nicht signifikant unterscheidet, aber die Mehrzahl der Signale sowohl in der ¹⁵N- als auch der ¹H-Dimension verschoben sind. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Untersuchungen vorerst protonierte Lipide von *G. stearothermophilus* verwendet.

Für die Markierung von ArtMP wurde protonierte ¹³C-Glukose verwendet, so dass das Deuterierungsniveau vermutlich zwischen 70 % und 80 % lag (Lian & Middleton, 2001). Für alle weiteren Untersuchungen wurde deuterierte ¹³C-Glukose verwendet, um einen möglichst hohen Deuterierungsgrad der Proteine zu erhalten (Abschn. 3.2.2).

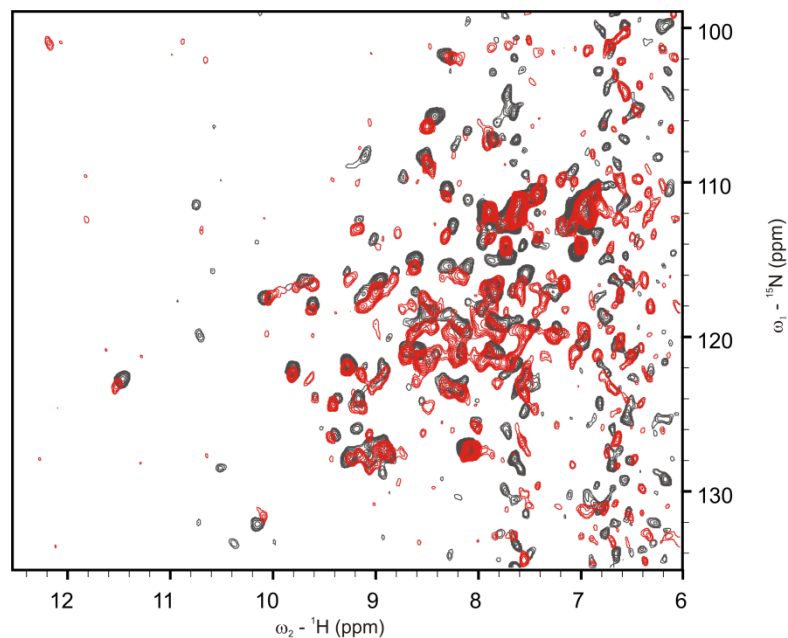


Abbildung 31: Einfluss von protonierten bzw. deuterierten Lipiden aus *G. stearothermophilus* auf H/N-Korrelationspektren von ArtMP_{DCN}. Die Messungen erfolgten bei 900 MHz (Protonenfrequenz), 280 K und einer MAS-Frequenz von 20 kHz. Es wurden von der Probe mit deuterierten Lipiden (rot) 448 Scans/Inkrement und von der mit protonierten Lipiden (schwarz) 128 Scans/Inkrement aufgenommen.

3.2.2 Markierung von ArtMP und ArtP mit den Isotopen ^2H , ^{13}C und ^{15}N

Zur Durchführung protonenendetektierter Festkörper-NMR-Experimente mussten sowohl ArtMP als auch ArtP uniform mit den Isotopen ^2H , ^{13}C und ^{15}N markiert werden. Die Verwendung von Deuteriumoxid anstelle von Wasser wirkt als zusätzlicher Stress auf die Zellen und beeinträchtigt das Wachstum sowie die Genexpression. Daher mussten zunächst die Anzucht- und Expressionsbedingungen optimiert werden

Die Expression von *artP* erfolgte von pVL4 und von *artMP* von pRF2 in *E. coli* BL21(DE3) in Schüttelkulturen. Die Markierung der Zielproteine mit den Isotopen ^{13}C und ^{15}N wurde durch Verwendung von ^{13}C -Glukose und ^{15}N -Ammoniumchlorid als einzige Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle erreicht. Zur Deuterierung wurden alle Komponenten des Nährmediums in D_2O gelöst und deuterierte ^{13}C -Glukose verwendet. Der membranintegrale Komplex ArtMP sowie die isolierte Untereinheit ArtP wurden unter deuterierten Bedingungen erfolgreich synthetisiert (Abb. 32). Die optimierten Expressionsbedingungen wurden in Tabelle 13 zusammengefasst und das detaillierte Protokoll wird in den Abschnitten 2.4.2.3 bzw. 2.4.3.2 beschrieben. Die durchschnittlich erhaltene Proteinmenge je Liter Kultur betrug für ArtMP_{DCN} 5 mg und für ArtP_{DCN} 80 mg.

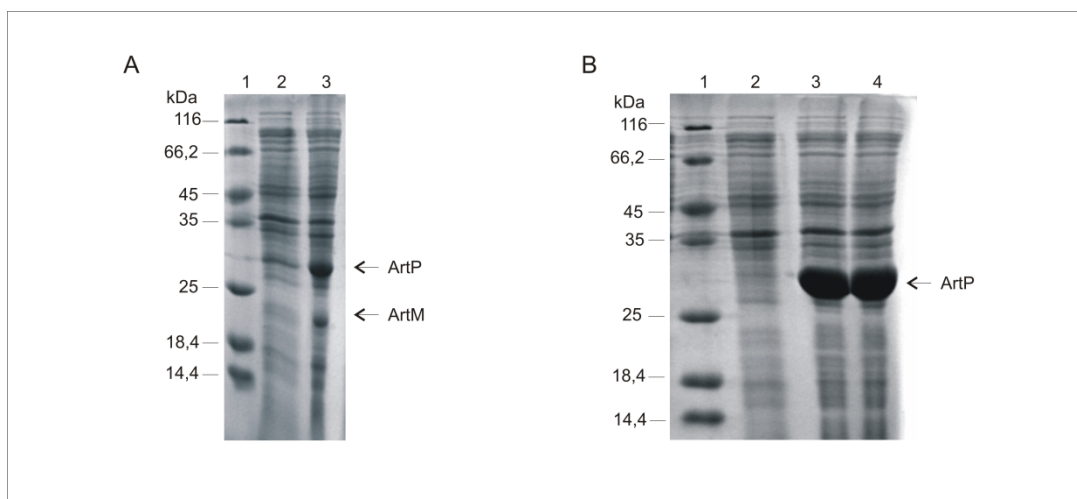


Abbildung 32: Expression von ArtMP (A) und ArtP (B) in deuteriertem M9-Medien. 15 %ige SDS-PAGE. Spur 1 - Größenstandard; Spur 2 Zell-Lysate vor der IPTG-Induktion. Spur 3 (4) - Kultur nach der IPTG-Induktion.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob durch die Verwendung des Hochzeldichtefermentationverfahrens die Menge an deuterierten ArtP_{DCN} pro Liter Kulturmedium gesteigert werden kann. Hier konnte die Zelldichte deutlich erhöht werden. Das Expressionsniveau war jedoch niedriger als in den Schüttelkulturen. Letztendlich führte die Verwendung beider Techniken zu einem vergleichbaren ArtP-Ausbeute (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 13 Zusammenfassung der Expressionsbedingungen von *artMP* und *artP*

Bedingungen	
<i>E. coli</i> - Expressionsstamm	BL21(DE3)
Anzuchtsmedien	M9-Minimalmedium mit zusätzlichen Spurenelementen (Studier, 2005)
Expressionstemperaturen	30 °C
Zeitpunkt der Geninduktion	OD _{600nm} 0,8
Induktionsdauer	ca. 20 Stunden

Die Reinigung von ArtMP und ArtP wurde nach Lange (2008) durchgeführt. Die Herstellung des *in vitro* assemblierten Membranproteinkomplexes ArtM(P_{DCN}) erfolgte nach dem in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Protokoll. Der partielle Rücktausch von austauschbaren Deuteronen zu Protonen erfolgte während der Reinigung der Proteine, in dem die verwendeten Puffer in 30 % H₂O/ 70 % D₂O angesetzt wurden (Abschn. 2.5.1).

3.2.3 Präparation der NMR-Proben: 3D-Kristallisation und 2D-Kristallisation

Für NMR-spektroskopische Untersuchungen wurde das isolierte ABC-Protein ArtP_{DCN} dreidimensional kristallisiert (Abschn. 2.7.1). Der Kristallisationspuffer war 30 % protoniert und 70 % deuteriert, um den Protonierungsgrad nach der Proteinreinigung stabil zu halten. Die 3D-Kristalle von ArtP_{DCN}^[/-] hatten die gleiche nadelförmige Gestalt wie die von ArtP_{TYP}^[AMPPCP/-] (Abb. 19 A).

Der membranintegrale Proteinkomplex ArtM(P_{DCN}) wurde ohne und mit Nukleotiden in Lipide von *G. stearothermophilus* rekonstituiert und 2D-kristallisiert (Abschn. 2.7.2). Der Dialysepuffer war ebenfalls zu 30 % protoniert und zu 70 % deuteriert. Mittels SDS-PAGE konnte für alle Präparationen die nahezu vollständige Rekonstitution des Proteins in die Lipidmembranen nachgewiesen werden. Die nukleotid-freie Präparation zeigte in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen großflächige strukturierte Bereiche (Abb. 33 A), wie sie auch für die 2D-Kristalle von ArtM(P_{TYP})^[AMPPCP/Mg²⁺] beobachtet wurden (Abb. 25). Für ArtM(P_{DCN})^[ADP/Mg²⁺] und ArtM(P_{DCN})^[AMPPCP/Mg²⁺] konnten kleine Strukturen identifiziert werden, die Membranstapeln ähnlich waren (Abb. 33 B & C). Es konnten aber für keinen der Ansätze eindeutige Defraktionsmuster gezeigt werden.

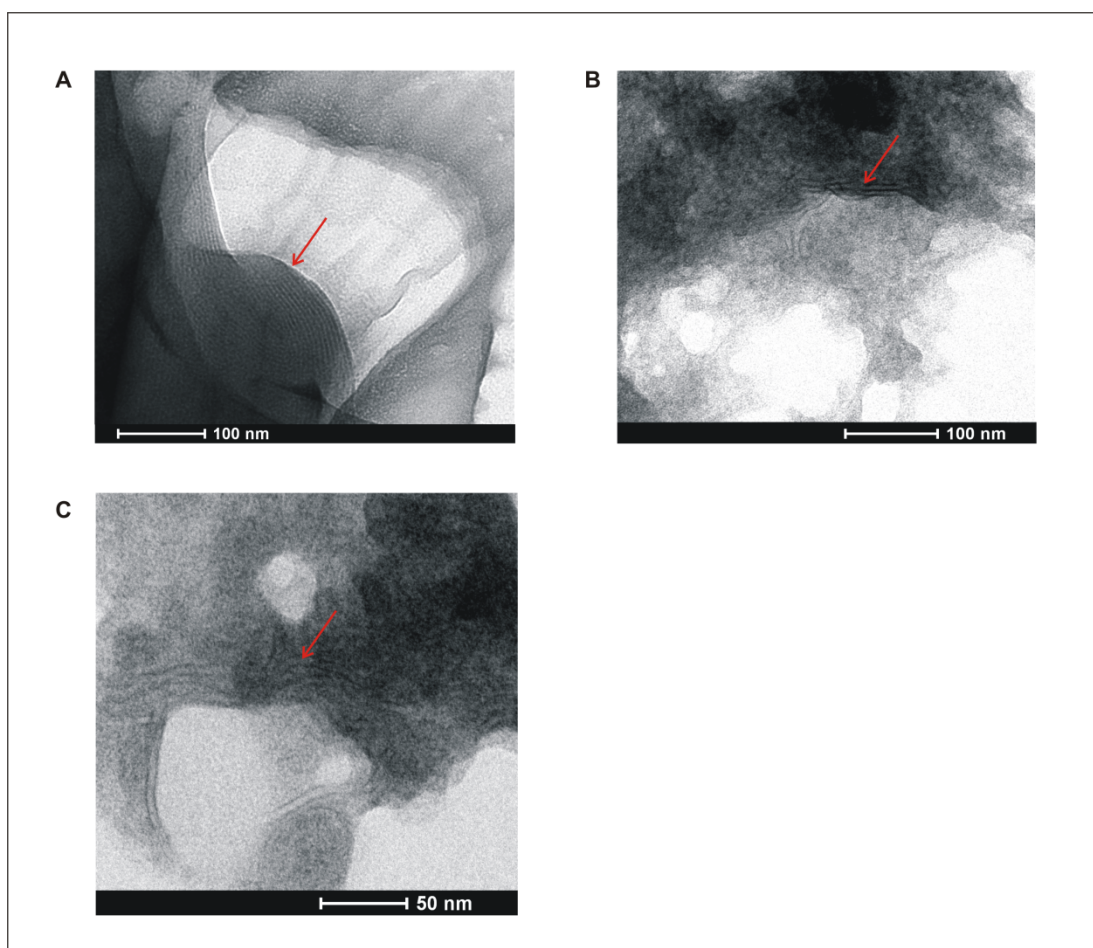


Abbildung 33: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der 2D-Kristallisationsansätze von ArtM(P_{DCN}) in verschiedenen nukleotid-gebundenen Zuständen. A) ArtM(P_{DCN}) im nukleotid-freier Form; B) ArtM(P_{DCN}) mit ADP/Mg²⁺; C) ArtM(P_{DCN}) mit AMPPCP/Mg²⁺. Die Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Dorothea Lorenz (AG *Cellular Imaging*, FMP Berlin) durchgeführt.

3.2.4 H/N-Korrelationen von ArtP_{DCN}, ArtMP_{DCN} und ArtM(P_{DCN})

3.2.4.1 Vergleich der H/N-Korrelationen von ArtP in verschiedenen Präparationen

In den CP-Spektren der isolierten Nukleotidbindedomäne ArtP_{DCN} und des Transmembrankomplexes ArtM(P_{DCN}) sind die Signale stark überlagert (Abb. 34 A & B). Dagegen zeigen die entsprechenden INEPT-Spektren deutlich weniger Signale und sind daher besser aufgelöst (Abb. 34 C & D). In H/N-Korrelationen von ArtP_{DCN} in Lösung konnten etwa 200 Signale gezählt werden (Abb. 36), so dass man in den INEPT-Spektren etwa die Hälfte der Signale sieht. Die Signalüberlagerungen machten eine genaue Bestimmung der Signalanzahl jedoch nicht möglich.

Der Vergleich der H/N-Spektren zeigt große Unterschiede für ArtP_{DCN} in 3D-Kristallen bzw. im Transmembrankomplex ArtM(P_{DCN}). Besonders in den INEPT-Spektren wird deutlich, dass eine Vielzahl von Signalen unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweisen. Überdies treten für die 3D-Kristalle Signalaufspaltungen auf, die für ArtM(P_{DCN}) nicht beobachtet werden konnten. Beispielhaft wurden zwei entsprechende Signale eingerahmt (Abb. 34). Auch konnten für ArtM(P_{DCN}) Signale detektiert werden, die in den Spektren von ArtP_{DCN} fehlen (Abb. 34; ausgewählte Signale wurden mit Pfeilen markiert).

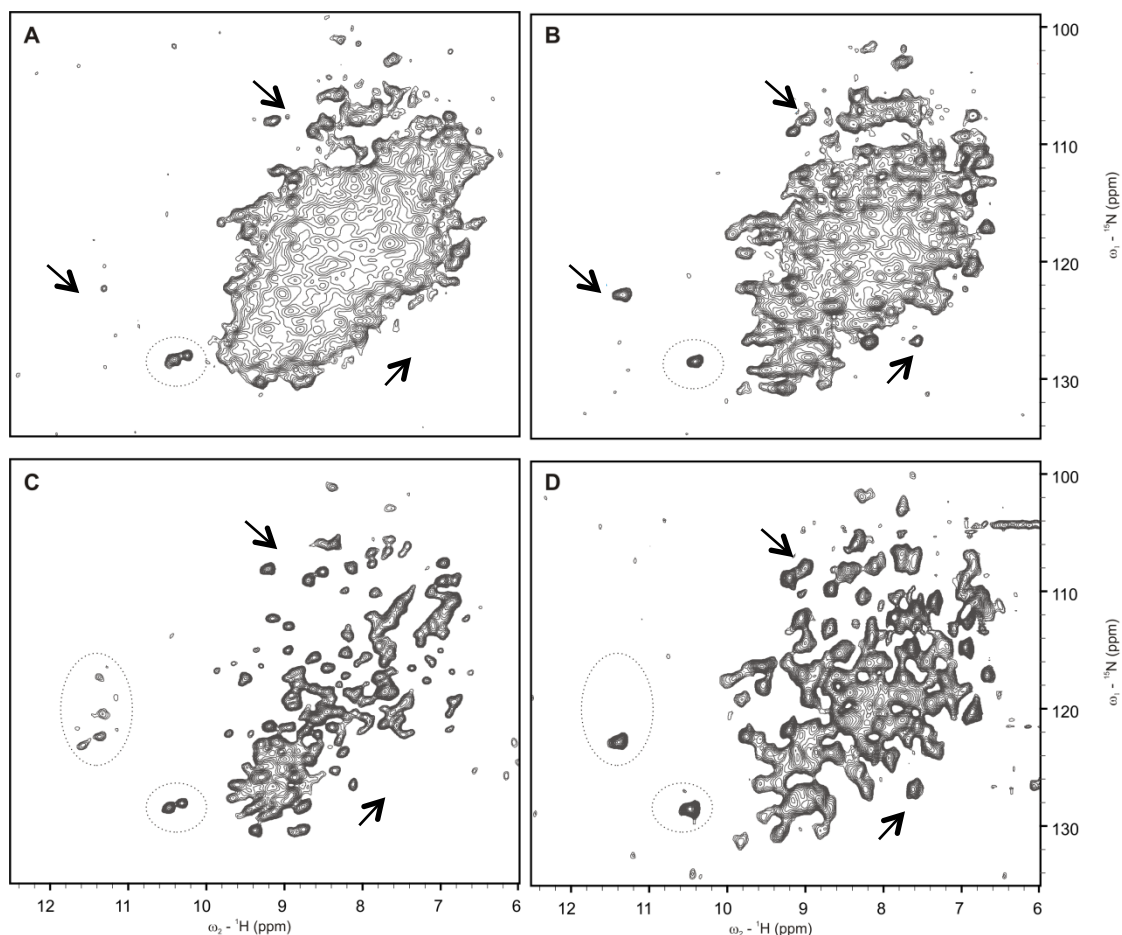


Abbildung 34: ^1H - ^{15}N -Korrelationen von ArtP_{DCN} und $\text{ArtM}(\text{P}_{\text{DCN}})$. A) CP-basiertes H/N-Spektrum von ArtP_{DCN} -Kristallen (96 Scans/Inkrement); B) CP-basiertes H/N-Spektrum von $\text{ArtM}(\text{P}_{\text{DCN}})$ in Lipiden (128 Scans); C) INEPT-basiertes H/N-Spektrum von ArtP_{DCN} -Kristallen (384 Scans/Inkrement); D) INEPT-basiertes H/N-Spektrum von $\text{ArtM}(\text{P}_{\text{DCN}})$ in Lipiden (512 Scans/Inkrement). Die H/N-Korrelationsexperimente erfolgten bei einer Protonenfrequenz von 700 MHz, 275 K und einer MAS-Frequenz von 20 kHz.

In Abbildung 35 werden die INEPT-basierten H/N-Korrelationen von $\text{ArtMP}_{\text{DCN}}$ (grün) und $\text{ArtM}(\text{P}_{\text{DCN}})$ (schwarz) vergleichend betrachtet. Die H/N-Spektren beider Präparationen überlagern sehr gut und es können im vollständig markierten Komplex $\text{ArtMP}_{\text{DCN}}$ die Signale von ArtP identifiziert werden. Die wenigen zusätzlichen Signale im Spektrum für $\text{ArtMP}_{\text{DCN}}$ können den Membranuntereinheiten ArtM zugeordnet werden. Trotz der guten Übereinstimmung der beiden Spektren, gibt es für den *in vitro* assemblierten Komplex $\text{ArtM}(\text{P}_{\text{DCN}})$ wenige zusätzliche Signale und ein verschobenes Signal. Diese Bereiche wurden im linken Spektrum mit Pfeilen markiert.

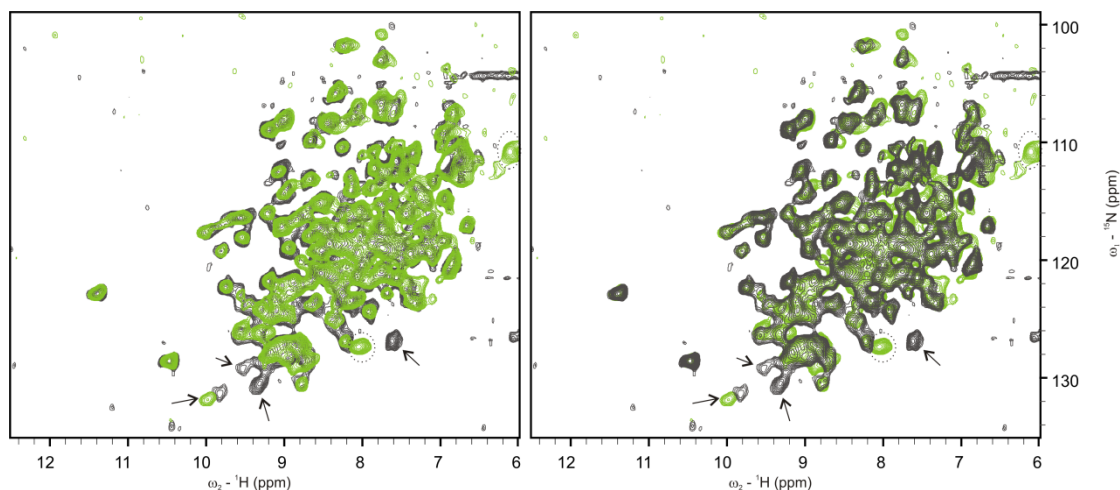


Abbildung 35: Vergleich der INEPT-basierten H/N-Korrelationen von ArtMP_{DCN} und ArtM(P_{DCN}). In grün ist das Spektrum für ArtMP_{DCN} und in schwarz für den in vitro assemblierten Komplex ArtM(P_{DCN}) dargestellt. Das ArtMP_{DCN}-Spektrum wurde von Anja Voreck zur Verfügung gestellt.

Weiterhin wurden von ArtP_{DCN} H/N-Korrelationen mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie gemessen, um diese mit dem Spektrum von ArtM(P_{DCN}) zu vergleichen (Abschn. 2.10.3). Die Verteilung der Signale in den Spektren zeigt große Übereinstimmungen. So konnte die Zuordnung für einzelne Signale auf das H/N-Spektrum von ArtM(P_{DCN}) übertragen werden. Die Zuordnung erfolgte durch Eliza Ploskon-Arthur. In Tabelle 14 wurden die ¹H- und ¹⁵N-chemischen Verschiebungen der zugeordneten Signale zusammengefasst.

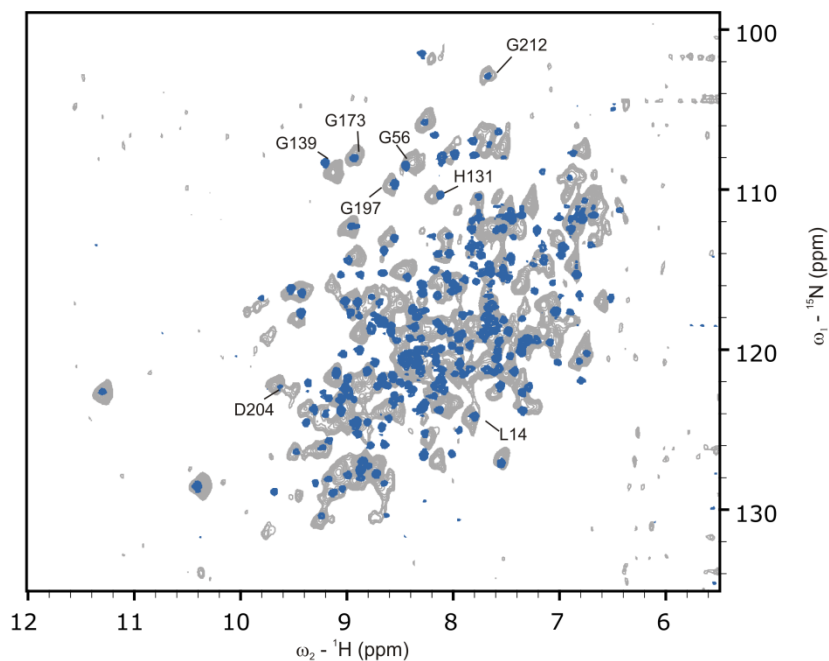


Abbildung 37: Vergleich der H/N-Korrelationsspektren von ArtM(P_{DCN}) in Lipidmembranen und Art P_{DCN} in Lösung. Die Messung erfolgte bei 700 MHz Protonenfrequenz, bei 275 K und einer Rotationsfrequenz von 20 kHz aufgenommen. Die Lösungs-NMR-Experimente erfolgten an einem 600 MHz-Spektrometer bei 280 K.

Tabelle 14 Chemische Verschiebungen der in Lösung zugeordneten Aminosäurereste

	^1H [ppm]	^{15}N [ppm]
Leucin 14	7,9	125
Glycin 56	8,4	109
Histidin 131	8,2	111,2
Glycin 139	9,2	109
Glycin 173	8,8	108
Glycin 197	8,7	110,2
Aspartat 204	9,6	123

3.2.4.2 H/N-Korrelationen von ArtM(P_{DCN}) mit verschiedenen Nukleotiden

Von ArtM(P_{DCN}) wurden H/N-Korrelationen im nukleotid-freien, im prähydrolytischen (AMPPCP/Mg²⁺) sowie im posthydrolytischen Zustand (ADP/Mg²⁺) gemessen. Die Linienbreiten der aufgelösten Signale in den Spektren für ArtM(P_{DCN})^[AMPPCP/Mg²⁺] und ArtM(P_{DCN})^[ADP/Mg²⁺] variierten zwischen 40 Hz und 90 Hz für Protonen und zwischen 25 Hz und 50 Hz für Stickstoff. Während der Messung von ArtM(P_{DCN}) war die Driftkompensation schlecht. Daher wurden für Prozessierung des Spektrums nur ein Drittel der Datenpunkte in der indirekten Dimension verwendet, um die Drift-abhängigen Artefakte auszuschließen. Aus diesem Grund ist die Auflösung des abgebildeten Spektrums im Vergleich schlechter.

Die Spektren der nukleotid-gebundenen Präparationen zeigen Signalverschiebungen gegenüber dem nukleotid-freien ArtM(P_{DCN}) (Abb. 37 A & B). Einige der beeinflussten Signale wurden beispielhaft eingerahmt. Von den zugeordneten Signalen wurde die chemische Umgebung von Leu 14, Gly 197 und Gly 212 durch Nukleotidbindung an ArtP verändert. Die H/N-Spektren der nukleotid-gebundenen Präparationen sind dagegen nahezu identisch. Dennoch konnten Unterschiede für wenige Signale beobachtet sowie zusätzliche Signale im Spektrum von ArtM(P_{DCN})^[ADP/Mg²⁺] identifiziert werden (Abb. 37 C).

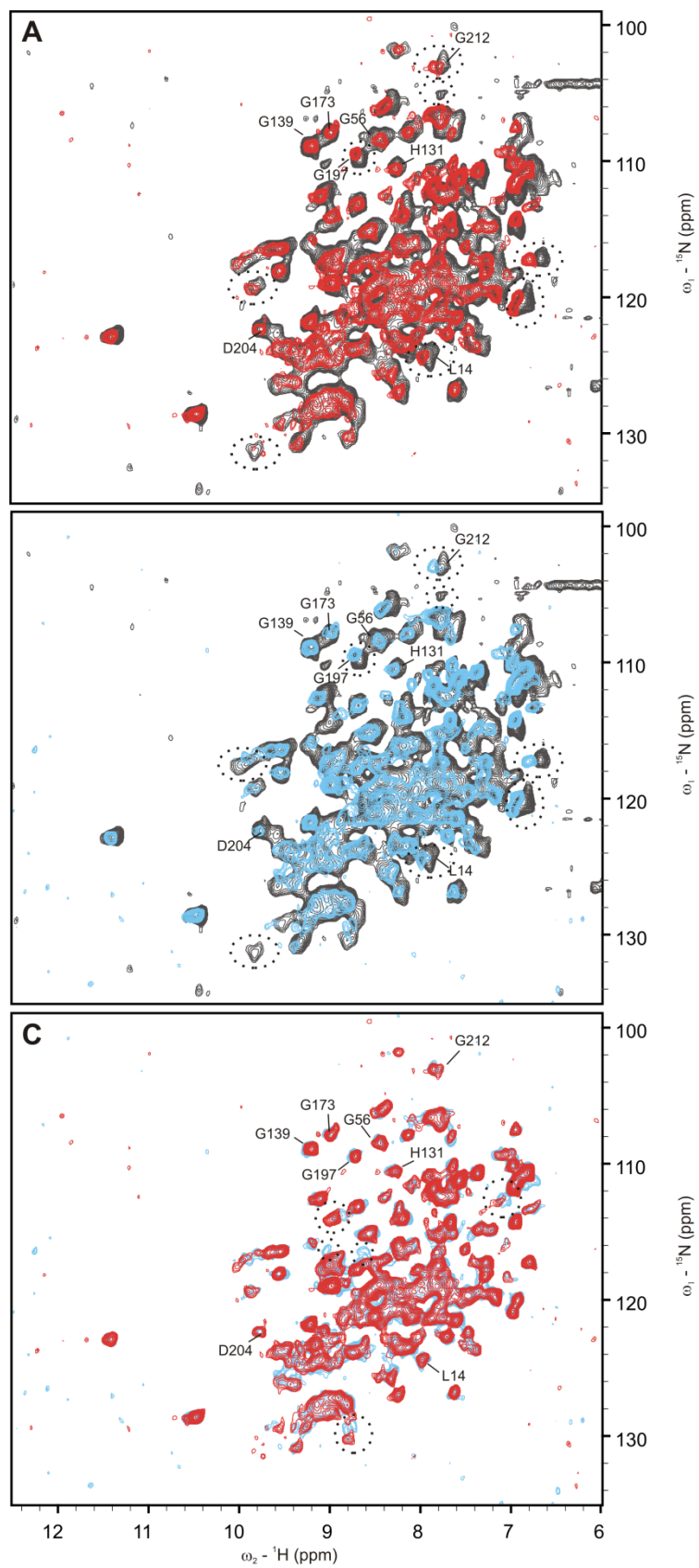


Abbildung 37: INEPT basierte H/N-Korrelationen von ArtM(P_{dcn}) nukleotid-freien und nukleotid-gebundenen Zustand. A) ArtM(P_{DCN})^[AMPPCP/ Mg^{2+}] (rot) vs. ArtM(P_{DCN})^[-/-] (schwarz); B) ArtM(P_{DCN})^[ADP/ Mg^{2+}] vs. ArtM(P_{DCN})^[-/-], C) ArtM(P_{DCN})^[AMPPCP/ Mg^{2+}] vs. ArtM(P_{DCN})^[ADP/ Mg^{2+}].

4. Diskussion und Perspektiven

ABC-Transporter sind in eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen involviert und so von großem medizinischem Interesse. Jedoch sind die molekularen Mechanismen, die den Transport von Substanzen über die Zellmembran bewirken, noch immer nicht im Detail aufgeklärt. Dazu gehören insbesondere die strukturellen Änderungen, die nach ATP-Bindung/-Hydrolyse in den Nukleotidbindedomänen aufgrund der Kommunikation zwischen den TMDs und den NBDs im Porenbereich bewirkt werden. Weiterhin gibt es noch wenige Informationen über die Wechselwirkung mit dem Substrat bei der Öffnung bzw. Schließung des Translokationskanals. So konnte bis heute lediglich in der Membranproteindomäne MalF des Maltose-Transporters MalFGK₂ eine Substratbindestelle identifiziert werden (Oldham *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit wurde der ABC-Transporter ArtMP-J aus dem thermophilen Bakterium *G. stearothermophilus* mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. Der große Vorteil dieser Technik beruht darauf, dass Membranproteine in einer nativen Lipidumgebung strukturell und dynamisch untersucht werden können (McDermott, 2009; Judge & Watts, 2011). Das ist besonders wichtig, da die Struktur/Stabilität und Aktivität von Membranproteinen durch die Zusammensetzung und Struktur der umgebenden Lipidmembranen beeinflusst wird (z. B. Lee, 2003; Lee, 2004; Pilot *et al.*, 2001). Für den ABC-*multidrug*-Transporter HorA wurde nachgewiesen, dass eine Veränderung der Lipidkomposition sogar zu einer substrat-unabhängigen ATPase-Aktivität von HorA führte (Gustot *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit diente ArtMP-J vor allem auch als Modellsystem zur Etablierung von verschiedenen Konzepten zur strukturellen Charakterisierung von ABC-Transportern mittels Festkörper-NMR. So ist es nach wie vor nicht trivial, eine Zuordnung der Signale solch großer Systeme zu erhalten. Darüber hinaus sollen durch Distanzmessungen zwischen den Membranuntereinheiten Informationen zur Öffnung und Schließung des Transportkanals erhalten werden. Weiterhin werden langfristig neue Erkenntnisse zum Kopplungsmechanismus zwischen der Transmembrandomäne ArtM und der Nukleotidbindedomäne ArtP durch Untersuchung ihrer Kontaktfläche erwartet. Die Identifizierung einer Substratbindestelle im Translokationskanal würde Aufschluss über den Einfluss der Transmembrandomänen in Bezug auf die Substratspezifität geben. Zudem ist es von großem Interesse, den Mechanismus der ATP-Bindung/-Hydrolyse für ArtMP-J und die damit verbundenen strukturellen Veränderungen in der NBD ArtP aufzuklären. So soll hierbei insbesondere die

Symmetrie des ArtMP-Dimers des intakten Transmembrankomplexes eingebettet in Lipide aus *G. stearothermophilus* untersucht werden.

4.1 Der ABC-Transporter ArtMP-J als Modellsystem für NMR-spektroskopische Untersuchungen

Für die Wahl von ArtMP-J als Modellsystem gibt es mehrere Gründe. So wurde der Transporter zum einen wegen seiner hohen Stabilität ausgewählt. Dadurch ist es möglich, NMR-spektroskopische Untersuchungen über einen Zeitraum von mehreren Wochen durchzuführen und NMR-Techniken zu verwenden, die starke heteronukleare Entkopplung verlangen, wobei die Probe im Rotor durch hohe Energieeinstrahlung aufgeheizt wird. Zum anderen wird durch den symmetrischen Aufbau des Transporters die Signalanzahl in den NMR-Spektren reduziert. So werden im Spektrum nur die Signalsätze für ein Monomer (458 Aminosäurereste) statt für das Homodimer (916 Aminosäurereste) erwartet. Dennoch ist die Anzahl der Reste für das Monomer sehr groß und würde zu starken Signalüberlagerungen führen, welche die Analyse der NMR-Daten erschweren oder sogar unmöglich machen. Aus diesem Grund wurde zunächst die isolierte NBD ArtP in kristalliner Form zur Untersuchung der Nukleotid-Bindung verwendet (Lange, 2008; Lange *et al.*, 2010). Nach dem Modell für die Substrattranslokation spielt die Kommunikation zwischen den NBDs und TMDs aber während des Translokationsprozesses eine entscheidende Rolle, so dass das isolierte ArtP möglicherweise in artifiziellen Konformationen kristallisiert (Abschn. 4.3.2). Folglich wurde in der vorliegenden Arbeit ein Protokoll zur separaten Herstellung von ArtM und der *in vitro* Assemblierung von ArtM und ArtP zu einem intakten Transmembrankomplex etabliert. Dadurch wurden die Voraussetzungen für die separate Untersuchung der Untereinheiten ArtM und ArtP in einem aktiven Transportkomplex geschaffen (Abschn. 4.3).

Zur Untersuchung von ArtP allein und im Transmembrankomplex wurden zwei verschiedene Festkörper-NMR-Techniken verwendet. Zum einen wurden die Proteine selektiv mit den Aminosäuren Threonin, Tyrosin sowie Prolin ^{13}C , ^{15}N -markiert und anschließend für PDSD-basierte ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsexperimente verwendet. Auf diese Weise wurden Monitore für die Detektion von Konformationsänderungen durch Nukleotid-Bindung in ArtP eingeführt. In einem weiteren Ansatz wurden erstmals ^1H -detektierte Festkörper-NMR-Untersuchungen an ArtP allein und im Transmembrankomplex durchgeführt (Abschn. 4.5).

Für die Festkörper-NMR-Experimente an ArtMP soll der Transporter in Lipide aus *G. stearothermophilus* eingebettet werden, um NMR-Untersuchungen in einer nativen Umgebung zu ermöglichen. Im Rahmen vorausgegangener Screening-Experimente zeigte sich, dass die Lipide aus *G. stearothermophilus* am besten für die 2D-Kristallisation des Transportkomplexes geeignet sind (Lange, 2008). Weiterhin ist für thermophile Organismen bekannt, dass sie die Zusammensetzung ihrer Zellmembran an die in ihrem Lebensraum herrschenden hohen Temperaturen angepasst haben. Die Stabilität der Lipidmembranen wird durch Verlängerung der Acylketten der Lipide, Variation des Verhältnisses von iso- und anteiso Verzweigung sowie des Sättigungsgrades der Acylketten erhöht (Aerts *et al.*, 1985; Jurado *et al.*, 1991; Driessen & Albers, 2007).

4.2 Herstellung protonierter und deuterierter Lipide aus *G. stearothermophilus*

Der Transporter ArtMP wurde für die Untersuchungen mit Festkörper-NMR in Lipide aus *G. stearothermophilus* rekonstituiert. So wird eine Betrachtung des Membranproteinkomplexes in seiner nativen Umgebung ermöglicht. Hinsichtlich der Durchführung ^1H -detektierter Festkörper-NMR-Experimente am membranintegralen Transportkomplex ArtMP_{DCN} wurde analysiert, inwieweit deuterierte Lipide die Qualität der entsprechenden H/N-Spektren von 2D-kristallinen Präparationen des ArtMP_{DCN} beeinflussen.

Dazu wurde in dieser Arbeit erfolgreich ein effizientes Verfahren zur Herstellung von protonierten und deuterierten Lipiden in *G. stearothermophilus* mittels HZDF etabliert (Abschn. 3.2.1). Weil die Kultivierung des Organismus in dem für *E. coli* verwendeten M9-Minimalmedium nicht möglich war, wurde basierend auf Al-Qodah (2006) sowie Studier (2005) ein geeignetes Anzuchtmedium zusammengestellt und den Bedürfnissen von *G. stearothermophilus* angepasst. Nach der Optimierung der Sauerstoffzufuhr, der Temperatur sowie der Dosierung von Kohlenstoff- und Stickstoffquelle konnten sowohl unter protonierten als auch deuterierten Bedingungen reproduzierbar hohe Zelldichten von OD_{600nm} 22 bzw. 12 erreicht werden (Tab. 12). Nach Extraktion der Lipide wurde deren Deuterierungsgrad mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie untersucht (Abb. 30). Insgesamt konnten durchschnittlich 200 mg Lipid mit einem hohen Deuterierungsgrad aus einem Liter Kultur gewonnen werden. Bezogen auf eine NMR-Probe von 20 mg Protein würde diese Menge für fünfzehn

Präparationen ausreichen. Aus einem protonierten Ansatz wurde die doppelte Menge an Extrakt gewonnen.

Die H/N-Korrelationsspektren von ArtMP_{DCN} rekonstituiert und 2D-kristallisiert in protonierten bzw. deuterierten Lipiden zeigten keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Signalauflösung. Jedoch sind einige Signale deutlich verschoben, was auf eine Veränderung der chemischen Umgebung durch die deuterierten Lipide hinweist (Abb. 31). Für die weiteren Untersuchungen wurden daher protonierte Lipide zur Rekonstitution des Transmembrankomplexes verwendet. Die deuterierten Lipide können in der Zukunft zur Analyse der Orientierung und Dynamik des Transportkomplexes ArtMP in Lipidmembranen mittels ²H-Festkörper-NMR verwendet werden. Ähnliche Untersuchungen wurden in der Vergangenheit bereits intensiv zur Charakterisierung der Interaktion zwischen Lipiden und Peptiden bzw. Proteinen, wie z.B. antimikrobiellen Peptiden sowie Phospholamban genutzt (Watts, 1998; Abu-Baker & Lorigan, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2001; Ouellet *et al.*, 2010).

Darüber hinaus kann das Protokoll zur Kultivierung von *G. stearothermophilus* die Grundlage für die rekombinante Herstellung thermostabiler Enzyme in *diesem* Organismus sein, wie z.B. atypische Lipasen und α -Amylasen, die für die biotechnologische und pharmakologische Forschung von großer Bedeutung sind (Al-Qodah, 2006; Brigidi *et al.*, 1997; Nawani *et al.*, 2006).

4.3 Spezifische Markierung der Untereinheiten und *in vitro* Assemblierung von ArtMP

Mit dem Ziel der Reduzierung der NMR-Signale im NMR-Spektrum wurde in dieser Arbeit erfolgreich eine Präparationsmethode entwickelt, welche die Herstellung eines aktiven Transportkomplexes möglich macht, der aus einer markierten und einer unmarkierten Untereinheit zusammengesetzt ist (Abb. 22). Damit war es nicht nur möglich, markiertes ArtP (240 AS) im Komplex mit unmarkiertem ArtM (218 AS) in einer nativen Lipidumgebung zu untersuchen (Abschn. 3.1.2), sondern auch die Signale eindeutig der Untereinheit ArtP zuzuordnen.

Die *in vitro* Assemblierung der separat hergestellten Untereinheiten ArtM und ArtP wurde erstmals von Eckey *et al.* (2010) beschrieben. Dabei zeigte sich, dass die Herstellung von ArtM ein limitierender Faktor ist. Die erhaltenen 0,2 mg ArtM pro Liter Kultur, reichen jedoch nicht aus, um eine isotopen-markierte NMR-Probe (15 mg bis 20 mg Protein) zu präparieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Präparation

optimiert. Den Ausgangspunkt bildete das Plasmid pVE15 (Eckey *et al.*, 2010), das die Information für ArtM mit einem sechsfachen Histidin-*Tag* trägt. In einem ersten Schritt wurden die Expressionsbedingungen für die Herstellung von ArtM (pVE15) in *E. coli* BL21(DE3) angepasst. Während des Reinigungsprozesses stellte sich heraus, dass das Protein nicht an die Nickel- bzw. Cobalt-Affinitätsmatrix bindet. Die Ursache dafür ist vermutlich die Unzugänglichkeit des Affinitäts-*Tags* am Protein. Dieses Problem konnte umgangen werden, indem ArtM unter Verwendung von Detergenz aus der Membran solubilisiert und anschließend sofort mit separat gereinigtem ArtP (auch mit sechsfachem Histidin-*Tag*) assembliert wurde. Der so erhaltene Komplex ArtM(P) konnte erfolgreich über den Histidin-*Tag* von ArtP an die Metallchelatrix gebunden und so die beiden Untereinheiten gemeinsam koeluiert werden. Nach der Größenausschlusschromatographie wurden 4 mg assemblierter ArtM(P)-Komplex präpariert, in dem ca. 1,8 mg ArtM enthalten sind. Auf diese Art konnte die Ausbeute an ArtM um das neunfache bezüglich der Ergebnisse von Eckey *et al.* (2010) gesteigert werden. Da der Affinitäts-*Tag* von ArtM einerseits vermutlich nicht zugänglich und somit überflüssig war und um andererseits zusätzliche Präparationsschritte zur Abspaltung des *Tags* zu vermeiden, wurde ArtM ohne Affinitäts-*Tag* synthetisiert. Nach intensiver Optimierung der Bedingungen für die Anzucht und Expression in *E. coli* BL21(DE3) konnte die erhaltene Menge an ArtM im Komplex im Vergleich zu den Ergebnissen von Eckey *et al.* (2010) sogar auf das 50fache gesteigert werden.

Die an dem assemblierten ArtM(P) gemessene ATPase-Aktivität betrug 87 % des in *E. coli* polycistronisch exprimierten Transportkomplexes und entsprach damit den Angaben von Eckey *et al.* (2010) (Abb. 24). Anschließend wurden sowohl ArtP_{TYP} als auch ArtP_{DCN} mit der unmarkierten Membranproteinuntereinheit ArtM assembliert und in Lipiden aus *G. stearothermophilus* 2D-kristallisiert. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der 2D-kristallinen Präparationen zeigten geordnete Bereiche (Abb. 25 & 33). Obwohl keine der untersuchten Proben Defraktionsmuster aufwiesen, reichte die lokale Ordnung aus, um hoch aufgelöste NMR-Spektren aufzunehmen.

Anschließende NMR-Untersuchungen zeigten, dass bei der *in vitro* Assemblierung von ArtM und ArtP ein nahezu nativer Transportkomplex erzeugt wurde. Für ¹³C-¹³C-Korrelationen von ArtM(P_{TYP})^[AMPPCP/Mg²⁺] und ArtMP_{TYP}^[ATP/-] konnten keine Unterschiede für die ArtP-Signale beobachtet werden (Abb. 26). Auch der Vergleich INEPT-basierter H/N-Korrelationen von nukleotid-freiem ArtM(P_{DCN}) und ArtMP_{DCN} zeigten sehr gute Übereinstimmungen mit nur geringfügigen Abweichungen (Abb. 35). Somit wurde eine

Methode etabliert, die eine ausgezeichnete Möglichkeit darstellt, um ArtP im Transportkomplex zu untersuchen.

Mit der Etablierung der separaten Isotopen-Markierung von ArtM wird zukünftig nicht nur die strukturelle Charakterisierung des Membranproteins an sich, sondern auch die selektive Untersuchung der Interaktionsfläche von ArtM und ArtP möglich sein. Dies erlaubt, Informationen über die Kopplung der Konformationsänderungen in verschiedenen Schritten der Substrattranslokation zu erhalten. Dafür müssen beide Untereinheiten uniform, aber mit unterschiedlichen Isotopen markiert werden (^{15}N bzw. ^{13}C). Unter Verwendung von heteronuklearem Magnetisierungstransfer können Korrelationen von Aminoäureresten bestimmt werden, die an der Interaktion beteiligt sind. Derartige Untersuchungen wurden bereits mit Thioredoxin, mit Crh (*catabolite repression HPr-like protein*) und mit der Histidin-Kinase DscU durchgeführt (Marulanda *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007; Etzkorn *et al.*, 2004; Etzkorn *et al.*, 2008).

4.4 Konformationsänderungen in ArtP durch Nukleotid-Bindung

4.4.1 3D-kristalline Präparationen von ArtP_{TYP}

Für die Untersuchung von ArtP_{TYP} in verschiedenen nukleotid-gebundenen Konformationen wurden zunächst 3D-Kristalle der isolierten NBD verwendet, um die Signalzahl in den NMR-Spektren gering zu halten. Die NMR-spektroskopischen Messungen der 3D-kristallinen Präparationen von ArtP_{TYP} mit unterschiedlichen Nukleotiden lieferten hoch aufgelöste ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsspektren (Abb. 21).

Von Lange (2008) wurde ArtP_{PY} ohne Nukleotid hergestellt, um so den Grundzustand des Proteins darzustellen. Aufgrund von Untersuchungen mit analytischer Ultrazentrifugation (AUZ, Eckey, 2009) ist anzunehmen, dass nukleotidfreies ArtP als Monomer in der NMR-Probe vorlag. Im Gegensatz dazu wurde unter Zugabe von ATP und dem ATP-Analogikum AMPPCP die Dimerisierung des Proteins in den AUZ-Untersuchungen nachgewiesen (Eckey, 2009). Die PDSD-Spektren der nukleotid-freien und ATP-gebundenen ArtP_{TYP}-Kristalle zeigten signifikante Unterschiede für die Signale von Pro 134 und Tyr 213, wobei für letzteres zwei deutlich separierte Kreuzsignale detektiert wurden (Abb. 21). Zusätzliche Signale nahe der Diagonale implizierten den Austausch zwischen zwei Konformationen von ArtP_{TYP}^[ATP/-] (Lange *et al.*, 2010). Diese Signalaufspaltung konnte in keiner der anderen ArtP_{TYP}-Präparationen beobachtet werden. Auch unterschieden sich die chemischen Verschiebungen von

Tyr 133 und Pro 134 im Vergleich zu den PSD-Spektren von $\text{ArtP}_{\text{TYP}}^{[\text{AMPPCP}/]}$, $\text{ArtP}_{\text{TYP}}^{[\text{AMPPCP}/\text{Mg}^{2+}]}$ und $\text{ArtP}_{\text{TYP}}^{[\text{ADP}/\text{Mg}^{2+}]}$. Anhand von Röntgenkristallstrukturanalysen von ArtP wurde gezeigt, dass ATP sowie ATP- γ -S während des Kristallisationsprozesses zu ADP bzw. -ADP- γ -S hydrolysiert wurden. In dieser Struktur bildet ArtP ein „halb offenes“ Dimer. Aus AUZ-Daten geht im Gegensatz dazu hervor, dass ArtP im ADP-gebundenen Zustand als Monomer vorliegt. Von Eckey (2009) wurde die Struktur als posthydrolytisches Dimer von ArtP beschrieben, das noch nicht vollständig dissoziiert war (pdb: 2Q0H, 2OLJ, Thaben *et al.*, 2008). Betrachtet man nun die Ergebnisse der NMR-Messungen an ArtP, kann angenommen werden, dass ATP hier ebenfalls zu ADP hydrolysiert ist.

Die Aufspaltung des Tyr 133-Signals in den PSD-Spektren von ArtP_{TYP} im prähydrolytischen Zustand (AMPPCP- bzw. AMPPCP/ Mg^{2+} -gebunden) deutet auf ein asymmetrisches Dimer hin, in dem die chemische Umgebung von Tyr 133 in den beiden Monomeren verschieden ist. In der Aminosäuresequenz befindet sich Tyr 133 direkt vor der ABC-Signatur, die mit der Adenosinuntereinheit der Nukleotide interagiert (Abb. 17). Auch geht aus der Röntgenkristallstruktur von ArtP mit AMPPNP/ Mg^{2+} hervor, dass Tyr 133 mit Arg 45 und Leu 50 im gegenüberliegenden Monomer über van der Waals Wechselwirkungen interagiert (Eckey, 2009; pdb: 3C41, Thaben *et al.*, 2009, Abb. 38). So könnte Tyr 133 sowohl Veränderungen im selben als auch im anderen Monomer anzeigen.

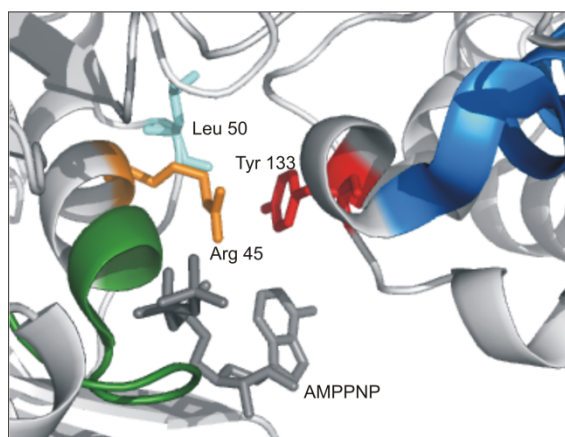


Abbildung 38: Ausschnitt aus der Röntgenkristallstruktur des ArtP-Dimers im AMPPNP/ Mg^{2+} -gebundenen Zustand. Die ABC-Signatur ist in blau und das Walker A-Motiv in grün dargestellt.

Der Vergleich der ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen von $\text{ArtP}_{\text{TYP}}^{[\text{AMPPCP/-}]}$ und $\text{ArtP}_{\text{TYP}}^{[\text{AMPPCP}/\text{Mg}^{2+}]}$ zeigt überdies in der Nukleotidbindetasche deutliche Unterschiede besonders für Tyr 133 und Pro 134. Für die isolierte NBD des Hämolyisin (Hly) B-Transporters aus *E. coli* wurden anhand von Röntgenkristallstrukturanalysen gezeigt, dass im HlyB-Dimer die Koordination von Wassermolekülen in Anwesenheit von Mg^{2+} verändert ist (Zaitseva *et al.*, 2006). Vermutlich wird auch im ArtP-Dimer im prähydrolytischen Zustand erst durch Mg^{2+} die katalytische Geometrie in der Nukleotidbindetasche ausgebildet.

In dem NMR-Spektrum der 3D-Kristalle von ArtP_{TYP} mit $\text{ADP}/\text{Mg}^{2+}$ wurden keine Signalaufspaltungen beobachtet (Abb. 21). Die Signale von Tyr 133 und Pro 134 waren sowohl im Vergleich zum nukleotid-freien als auch dem $\text{AMPPCP}/\text{Mg}^{2+}$ -gebundenen Zustand signifikant verschoben. So kann in den PDS-Spektren der 3D-kristallinen Präparationen eindeutig zwischen der nukleotid-freien, der prähydrolytischen und der posthydrolytischen Konformationen von ArtP unterschieden werden.

4.4.2 Asymmetrie oder Symmetrie innerhalb des ArtP-Dimers?

Die NBD-Monomere sind im Dimer invers zueinander angeordnet (*head-to-tail*). Damit werden die zwei Nukleotidbindetaschen jeweils durch das Walker A-Motiv des einen Monomers und der ABC-Signatur des anderen Monomers gebildet. Die ATP-Moleküle wirken dabei als „molekularer Klebstoff“, um die Monomere zusammenzuhalten (Smith *et al.*, 2002). Zurzeit werden verschiedene Modelle zur ATP-Bindung und -Hydrolyse kontrovers diskutiert (Abschn. 1.1.3). Senior *et al.* (1995) postulierten, dass die zwei ATP-Moleküle sequentiell hydrolysiert werden (van Veen *et al.*, 2000; Übersicht: Jumpertz *et al.*, 2009). Da die meisten ABC-Proteine Homodimere bilden, würde die sequentielle ATP-Hydrolyse asymmetrische Konformationen im NBD-Dimer erfordern (Zaitseva *et al.*, 2006). Doch das steht im Gegensatz zu den Röntgenkristallstrukturen vollständiger Transportsysteme, wie ModBC-A und MalFGK₂-E (Hollenstein *et al.*, 2007; Oldham & Chen, 2011; Khare *et al.*, 2009). Diese implizieren die symmetrische Dissoziation der NBDs, um das TMD-Dimer zum Zytoplasma zu öffnen (Jones *et al.*, 2009).

In der Röntgenkristallstruktur der isolierten NBDs des ABC-Transporters Hämolyisin B (HlyB) aus *E. coli* konnten im prähydrolytischen Zustand ($\text{ATP}/\text{Mg}^{2+}$) Asymmetrien beobachtet werden (Zaitseva *et al.*, 2006). Dabei war die ATP-Bindung *per se*

symmetrisch. Dagegen war besonders der D-Loop in starke asymmetrische Interaktionen zwischen den Monomeren involviert. Auf dieser Grundlage postulieren Zaitseva *et al.* (2006) einen asymmetrischen Austrittstunnel für anorganisches Phosphat im ATP/Mg²⁺-gebundenen Zustand des HlyB-Dimers. Darüber hinaus wurden mittels *molecular dynamics* (MD)-Simulationen für die prähydrolytische Konformation des Exporters Sav1866 asymmetrische Interaktionen nachgewiesen (Aittoniemi *et al.*, 2010).

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurde, konnte auch in den ¹³C-¹³C-Spektren vom 3D-kristallinem ArtP_{TYP} mit AMPPCP und mit AMPPCP/Mg²⁺ eine Asymmetrie für das ArtP-Dimer beobachtet werden, was auf unterschiedliche chemische Umgebungen in beiden Monomeren hindeutet. Die Röntgenkristallstrukturen zeigen dagegen für ArtP mit AMPPNP/Mg²⁺ ein symmetrisches, aber für ArtP mit ADP-g -S ein asymmetrisches Dimer (Eckey, 2009).

So stellte sich die Frage, ob es sich bei der asymmetrischen Konformation im ArtP_{TYP}-Dimer um einen funktionalen Zustand handelt. Aus diesem Grund wurde der *in vitro* assemblierte Proteinkomplex ArtM(P_{TYP}) im prähydrolytischen Zustand mit AMPPCP/Mg²⁺ in nativen Lipiden präpariert. Der Vergleich der PDSD-Spektren von ArtP_{TYP}^[AMPPCP/Mg²⁺] und ArtM(P_{TYP})^[AMPPCP/Mg²⁺] zeigt signifikante Unterschiede. Besonders fällt auf, dass für ArtP im Komplex mit der Membranuntereinheit keine Signalaufspaltungen und so auch keine Asymmetrie für Tyr 133 auftreten. Weiterhin hatten die Signale sowohl für Tyr 213 als auch für mehrere Proline unterschiedliche chemische Verschiebungen. Diese Beobachtungen konnten während der Untersuchungen des isolierten ArtP_{DCN} und des *in vitro* assemblierten Komplexes ArtM(P_{DCN}) mittels ¹H-detektierter Festkörper-NMR-Spektroskopie bestätigt werden (Abschn. 3.2.4). Die INEPT-basierten H/N-Spektren der nukleotid-freien 3D-Kristalle von ArtP_{DCN} weisen mehrfach Signalaufspaltungen auf, die für den Komplex ArtM(P_{DCN}) nicht detektiert wurden. Auch haben viele Signale in den beiden Spektren unterschiedliche chemische Verschiebungen. Überdies konnten für ArtM(P_{DCN}) zusätzliche Signale detektiert werden.

Die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchungen machen deutlich, dass sich die Konformation des isolierten ArtP in 3D-Kristallen sowohl ohne Nukleotid als auch mit AMPPCP/Mg²⁺ in 3D-Kristallen im Vergleich zum nativen Transmembrankomplex ArtM(P) in einer Lipidumgebung unterscheidet. Ursächlich dafür ist vermutlich der fehlende Kontakt zur Membranuntereinheit ArtM in den 3D-Kristallen.

Dennoch können zu diesem Zeitpunkt partielle Asymmetrien im ArtP-Dimer während des Translokationszyklus nicht ausgeschlossen werden. Dafür sind Untersuchungen von ArtM(P) in intermediären sowie posthydrolytischen Zuständen notwendig.

4.4.3 Konformationsänderungen in ArtMP & ArtM(P) durch Nukleotid-Bindung

Die ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen der 3D-kristallinen Präparationen von ArtP_{TYP} zeigten deutliche Unterschiede, die auf signifikante Konformationsänderungen durch die Nukleotidbindung zurückzuführen sind. Der Vergleich der PDSD-Spektren von ArtMP_{PY}^[$^{-}$] mit den nukleotid-gebundenen Präparationen ArtMP_{TYP}^[ATP $^{-}$] und ArtM(P_{TYP})^[AMPPCP/Mg $^{2+}$] zeigte keine Signalverschiebungen für Tyr 133 oder Tyr 213. Lediglich Pro 134 wies eine geringfügig abweichende chemische Verschiebung (Abb. 26 & 27) auf. Auch in den INEPT-basierten H/N-Korrelationen von ArtM(P_{DCN}) ohne Nukleotid und ArtM(P_{DCN}) mit AMPPCP/Mg $^{2+}$ bzw. ADP/Mg $^{2+}$ wurden nur wenige verschobene Signale beobachtet (Abb. 37). Zudem sind die Spektren der prähydrolytischen (AMPPCP/Mg $^{2+}$) und der posthydrolytischen (ADP/Mg $^{2+}$) Präparationen bis auf wenige Abweichungen identisch. So scheint die Bindung von Nukleotiden in ArtMP keine starken Konformationsänderungen in ArtP hervorzurufen. Das liegt vermutlich daran, dass ArtP im Transmembrankomplex durch die Arretierung an ArtM weniger Freiheitsgrade als das isolierte ArtP besitzt, welches so auch in artifiziellen Konformationen kristallisieren kann.

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Röntgenstrukturanalysen von BtuCD-F, in denen keine substantiellen Konformationsänderungen in der NBD BtuD mit bzw. ohne Nukleotid beobachtet werden konnten (Hvorup *et al.*, 2007). Daraus schließen die Autoren, dass die Substrat-induzierte ATP-Hydrolyse eher die Flexibilität als die Struktur der NBDs beeinflusst. Auch ^2H -Festkörper-NMR-Studien an LmrA zeigten, dass die Mobilität der NBDs durch ATP-Bindung (AMPPNP) abnimmt und nach ATP-Hydrolyse die ursprüngliche Flexibilität zurückerlangt wird (Siarheyeva *et al.*, 2007). So könnten zukünftige Relaxationstudien mit ArtM(P) vor, während und nach der Substrattranslokation Aufschluss über die Flexibilität von ArtP geben, um weitere Erkenntnisse über die mögliche Dimerisierung zu erhalten.

4.5 Erste H/N-Korrelationen vom ABC-Transporter ArtMP

In den letzten Jahren wurde die ^1H -detektierte Festkörper-NMR-Spektroskopie stetig weiterentwickelt (Abschn. 1.3.3). Die Linien-verbreiternden ^1H - ^1H -dipolaren Kopplungen können durch Deuterierung der Probe reduziert werden, so dass die Aufnahme hoch aufgelöster Spektren möglich wird. Die zusätzliche Dimension erhöht die Dispersion der chemischen Verschiebungen, wodurch auch Zuordnungsstrategien aus der Lösung-NMR zugänglich werden. Darüber hinaus hat die Methode das Potenzial zur Untersuchung von sehr empfindlichen Proben, da keine heteronuklearen Entkopplungen verwendet werden müssen, die durch hohe Energieeinstrahlung die Probe beschädigen können. Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich Untersuchungen publiziert, die an mikrokristallinen Proteinen durchgeführt worden sind (Chevelkov *et al.*, 2006, Linser *et al.*, 2008; Schanda *et al.*, 2009). Kürzlich wurden auch hoch aufgelöste 2D-H/N-Korrelationen des *outer membrane protein G* (OmpG) und von Bacteriorhodopsin in Lipidmembranen gezeigt (Linser *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurden erfolgreich die ersten ^1H -detektierten Festkörper-NMR-Untersuchungen an einem ABC-Transporter durchgeführt.

Dazu war es notwendig sowohl die zytoplasmatische Untereinheit ArtP als auch den membranintegralen Komplex ArtMP mit den Isotopen ^{13}C , ^{15}N und ^2H zu markieren (Abschn. 3.2.2). Das Expressionsprotokoll von Lange (2008) konnte nicht verwendet werden, da die zusätzliche Deuterierung zu verlangsamtem Zellwachstum und niedriger Expression führten. Durch Optimierung des Expressionsprotokolls konnten letztendlich ausreichend hohe Mengen von dreifach markierten ArtP (80 mg/l Kultur) und ArtMP (5 mg/l Kultur) erhalten werden. So war die gewonnene Menge an ArtP unter deuterierten und protonierten Bedingungen sogar vergleichbar hoch. Die Deuterierung von ArtM konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr etabliert werden. Daher wurde für die *in vitro* assemblierten Proben protoniertes ArtM verwendet. Der Protonierungsgrad wurde bezogen auf die austauschbaren Protonen auf 30 % eingestellt. Nach Akbey *et al.* (2010) ist ein Protonierungsgrad von 30 % und 40 % der beste Kompromiss zwischen Sensitivität und Auflösung bei MAS-Frequenzen von 24 kHz.

Es wurden 2D-H/N-Korrelationen von ArtP_{DCN} in 3D-Kristallen und im Komplex mit der Membranuntereinheit ArtM, eingebettet in native Lipide aus *G. stearothermophilus* 2D-H/N-Korrelationen, gemessen. Dabei wurden für den Magnetisierungstransfer Kreuzpolarisation sowie INEPT verwendet. Die CP-Spektren zeigten für alle Präparationen starke Signalüberlagerungen und nur vereinzelt separierte Signale für

ArtP (240 AS). Im Vergleich dazu wiesen die INEPT-Spektren deutlich weniger Signale auf und waren somit besser aufgelöst. Der INEPT-Transfer setzt ausreichend lange T_2 -Relaxationszeiten voraus, so dass schnell relaxierende Kerne nicht mehr detektiert werden, die dann nur im CP-Spektrum erscheinen. So werden im INEPT-Experiment vermutlich tendenziell Aminosäurereste mit höherer Dynamik gefiltert. Für die α -Spektrin SH3-Domäne als auch für OmpG waren die Unterschiede zwischen den beiden Spektrentypen wesentlich geringer (Linser, 2010). So scheint ArtP stark unterschiedlich dynamische Bereiche zu haben. Die Linienbreiten der separierten Signale für die 2D-kristallinen Präparationen betragen für Protonen 40 Hz bis 90 Hz und für Stickstoff 25 Hz bis 50 Hz. Die Linienbreiten sind im Vergleich zum mikrokristallinen SH3 (Linser *et al.*, 2011) größer, was vermutlich auf Heterogenitäten in der Probe zurückzuführen ist.

Die INEPT-basierten H/N-Korrelationen des vollständig markierten ArtMP_{DCN} und des *in vitro* assemblierten Komplex ArtM(P_{DCN}) sind nahezu identisch. Es erscheinen wider Erwarten nur wenige zusätzliche Signale für das Membranprotein ArtM. Aufgrund der stark überlagernden Signale im CP-basierten Spektrum von ArtMP_{DCN} wird nicht klar, ob darin mehr Signale von ArtM detektiert wurden. Möglicherweise war auch der Rücktausch von Protonen in den hydrophoben Bereichen nicht effizient genug. Ähnliches wurde für Bacteriorhodopsin beobachtet, für das auch deutlich weniger Signale als erwartet in H/N-Korrelationen (Festkörper-NMR) beobachtet werden konnten (Linser *et al.*, 2011). Aufschluss darüber werden erst Untersuchungen von markiertem ArtM im Komplex mit unmarkiertem ArtP geben. Auch könnten in der Zukunft zur partiellen Protonierung des Proteins Anzuchtsmedien mit dem gewünschten Verhältnis von D₂O:H₂O verwendet werden, um Probleme beim Rücktausch von Protonen zu umgehen und so größere Bereiche des Proteins zugänglich zu machen (Asami *et al.*, 2010)

Die INEPT-Spektren von ArtM(P_{DCN}) mit Nukleotiden zeigten für viele Signale eine gute Auflösung, so dass möglicherweise unter Verwendung von 2D-HSQC-NOESY-Experimenten einige Signale zugeordnet werden könnten. Die Durchführung von Dreifachresonanz-Experimenten über skalare Kopplungen mit hoher Auflösung wie HNCO/HNCACO und HNCA/HNCACB werden vermutlich durch das schlechte Signal-zu-Rausch-Verhältnis der INEPT-basierten Experimente schwer möglich sein. Zudem wird dieses Problem durch den geringen Anteil von markiertem ArtP_{DCN} am gesamten Probenvolumen noch verstärkt. Es werden etwa 2/3 des Rotorvolumens von Lipiden und der unmarkierten Membranuntereinheit ArtM eingenommen. So mussten für die

Aufnahme hoch aufgelöster INEPT-Spektren 512 Scans/Inkrement verwendet werden, so dass die 2D-Experimente zwei Tage dauerten. Für die effizientere Durchführung von Dreifachresonanz-Experimenten könnte PRE (*paramagnetic relaxation enhancement*) eingesetzt werden, um die $^1\text{H-T}_1$ -Relaxationszeit der Probe zu verkürzen und so die Wiederholung der Experimente mit kürzeren Wartezeiten zu ermöglichen (Linser *et al.*, 2007).

4.5.1 Detektion von Konformationsänderungen durch Nukleotid-Bindung in ArtM(P_{DCN})

Das Festkörper-NMR-Spektrum von ArtM(P_{DCN}) und das Lösungs-NMR-Spektrum von ArtP_{DCN} zeigten eine ähnliche Verteilung der Signale, von denen einige eindeutig überlagerten. So konnte die Zuordnung einzelner Aminosäurereste von den Lösungs-NMR-Experimenten auf die Festkörper-NMR-Spektren übertragen werden (Abb. 36). Die Zuordnung der Lösungs-NMR-Spektren erfolgte durch Eliza Ploskon-Arthur.

Auf Grund der guten Auflösung des INEPT-Spektrums von *in vitro* assemblierten ArtM(P_{DCN}) ohne Nukleotid wurde dieser auch in Gegenwart von AMP/PCP/Mg²⁺ und ADP/Mg²⁺ in Lipiden von *G. stearothermophilus* 2D-kristallisiert, um Konformationsänderungen durch Nukleotidbindung zu untersuchen (Abschn. 3.2.4.2). Wie bereits in Abschnitt 4.4.3 beschrieben wurden nur wenige Signale durch Nukleotid-Bindung beeinflusst. Die größten Unterschiede gab es zwischen der nukleotid-freien und nukleotid-gebundenen Konformation, unabhängig vom Nukleotidtyp. Von den zugeordneten Signalen wurden das Gly 197/212 und das Leu 14 durch Nukleotid-Bindung in ArtP beeinflusst (Abb. 39). Leu 14 befindet sich in einem *Loop* in unmittelbarer Nähe zum Nukleotid. Gly 197 liegt in einer α -Helix in der Nähe der potentiellen Kontaktfläche von ArtP mit ArtM und ist so vermutlich sensitiv gegenüber Konformationsänderungen in diesem Bereich. Diese Signale zeigten in den H/N-Spektren von ArtM(P_{DCN})^[AMP/PCP/Mg²⁺] und ArtM(P_{DCN})^[ADP/Mg²⁺] keine Änderungen der chemischen Verschiebungen.

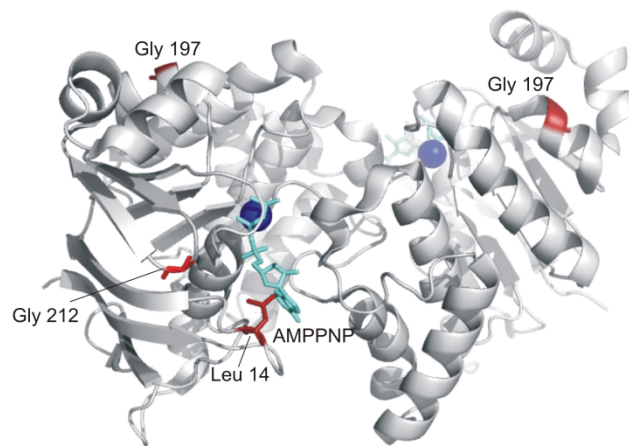


Abbildung 39: Position von Gly 197/213 und Leu 14 in der Röntgenkristallstruktur von ArtP mit AMPPNP/Mg²⁺. (pdb: 3C41, Thaben *et al.*, 2009) Das Magnesium-Ion ist als blaue Sphäre dargestellt.

Darüber hinaus konnten in den H/N-Spektren für die Präparationen des Proteins ohne Nukleotid sowie mit ADP/Mg²⁺ zusätzliche Signale gefunden werden, die in den jeweils anderen Präparationen nicht auftreten. Das deutet darauf hin, dass sich die Dynamik der entsprechenden Aminosäurereste in verschiedenen Zuständen während des Substrattranslokationszyklus verändert.

Zusammenfassung

Die *ATP-binding cassette*-Transporter (ABC-Transporter) sind in allen drei Reichen des Lebens vertreten. Sie nutzen die Energie aus der ATP-Hydrolyse für die unidirektionale Translokation verschiedenster Substrate über biologische Membranen. Auf Grund ihrer bedeutenden Rolle in physiologischen und pathophysiologischen zellulären Prozessen ist die Aufklärung ihres komplexen molekularen Mechanismus der Substrattranslokation von großem medizinischem Interesse. Jedoch konnten der Zyklus der ATP-Bindung/-Hydrolyse und die Kommunikation zwischen den Transmembran- und Nukleotidbindedomänen bis heute nicht im Detail geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Konzepte zur strukturellen Charakterisierung des ABC-Transportsystems ArtMP-J aus *G. stearothermophilus* mittels Festkörper-*nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektroskopie beschrieben, die als Grundlage für weiterführende NMR-Studien zu Struktur und Dynamik des Transporters dienen sollen. Der große Vorteil dieser Technik beruht darauf, dass Membranproteine in einer nativen Lipidumgebung strukturell und dynamisch untersucht werden können. ArtMP-J wurde von Lange (2008, Lange *et al.*, 2010) als Modellsystem für erste NMR-spektroskopische Untersuchungen ausgewählt, da sowohl die Transmembran- (ArtM) als auch die Nukleotidbindedomänen (ArtP) symmetrische Homodimere bilden, wodurch im NMR-Spektrum die Signalanzahl reduziert wird. ArtMP-J ist für den Import polarer Aminosäuren über die Zytoplasmamembran verantwortlich.

In der Arbeit von Lange (2008) wurden 3D-Kristalle der Nukleotidbindedomäne ArtP und 2D-Kristalle von ArtMP im nukleotid-freien sowie im ATP-gebundenen Zustand untersucht, wobei die Proteine selektiv mit den Aminosäuren Threonin, Tyrosin und Prolin (TYP) ^{13}C , ^{15}N -markiert waren. Hier zeigten sich die Signale Tyrosin 133, Tyrosin 213 und Prolin 134 als besonders sensitiv gegenüber Veränderungen ihrer chemischen Umgebung, verursacht durch die Bindung von Nukleotiden in der Bindetasche. Die 3D-kristallinen Präparationen hatten den Vorteil, dass die Anzahl der Signale in den NMR-Spektren verringert war und so Signalüberlagerungen reduziert wurden. In der vorliegenden Arbeit sollte die Nukleotidbindedomäne ArtP und der Transmembrankomplex ArtMP zur Abbildung des Translokationszyklus in verschiedenen intermediären Zuständen untersucht werden. Dafür wurden die Proteine ohne Nukleotid (Grundzustand) und mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogikum AMPPCP/ Mg^{2+} (prähydrolytisch) sowie mit ADP/ Mg^{2+} (posthydrolytisch) hergestellt.

Das langfristige Ziel ist jedoch eine strukturelle und dynamische Charakterisierung des gesamten Transportkomplexes, eingebettet in seine native Lipidumgebung mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie. Für eine bessere Differenzierung zwischen den NMR-Signalen von ArtP und ArtM im Proteinkomplex sollte ArtMP so präpariert werden, dass der Komplex aus einer markierten und einer unmarkierten Untereinheit zusammengesetzt ist. Hierzu wurden Methoden zur Herstellung und Assemblierung der einzelnen Untereinheiten zu einem intakten Transportkomplex etabliert. So wurde die Präparation einer stabilen NMR-Probe, die aus markiertem ArtP und unmarkiertem ArtM besteht und in Lipide aus *G. stearothermophilus* eingebettet ist, ermöglicht.

Parallel dazu sollte getestet werden, inwieweit ^1H -detektierte Festkörper-NMR-Techniken zur strukturellen Untersuchung von ArtMP geeignet sind. Hierfür wurde ein Präparationsprotokoll zur Herstellung von [^{15}N , ^{13}C , ^2H]-markiertem ArtMP_{DCN} und ArtP_{DCN} etabliert. Dazu war es nötig zu analysieren, inwieweit die Verwendung deuterierter Lipide die Qualität der ^1H - ^{15}N -Spektren von ArtMP_{DCN} beeinflusst. Für diese Untersuchungen wurde die Herstellung deuterierter sowie protonierter Lipide in *G. stearothermophilus* im Hochzell-dichte-Fermentationsverfahren erfolgreich etabliert. Die *Insensitive Nuclei Enhanced Polarization Transfer* (INEPT)-basierten ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren von ArtMP_{DCN} in deuterierten bzw. protonierten Lipiden ergaben, dass sich die Signalauflösung nicht unterscheidet. Allerdings wiesen einige Signale Verschiebungen auf, was auf unterschiedliche chemische Umgebungen der Kerne in den verschiedenen Proben hindeutet. Aus diesem Grund wurden für nachfolgende NMR-Experimente protonierte Lipide zur 2D-Kristallisation des Transmembrankomplexes verwendet.

ArtP wurde allein und im Komplex mit unmarkiertem ArtM (ArtM(P_{DCN})) mittels ^1H -detektierter Festkörper-NMR-Techniken untersucht. Hierbei erfolgte der Magnetisierungstransfer sowohl über dipolare (Kreuzpolarisation, CP) als auch skalare Kopplungen (INEPT). Die CP-Spektren aller Präparationen zeigten deutlich mehr Signale für ArtP als in den INEPT-Spektren, was möglicherweise auf unterschiedliche dynamische Bereiche in ArtP schließen lässt. Die hoch aufgelösten INEPT-Spektren von ArtM(P_{DCN}) zeigten gute Übereinstimmung mit dem ^1H - ^{15}N -Lösungs-NMR-Spektrum von ArtP_{DCN}, so dass die Zuordnung einzelner Signale auf die Festkörper-NMR-Spektren übertragen werden konnte. Davon zeigten die Aminosäurereste Glycin 197/212 und Leucin 14 unterschiedliche chemische Verschiebungen in den Spektren von ArtM(P_{DCN}) ohne bzw. mit Nukleotid.

Es konnte sowohl mit den ^{13}C - ^{13}C - als auch ^1H - ^{15}N -Korrelationsexperimenten gezeigt werden, dass sich die Konformation von ArtP in 3D-Kristallen zumindest partiell von

der im Komplex ArtM(P) in nativen Lipiden unterscheidet. So konnten die für das isolierte ArtP beobachteten Signalaufspaltungen, die auf asymmetrische Bereiche im Homodimer hinweisen, für ArtM(P) in nativen Lipiden nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wurde auch der *in vitro* assemblierte Komplex ArtM(P_{TYP}) mit AMPPCP/Mg²⁺ präpariert. Der Vergleich mit den ¹³C-¹³C-Korrelationsspektren von ArtMP_{PY/TYP} ergab, dass die Konformationsänderungen von ArtP im Transmembrankomplex geringer als in den 3D-Kristallen sind. Zum gleichen Ergebnis führten die ¹H-¹⁵N-Korrelationsexperimente von ArtM(P_{DCN}) ohne Nukleotid sowie mit AMPPCP/Mg²⁺ und ADP/Mg²⁺. Zukünftig sollten Untersuchungen an den einzelnen Untereinheiten des intakten Transportkomplexes in nativen Lipiden durchgeführt werden, um Struktur und Funktion von ArtMP nahe an seinem nativen Zustand zu charakterisieren.

Die vorliegende Arbeit hat dazu beigetragen, die Methode bzw. die Anwendung der Festkörper-NMR im Bereich der Strukturaufklärung von Membranproteinen weiter zu entwickeln. Zudem haben die Erkenntnisse aus der Untersuchung verschiedener intermediärer Zustände von ArtMP ein Beitrag für das zunehmende Verständnis des komplexen Mechanismus der Substrattranslokation durch ABC-Transporter geleistet.

Summary

ATP-binding cassette transporters are found in all three domains of life. They energize the unidirectional substrate transport across biological membranes by ATP hydrolysis and are involved in many physiological and pathophysiological processes in cells. Therefore it is of high medical interest to elucidate their molecular mechanism of substrate translocation. However the mechanism of ATP binding and hydrolysis as well as the communication between the transmembrane and nucleotide binding domains are not known in detail to this day.

This thesis describes different concepts for structural characterization of the ABC transporter ArtMP-J from *Geobacillus stearothermophilus* by solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. These approaches exhibit the basis for further NMR studies to shed light on structural and dynamic properties of the ABC transporter. Solid-state NMR spectroscopy enables the structural investigation of membrane proteins in a native-like environment. ArtMP-J is responsible for the transport of amino acids across the cytoplasmic membrane.

ArtMP-J was chosen as a model system because of the homodimeric structure of the nucleotide binding (ArtP) and transmembrane subunits (ArtM), which leads to a reduced number of signals in NMR spectra (Lange, 2008).

Lange (2008) investigated 3D crystals of the nucleotide binding domain ArtP and 2D crystals of ArtMP in nucleotide-free and ATP-bound states. For these experiments ArtMP and ArtP were labeled selectively with the amino acids [¹³C, ¹⁵N]-threonine, -tyrosine and -proline (TYP). The signals for Tyrosin 133, Tyrosin 213 und Prolin 134 have proven to be sensitive for changes in the chemical environment of these residues caused by nucleotide binding. The 3D crystalline preparations of isolated ArtP were used in order to reduce the number of signals and signal overlap.

In this thesis the nucleotide binding domain ArtP and the transmembrane complex ArtMP were studied in different intermediate states to follow the translocation cycle. Therefore the proteins were prepared without nucleotides (resting state), with the non-hydrolysable ATP analog AMPPCP/Mg²⁺ (pre-hydrolytic state) and ADP/Mg²⁺ (post-hydrolytic state).

However the long-term goal is the structural and dynamic characterization of the active transport complex ArtMP embedded in its native lipid environment by solid state NMR spectroscopy. For this reason ArtMP should be composed of a labeled and an unlabeled subunit in order to reduce the number of signals and to differentiate between signals from ArtM and ArtP. Therefore preparation protocols for the separate production of

ArtM and the assembly of the isolated subunits to an active transport complex were established. This approach enabled the preparation of stable NMR samples of ArtMP composed of isotopically labeled ArtP and unlabeled ArtM reconstituted in lipids from *G. stearothermophilus*.

In a further approach it was tested whether proton detected solid state NMR techniques are suitable for structural studies of ArtMP. For this purpose it was necessary to label ArtMP and ArtP with the isotopes ^{15}N , ^{13}C , ^2H . Moreover it was analysed whether the use of deuterated lipids influences spectral quality. A high-cell-density-fermentation protocol was established to produce protonated and deuterated lipids in *G. stearothermophilus*. *Insensitive Nuclei Enhanced Polarization Transfer* (INEPT)-based ^1H - ^{15}N -correlation spectra of ArtMP_{DCN} in deuterated and protonated lipids respectively were from similar spectral resolution, but some signals showed chemical shift changes caused by different chemical environments in both samples. In consecutively NMR studies protonated lipids were used for 2D crystallization of the transmembrane complex. Proton detected solid state NMR was used to investigate ArtP as an isolated subunit and in complex with ArtM. In these experiments the magnetization transfer was carried out by using scalar (INEPT) and dipolar couplings (cross polarization, CP).

CP-spectra of all preparations showed much more signals and strong signal overlap compared to the INEPT-spectra. Possibly ArtP consists of dynamically diverse regions. The high resolution spectrum of ArtM(P_{DCN}) superimposed well with the ^1H - ^{15}N -solution state spectrum of ArtP_{DCN}. So it was possible to transfer the assignment of some signals to the solid-state spectra. It turned out that glycine 197/212 and leucine 14 were sensitive to conformational changes by nucleotide binding in ArtP.

The comparison of ^{13}C - ^{13}C - as well as ^1H - ^{15}N -correlations from 3D crystalline and 2D crystalline preparations showed significant differences. Signal splitting shown for isolated ArtP, that indicates asymmetry in the homodimer, could not be found for ArtM(P) in native lipids. Furthermore the *in vitro* assembled complex ArtM(P) was prepared in different nucleotide bound states. Appropriate ^{13}C - ^{13}C -correlations of ArtMP_{TYP} bzw. ArtM(P_{TYP}) showed less differences compared to 3D crystalline samples of ArtP_{TYP}. This result was confirmed by ^1H - ^{15}N -correlation experiments with ArtM(P_{DCN}) without nucleotide, with AMPPCP/Mg²⁺ and ADP/Mg²⁺. For this reason structural and functional investigations of the subunits ArtM and ArtP should be carried out in an active complex, which is reconstituted in native lipids.

This thesis contributed to the further development of solid state NMR for structural investigation of membrane proteins. Moreover the results from intermediate states of

ArtM(P) brought input in the growing knowledge in the complex mechanism of substrate translocation by ABC transporters.

Literaturverzeichnis

Abu-Baker, S. and Lorigan, G. A. (2006) Phospholamban and its phosphorylated form interact differently with lipid bilayers: a ^{31}P , ^2H , ^{13}C solid-state NMR spectroscopic study. *Biochem.*, **45**: 13312-13322.

Aerts, J. M. F. G., Lauwers, A. M. and Heinen, W. (1985) Temperature-dependent-lipid content and fatty acid composition of three thermophilic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **51**: 155-165.

Akbey, Ü., Lange, S., Franks, W. T., Linser, R., Rehbein, K., Diehl, A., van Rossum, B.-J., Reif, B. and Oschkinat, H. (2010) Optimum levels of exchangeable protons in perdeuterated proteins for proton detection in MAS solid-state NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR*, **46**: 67-73.

Aittoniemi, J., de Wet, H., Ashcroft, F. M. and Sansom, M. S. (2010) Asymmetric switching in a homodimeric ABC transporter: a simulation study. *PLoS Comput. Biol.*, **6**: 1-10.

Aller, S. G., Ward, A., Wenig, Y., Chittaboina, S., Zhou, R., Harell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L. and Chang, G. (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, **323**: 1718-1722.

Al-Qodah, Z. (2006) Production and characterization of thermostable α -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Biotechnology J.*, **1**: 850-857.

Ambudkar, S. V., Kim, I. W., Xia, D. and Sauna, Z. E. (2006) The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Lett.*, **580**: 1049-1055.

Ames, G. F.-L. (1992) Bacterial periplasmic permeases as model systems for the superfamily of traffic ATPases, including the multidrug resistance protein and a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Int. Rev. Cytol.*, **137**: 1-35.

Afzal, M., Oommen, S. and Al-Awadi, S. (2011) Transformation of chenodeoxycholic acid by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **58**: 250-255.

Andrew, E. R., Bradbury, A. and Eades, R. G. (1958) Nuclear magnetic resonance spectra from a crystal rotated at high speed. *Nature*, **182**: 1659-63.

Argarwal, V., Fink, U., Schuldiner, S. and Reif, B. (2007) MAS solid-state NMR studies on the multidrug transporter EmrE. *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**: 3036-3043.

Baldus, M., Petkova, A. T., Herzfeld, J. and Griffin, R. G. (1998) Cross polarization in the tilted frame: assignment and spectral simplification in heteronuclear spin systems. *Mol. Phys.*, **95**: 1197-1207.

Berntsson, R. P., Smits, S. H., Schmitt, L., Slotboom, D. J., Poolman, B. (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.* **584**: 2606-2617.

Biemanns-Oldehinkel, E., Doeven, M. K. and Poolmann, B. (2006) ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett.* **580**: 1023-1035.

Bloch, F. (1946) Nuclear Induction., *Phys. Rev.*, **70**: 460-474.

Blüschke, B., Eckey, V., Kunert, B., Berendt, S., Landmesser, H., Portwich, M., Volkmer, R. and Schneider, E. (2007) Mapping putative contact sites between subunits in a bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporter by synthetic peptide libraries. *J. Mol. Biol.*, **369**: 386-399.

Bodenhausen, G. and Ruben, D. J. (1980) Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, **69**: 185-189.

- Boos, W. and Böhm, A. (2000)** Learning new tricks from old dog: MalT *Escherichia coli* maltose system is part of a complex regulatory network. *Trends Genet.*, **16**: 404-409.
- Boos, W. and Lucht, J. M. (1996)** Periplasmic binding-dependent ABC-Transporters. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. pp 1175-1209, Neidhardt, F. C. et al., (ed.) 2nd ed. ASM Press.
- Boos, W. and Shuman, H. (1998)** Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 204-229.
- 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. *Mol. Microbiol.* **77**: 1354-1366.
- Brigidi, P., González-Vara, Y. R. A., Rossi, M. and Matteuzi, D. (1997)** Study of stability of recombinant plasmids during the continuous culture of *Bacillus stearothermophilus* NUB3621 in nonselective medium. *Biotechnol. Bioeng.*, **53**: 507-514.
- Buswell, J. A. and Twomey, D. G. (1975)** Utilization of phenol and cresols by *Bacillus stearothermophilus*, strain PH24. *J. Gen. Microbiol.*, **87**: 377-379.
- Card, G. L., (1973)** Metabolism of phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and cardiolipin of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **114**: 1125-1137.
- Cascorbi, I. (2011)** P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handb. Exp. Pharmacol.* **201**: 261-283.
- Castellani, F., van Rossum, B., Diehl, A., Schubert, M., Rehbein, K. and Oschkinat, H. (2002)** Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *Nature*, **420**: 98-102.
- Chan, S., Giuroiu, I., Chernishof, I., Sawaya, M.R., Chiang, J., Gunsalus, R.P., Arbing, M.A., Perry, L.J. (2010)** Apo and ligand-bound structures of ModA from the archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *Acta Crystallogr.* **66**: 242-250.
- Chary, K. V. R. and Govil, G. (2008)** NMR in Biological systems. *Springer*.
- Chen, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A. L. and Quioco, F. A. (2003)** A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol. Cell.*, **12**: 651-661.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S.G., Thian, F. S., Kobilka, T.S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K. and Stevens RC. (2007)** High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, **318**: 1258-1265.
- Cherezov, V. (2011)** Lipidic cubic phase technologies for membrane protein structural studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **21**: 559-566.
- Chevelkov, V., Rehbein, K., Diehl, A. and Reif, B. (2006)** Ultrahigh resolution in proton solid-state NMR spectroscopy at high levels of deuteration. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **45**: 3878-3881.
- Davidson, A. L., Laghaeian, S. S. and Mannering, D. E. (1996)** The maltose transport system of *Escherichia coli* displays positive cooperativity in ATP-hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **271**:4858-4863.
- Davidson, A. L. and Chen, J. (2004)** ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 241-268.
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., and Chen, J. (2008)** Structure, function and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbio.. Mol. Biol. Rev.* **72**: 317-364.

- Dawson, R. J. P. & Locher, K. P. (2006)** Structure of a bacterial multidrug ABC-Transporter. *Nature*, **443**: 180-185.
- 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 Lett.*, **581**: 935-938.
- Dean, M., Rezhetsky, A. and Allikmets, R. (2001)** The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11.**, 1156-1166.
- De Angelis, A. A., Jones, D. H., Grant, C. V., Park, S. H., Mesleh, M. F. and Opella, S. J. (2005)** NMR experiments on aligned samples of membrane proteins. *Methods Enzymol.*, **394**: 350-382.
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ):** <http://www.dsmz.de>
- Donk, P. J. (1920)** A Highly Resistant Thermophilic Organism., *J. Bacteriol.*, **5**: 373-374.
- Drechsler, A. and Separovic, F. (2003)** Solid-state NMR structure determination. *IUBMB Life*, **55**: 515-523.
- Driessen, A. J. M. and Albers, S.-V. (2007)** Membrane adaptations of (Hyper) thermophiles to high temperatures. in *Physiology and Biochemistry of Extremophiles.* (eds) Gerday, C. and Glansdorff, N. *ASM Press, Washington DC.*
- Eckey, V. (2009)** Strukturanalysen und Untersuchungen zu Protein-Protein-Wechselwirkungen am Arginin-ABC-Transporter ArtJ-(MP)2 aus *Geobacillus stearothermophilus*. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Eckey, V., Landmesser, H. and Schneider, E. (2010a)** Studying subunit-subunit interactions in a bacterial ABC transporter by in vitro assembly. *Biochim. Biophys. Acta*, **1798**:1250-1253.
- Eckey, V., Weidlich, D., Landmesser, H., Bergmann, U. and Schneider, E. (2010b)** The second extracellular loop of pore-forming subunits of ATP-binding cassette transporters for basic amino acids plays a crucial role in interaction with the cognate solute binding protein(s). *J. Bacteriol.*, **192**: 2150-2159.
- Eitinger, T., Rodinov, 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 Microbiol. Rev.* **35** : 3-67.
- Etzkorn, M., Böckmann, A., Lange, A. and Baldus, M. (2004)** Probing molecular interfaces using 2D-magic-angle-spinning NMR on protein mixtures with different uniform labeling. *JACS*, **126**: 14746-14751.
- Etzkorn, M., Martell, S., Andronesi, O. C., Seidel, K., Engelhardt, M. and Baldus, M. (2007)** Secondary structure, dynamics, and topology of a seven-helix receptor in native membranes, studied by solid-state NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46**: 459-462.
- Etzkorn, M., Kneuper, H., Dünwald, P., Vijayan, V., Krämer, J., Griesinger, C., Becker, S., Unden, G. and Baldus, M. (2008)** Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DscU. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**: 1031-1039.
- Faham, S. and Bowie, J. U. (2002)** Bicelle crystallization: a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *J. Mol. Biol.*, **316**: 1-6.
- Fetch, E. E. and Davidson, A. L. (2002)** Vanadate-catalyzed photocleavage of the signature motif of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**: 9685-9690.
- Fleischer, R., Wengner, A., Scheffel, F., Landmesser, H. and Schneider, E. (2005)** Identification of a gene cluster encoding an arginine ATP-binding-cassette transporter in the genome of the thermophilic Gram-positive bacterium *Geobacillus stearothermophilus* strain DSMZ 13240. *Microbiology*, **151**: 835-840.
- Fiedler, S., Knocke, C., Vogt, J., Oschkinat, H. and Diehl, A. (2007)** HCDF as a protein-labeling methodology – Production of H-2, C-13-, and N-15-labeled OmpG via high cell density fermentation. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, **27**: 54.

- Fischer, W. (1977)** The polar lipids of group B Streptococci II Composition and positional distribution of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **487**: 89-104.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane, S. G. H. (1957)** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **226**: 497-509.
- Franks, W. T., Wylie, B. J., Schmidt, H. L., Nieuwkoop, A. J., Mayerhofer, R. M., Shah, G. J., Graesser, D. T. and Rienstra, C. M. (2008)** Dipole tensor-based atomic-resolution structure determination of a nanocrystalline protein by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **105**: 4621-4626.
- Ferguson, N., Becker, J., Tidow, H., Tremmel, S., Sharpe, T. D., Krause, G., Flinders, J., Petrovich, M., Berriman, J. and Oschkinat, H. and Fersht, A. R. (2006)** General structural motifs of amyloid protofilaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **103**: 16248-16253.
- Friebolin, H. (2006)** Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. 4. Auflage, *Wiley-VCH*, Weinheim.
- Gardner, K. H. and Kay, L. E. (1998)** The use of ²H, ¹³C, ¹⁵N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **27**: 357-406.
- Gaudet, R. and Wiley, D. C. (2001)** Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J.*, **20**: 4964-4972.
- Gautier, A., Mott, H. R., Bostock, M. J., Kirkpatrick, J. P. and Nietlispach, D. (2010)** Structure determination of the seven-helix transmembrane receptor sensory rhodopsin II by solution NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**: 768-774.
- Geourjon, C., Orelle, C., Steinfels, E., Blanchet, C., Deléage, G., Di Pietro, A. and Jault, J. M. (2001)** A common mechanism for ATP hydrolysis in ABC transporter and helicase superfamilies. *Trends Biochem. Sci.*, **26**: 539-544.
- Gerber, S., Comellas-Bigler, M., Goetz, B. A. and Locher, K. P. (2008)** Structural basis of trans-inhibition in a molybdate/tungstate ABC transporter. *Science*, **321**: 246-250.
- Glück, J. M., Wittlich, M., Feuerstein, S., Hoffmann, S., Willbold, D. and Koenig, B. W. (2009)** Integral membrane proteins in nanodiscs can be studied by solution NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**: 12060-12061.
- Grzesiek, S. and Bax, A. (1992)** Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *J. Magn. Reson.*, **96**: 432-440.
- Gustot, A., Smriti, Ruyschaert, J.-M., Mchaourab, H. and Govaerts, C. (2009)** Lipid composition regulates the orientation of transmembrane Helices in HorA, an ABC multidrug transporter. *JBC*, **285**: 14144-14151.
- Hebbeln, P., Rodinov, D. A., Alfandega, A. and Eitingner, T. (2007)** Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 2909-2914.
- Hellmich, U., Haase, W., Velamakanni, S., van Veen, H. W. and Glaubitz, C. (2008)** Caught in the act: ATP hydrolysis of an ABC-multidrug transporter followed by real-time magic angle spinning NMR. *FEBS Lett.*, **582**: 3557-3562.
- Hennel, J. W. and Klinowski, J. (2005)** Magic Angle Spinning: A Historical Perspective. In: *New techniques in solid-state NMR.* (ed) Klinowski, J., *Springer*, 1-14.
- Higgins, C. F., Haag, P. D., Nikaido, K., Ardeshir, F., Garcia, G. and Ames, G. F. (1982)** Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature*, **298**: 723-727.
- Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckel, S. D., Bell, A. W. and et al., (1986)** A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**: 448-450.
- Higgins, C. F. (1992)** ABC-Transporters from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, **81**: 67-113.

- Higman, V., Flinders, J., Hiller, M., Jehle, S., Marcovic, S., Fiedler, S., van Rossum, B. J. and Oschkinat, O. (2009) Assigning large proteins in the solid state: a MAS resonance strategy using selectively and extensively ^{13}C -labelled proteins. *J. Biomol. NMR*, **44**: 245-260.
- Hiller, M., Krabben, L., Vinothkumar, K. R., Castellani, F., van Rossum, B. J., Kühlbrandt, W. and Oschkinat, H. (2005) Solid-state magic-angle spinning NMR of outer-membrane protein G from *Escherichia coli*. *ChemBiochem*, **6**: 1679-1684.
- Hiller, S., Garces, R. G., Malia, T. J., Orekhov, V. Y., Colombini, M. and Wagner, G. (2008) Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles. *Science*, **321**: 1206-1210.
- Holland, G. P., Cherry, B. R., Jenkins, J. E. and Yarger, J. L. (2009) Proton-detected heteronuclear single quantum correlation NMR spectroscopy in rigid solids with ultra-fast MAS. *J. Magn. Reson.*, **202**:64-71.
- Hollenstein, K., Frei, D. C. and Locher, K. P. (2007) Structure of an ABC-Transporter in complex with its binding protein. *Nature* **446**: 213-216.
- Hopfner, A. H. F., Karcher, A., Shin, D. S., Craig, L., Arthur, L. M., Carney, J. P. and Trainer, 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**: 789-800.
- Hong, M. and Jakes, K. (1999) Selective and extensive C-13 labelling of a membrane protein for solid-state NMR investigations. *J. Biomol. NMR.*, **14**: 71-74.
- Hung, L. W., Wang, I. X., Nikaido, K., Liu, P.-Q., Ames, F. L. and Kim, S.-H. (1998) Crystal structure of the ATP-binding domain of an ABC transporter. *Nature*, **396**: 703-707.
- Hunte, C. and Michel, H. (2002) Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**: 503-508.
- 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*, **317**: 1387-1390.
- Hwang, P. M., Choy, W. Y., Lo, E. I., Chen, L., Forman-Kay, J. D., Raetz, C. R., Privé, G. G., Bishop, R. E. and Kay, L. E. (2002) Solution structure and dynamics of the outer membrane enzyme PagP by NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**: 13560-13565.
- 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**: 362-365.
- Janas, E., Hofacker, M., Chen, M., Gompf, S., van der Does, C. and Tampe, R. (2003) The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p. *J. Biol. Chem.*, **278**: 26862-26869.
- Jaroniec, C. P., MacPhee, C. E., Bajaj, V. S., McMahon, M. T., Dobson, C. M. and Griffin, R. G. (2004) High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **101**: 711-716.
- Jehle, S., Rajagopal, P., Bardiaux, B., Marcovic, S., Kühne, R., Stout, J. R., Higman, V. A., Klevit, R. E., van Rossum, B. J. and Oschkinat, H. (2010) Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of alphaB-crystallin oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**:1037-1042.
- Jones, P. M. and George, A. M. (2009) Opening of the ADP-bound active site in the ABC transporter ATPase dimer: evidence for a constant contact, alternating sites model for the catalytic cycle. *Proteins*, **75**: 387-396.
- Jones, P. M., O'Mara, M. L. and George, A. M. (2009) ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends in Biochem. Sci.*, **34**: 520-531.
- Judge, P. J. and Watts, A. (2011) Recent contributions from solid-state NMR to the understanding of membrane protein structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, Epub.

- Jumpertz, T., Holland, I. B. and Schmitt, L. (2009)** ABC Transporters – a Smart Example of Molecular Machineries. ABC transporters in Microorganisms, Research, Innovation and Value as Targets against Drug Resistance. (ed.) Alicia Ponte-Sucre. *Caister Academic Press*.
- Jurado, A. S., Pinheiro, T. J. and Madeira, V. M. (1991)** Physical studies on membrane lipids of *Bacillus stearothermophilus* temperature and calcium effects. *Arch. Biochem. Biophys.* **289**: 167-179.
- Kandt, C., Xu, Z. and Tieleman, D. P. (2006)** Opening and closing motions in the periplasmic vitamin B12 binding protein BtuF. *Biochem.* **45**: 13284-92.
- Kay, L. E., Ikura, M., Tschudin, R. and Bax, A. (1990)** Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *J. Magn. Reson.*, **89**: 496-514.
- Kemp, S., Theodoulou, F. L. and Wanders, R. J.A. (2011)** Mammalian peroxisomal ABC transporters from endogenous substrates to pathology and clinical significance. *British Journal of Pharmacology*, Epub.
- Kirk, K. L. and Wang, W. (2011)** A unified view of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gating: combining the allostereism of a ligand-gated channel with the enzymatic activity of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J. Biol. Chem.* **286**: 12813-12819.
- Krämer, R. (1994)** Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. *Biochem. Biophys. Acta* **1185**: 1-34.
- Landau, E. M. and Rosenbusch, J. P. (1996)** Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**: 14532-14535.
- Landau, E. M., Pebay-Peyroula, E. and Neutze, R. (2003)** Structural and mechanistic insight from high resolution structures of archaeal rhodopsins. *FEBS Lett.*, **555**: 51-56.
- Lange, V. (2008)** NMR-spektroskopische Untersuchungen an dem ABC-Transporter ArtMP-J aus *G. stearothermophilus*. Dissertation, Freie Universität Berlin, <http://www.diss.fu-berlin.de>.
- Lange, V., Becker-Baldus, J., Kunert, B., van Rossum, B. J., Casagrande, F., Engel, A., Roske, Y., Scheffel, F. M., Schneider, E. and Oschkinat, H. (2010)** A MAS NMR study of the bacterial ABC transporter ArtMP. *Chembiochem.*, **11**: 547-555.
- Lawrence, M. C., Pilling, P. A., Epa, V. C., Berry, A. M., Ogunniyi, A. D. and Paton, J. C. (1998)** The crystal structure of pneumococcal surface antigen PsaA reveals a metal-binding site and a novel structure for a putative ABC-type binding protein. *Structure* **6**: 1553-1561.
- Laws, D. D., Bitter, H. M. and Jershow, A. (2002)** Solid-state NMR spectroscopic methods in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **41**: 3096-3129.
- LeMaster, D. M. (1990)** Deuterium labeling in NMR structural analysis of larger proteins. *Q. Rev. Biophys.*, **23**: 133-174.
- Lee, A. G. (2003)** Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim. Biophys. Acta*, **1612**: 1-40.
- Lee, A. G. (2004)** How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1666**: 62-87.
- Lee, M., Choi, Y., Burla, B., Kim, Y., Jeon, B., Maeshima, M., Yoo, J. Y., Martinoia, E. and Lee, Y. (2008)** The ABC transporter AtABC14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nat. Cell. Biol.* **10**: 1217-1223.
- Lian, L.-Y. and Middleto, D. A. (2001)** Labelling approaches for protein structural studies by solution-state and solid-state NMR. *Nuc. Magn. Reson. Spectr.*, **39**: 171-190.
- Liang, B. and Tamm, L. K. (2007)** Structure of outer membrane protein G by solution NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **104**: 16140-16145.
- Lieberman, R. L., Culver, J. A., Entzminger, K. C., Pai, J. C. and Maynard, J. A. (2011)** Crystallization chaperone strategies for membrane proteins. *Methods*, Epub.

- Linser, R., Chevelkov, V., Diehl, A. and Reif, B. (2007)** Sensitivity enhancement using paramagnetic relaxation in MAS solid-state NMR of perdeuterated proteins. *J. Magn. Reson.*, **189**: 209-216.
- Linser, R., Fink, U. and Reif, B. (2008)** Proton-detected scalar coupling based assignment strategies in MAS solid-state NMR spectroscopy applied to perdeuterated proteins. *J. Magn. Reson.*, **193**: 89-93.
- Linser, R. (2010)** Development and application of new methodology for ¹H-detected MAS solid-state NMR on biomolecules. Dissertation, HU-Berlin, <http://edoc.hu-berlin.de>.
- Linser, R., Dasari, Muralidhar, Hiller, M., Higman, V., Fink, U., Lopez del Amo, J.-M., Handel, L., Kessler, B., Schmieder, P., Oesterhelt, D., Oschkinat, H. and Reif, B. (2011)** Proton-Detected Solid-State NMR Spectroscopy of Fibrillar and Membrane Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**: 4508-4512.
- Liu, C. E., Liu, P.-Q. and Ames, G. F.-L. (1997)** Characterization of the adenosine triphosphate activity of the periplasmic histidine permease, a traffic ATPase (ABC-Transporter). *J. Bio. Chem.* **35**: 21883-21891.
- Locher, K. P., Lee, T. L. and Rees, D C. (2002)** The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC-Transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**: 1091-1098.
- Locher, K. P. (2009)** Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **364**: 239-245.
- Lorch, M., Fahem, S., Kaiser, C., Weber, I., Mason, A. J., Bowie, J. U. and Glaubitz, C. (2005)** How to prepare membrane proteins for solid-state NMR: a case study on the alpha-helical integral membrane protein diacylglycerol kinase from *E. coli*. *Chembiochem.*, **6**: 1693-1700.
- Mani, R., Tang, M., Wu, X., Buffy, J. J., Waring, A. J., Sherman, M. A., and Hong, M. (2006)** Membrane-bound dimer structure of a beta-hairpin antimicrobial peptide from rotational-echo double-resonance solid-state NMR. *Biochem.*, **45**: 8341-8349.
- Martin, R. W. and Zilm, K. W. (2003)** Preparation of protein nanocrystals and their characterization by solid state NMR. *J. Magn. Reson.*, **165**: 162-174.
- Marulanda, D., Tasayco, M. L., McDermott, A., Cataldi, V. A. and Polenova, T. (2004)** Magic Angle spinning Solid-State NMR Spectroscopy for Structural Studies of Protein Interfaces. Resonance Assignments of Differentially Enriched *Escherichia coli*. *JACS*, **126**: 16608-16620.
- Mason, A. J., Sjarheyeva, A., Haase, W., Lorch, M., van Veen, H. and Glaubitz, C. (2004)** Amino acid type selective isotope labeling of the multidrug ABC transporter LmrA for solid-state NMR studies. *FEBS Lett.*, **568**: 117-121.
- McDermott, A. (2009)** Structure and dynamics of membrane proteins by magic angle spinning solid-state NMR. *Annu. Rev. Biophys.*, **38**: 385-403.
- McIntosh, L. P. and Dahlquist, F. W. (1990)** Biosynthetic incorporation of ¹⁵N and ¹³C for assignment and interpretation of nuclear magnetic resonance spectra of proteins. *Q. Rev. Biophys.*, **23**: 1-38.
- Miller, J. H. (1972)** A short course in bacterial genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Morcombe, C. R., Paulson, E. K., Gaponenko, V., Byrd, R. A. and Zilm, K. W. (2005)** ¹H-¹⁵N correlation spectroscopy of nanocrystalline proteins. *J. Biomol. NMR*, **31**: 217-230.
- Morris, G. A. and Freeman, R. (1979)** Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**: 760-762.
- Mourez, M., Hofnung, M. and Dassa, E. (1997)** Subunit interaction in ABC-Transporters. A conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases define sites of interaction with the helical domain of ABC subunits. *EMBO-J.*, **16**: 3066-3077.

- Moussatova, A., Kandt, C., O'Mara ML & Tieleman, D. P. (2008)** ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**: 1757-1771.
- Nawani, N., Khurana, J. and Kaur, J. (2006)** A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization. *Mol. Cell Biochem.*, **290**: 17-22.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P. Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S. and Ivanova, M. V. (2001)** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov. sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermoatenuatus*, *Bacillus thermoaleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermoatenuatus*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Environ. Microbiol.*, **51**: 433-446.
- Nielsen, J. T., Bjerring, M., Jeppesen, M. D., Pederson, R. O., Pederson, J. M., Hein, K. L., Vosegaard, T., Skrydstrup, T., Otzen, D. E. and Nielsen, N. C. (2009)** Unique identification of supramolecular structures in amyloid fibrils by solid-state NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48**: 2118-2121.
- Nikaido, H. and Vaara, M. (1985)** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**: 1-32.
- Nikaido, H. (2003)** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Rev.* **67**: 593-656.
- Nikaido, H., Liu, P.-Q. and Ames, G. F.-L. (1997)** Purification and characterization of HisP, the ATP-binding subunit of a traffic ATPase (ABC-Transporter), the histidin permease of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, **272**: 27745-27752.
- Oldham, M. L., Khare, D., Quijcho, F. A., Davidson, A. L. and Chen, J. (2007)** Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature*, **450**: 515-521.
- Oldham, M. L. and Chen, J. (2011a)** Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science*, **332**: 1202-1205.
- Oldham, M. L. and Chen, J. (2011b)** Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**: 15152-15156.
- Oloo, E. O. and Tieleman, D. P. (2004)** Conformational transitions induced by the binding of MgATP to the vitamin B12 ATP-binding cassette (ABC) transporter BtuCD. *J. Biol. Chem.*, **279**: 45013-45019.
- Ouellet, M., Voyer, N. and Auger, M. (2010)** Membrane interactions and dynamics of a 21-mer cytotoxic peptide: a solid-state NMR study. *Biochim. Biophys. Acta*, **1798**: 235-243.
- Patching, S. G. (2011)** NMR structures of polytopic integral membrane proteins. *Mol. Membr. Biol.* Epub.
- Pauli, J., van Rossum, B., Förster, H., de Groot, H. J. and Oschkinat, H. (2000)** Sample optimization and identification of signal patterns of amino acid side chains in 2D RFDR spectra of the α -spectrin SH3 domain. *J. Magn. Reson.*, **143**: 411-416.
- Pauli, J., Baldus, M., van Rossum, B. J., de Groot, H. and Oschkinat, H. (2001)** Backbone and side-chain ^{13}C and ^{15}N signal assignments of the α -spectrin SH3 domain by Magic angle spinning solid-state NMR at 17,6 Tesla. *ChemBioChem.*, **2**: 272-281.
- Pervushin, K., Riek, R., Wieder, G. and Wüthrich, K. (1997)** Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc. Natl. Acad. U S A*, **94**: 12366-12371.

-
- Pilot, J. D., East, J. M. and Lee, A. G. (2001)** Effects of bilayer thickness on the activity of diacylglycerol kinase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **40**: 8188-8195.
- Pinkett, H. W., Lee, A. T., Lum, P., Locher, K.P. and Rees, D. C. (2007)** An Inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC-Transporter. *Science*, **315**: 373-377.
- Pines, A., Gibby, M. G. and Waugh, J. S. (1972)** Proton-enhanced nuclear induction spectroscopy. ^{13}C chemical shielding anisotropy in some organic solids. *Chem. Phys. Lett.*, **15**: 373-376.
- Purcell, E. M., Torrey, H. C., Pound, C. V. (1946)** *Phys. Rev.*, **69**: 37-38.
- Quiocho, F. A. and Ledvina, P. S. (1996)** Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.* **20**: 17-25.
- Raschle, T., Hiller, S., Yu, T. Y., Rice, A. J., Walz, T. and Wagner, G. (2009)** Structural and functional characterization of the integral membrane protein VDAC-1 in lipid bilayer nanodiscs. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**: 17777-17779.
- Renault, M, Cukkemane, A. and Baldus, M. (2010)** Solid-state NMR spectroscopy on complex biomolecules. *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.*, **49**: 8346-8357.
- Reif, B. (2010)** Deuterated Peptides and Proteins: Structure and Dynamics Studies by MAS Solid-state NMR. In: (eds) McDermott, A. and Polenova, T. Solid-state NMR Studies of Biopolymers., *Wiley-VHC*, Weinheim.
- Rodinov, D. A., Hebbeln, P., Gelfand M. S. & Eitinger, T. (2006)** Comparative and functional genomics analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters. *J. Bacteriol.* **188**: 317-327.
- Rodinov, D. A., Hebbeln, P., Eudes, A. et al. (2009)** A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. *J. Bacteriol.* **191**: 42-51.
- Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thia, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Yao, X. J., Weis, W. I., Stevens, R. C. and Kobilka, B. K. (2007)** GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science*, **318**: 1266-1273.
- Sack, J. S., Saper, M. A. and Quiocho, F. A. (1989)** Periplasmic binding protein structure and function. *J. Mol. Biol.* **206**, 171-191.
- Saier, M. H. Jr. (2000)** A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbio.l Mol. Biol. Rev.* **64**: 354-411.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd Ed. *Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, N.Y.*
- Sánchez-Fernández, R., Rea, P. A., Davis, T. G. and Coleman, J. O. (2001)** Do plants have more genes than humans? Yes, when it comes to ABC proteins. *Trends Plant Sci.* **6**: 347-348.
- Schäffer, C., Wugedisch, T., Kählig, H., Scherberle, A., Zayni, S. and Messner, P. (2002a)** The surface Layer (S-layer) Glycoprotein of *Geobacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a. *J. Biol. Chem.*, **277**: 6230-6239.
- Schäffer, C., Beckedorf, A. I., Scheberle, A., Zayni, S., Peter-Katalinic, J. and Messner, P. (2002b)** Isolation of Cardiolipins from *Geobacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a. *J. Bacteriol.*, **184**: 6709-6713.
- Schneider, E. and Hunke, S. (1998)** ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.*, **22**: 1-20.
- 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. *Eur. J. Cell Biol.*, Epub.

Seddon, A. M., Curnov, P., Booth, P. J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta*, **1666**: 105-117.

Seidel, K., Andronesi, O. C., Krebs, J., Griesinger, C., Young, H. S., Becker, S. and Baldus, M. (2008) Structural characterization of Ca(2+)-ATPase-bound phospholamban in lipid bilayers by solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Biochem.*, **47**: 4369-4376.

Senior, A. E., al-Shawi, M. K. and Urbatsch, I. L. (1995) The catalytic cycle of P-Glycoprotein. *FEBS Lett.*, **377**: 285-289.

Sharma, S. and Davidson, A. L. (2000) Vanadate-induced trapping of nucleotides by purified maltose transport complex requires ATP hydrolysis. *J. Bacteriol.*, **182**: 6570-6576.

Sharma, M., Yi, M., Dong, H., Qin, H., Peterson, E., Busath, D. D., Zhou, H. X. and Cross, T. A. (2010) Insight into the mechanism of the influenza A proton channel from a structure in a lipid bilayer. *Science*, **330**: 509-512.

Shi, L., Lake, E. M., Ahmed, M. A., Brown, L. S. and Ladizhansky, V. (2009) Solid-state NMR study of proteorhodopsin in the lipid environment: secondary structure and dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**: 2563-2574.

Shilton, B. H. (2008) The dynamics of the MBP-MalFGK(2) interaction: a prototype for binding protein dependent ABC-transporter systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1778** :1772-80.

Siarheyeva, A., Lopez, J. J., Lehner, I., Hellmich, U. A., van Veen, H. W. and Glaubitz, C. (2007) Probing the molecular dynamics of the ABC-multidrug transporter LmrA by deuterium solid-state nuclear magnetic resonance. *Biochem.*, **46**: 3075-3083.

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. *Mol. Cell*, **10**: 139-149.

Studier, F. W. and Moffat, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.

Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, **41**: 207-234.

Szeverenyi, N. M., Sullivan, M. J. and Mecieli, G. E. (1982) Observation of spin exchange by two-dimensional Fourier-transform C-13 Cross polarization-Magic-angle spinning. *J. Magn. Reson.*, **47**:462-475.

Takegoshi, K., Shinji, N., and Terao, T. (2001) 13C-1H dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chem. Phys. Lett.*, **344**: 631-637.

Tomblin, G., Muharemagić, A., White, L. B. and Senior, A. E. (2005) Involvement of the "occluded nucleotide conformation" of P-glycoprotein in the catalytic pathway., *Biochem.* **44**: 12879-12886.

Tsybovsky, Y., Wang, B., Quazi, F., Molday, R. S. and Palczewski, K. (2010) Posttranslational modifications of the photoreceptor-specific ABC transporter ABCA4. *Biochem.* **50**: 6855-66.

Tycko, R. (2011) Solid-state NMR studies of amyloid fibril structure. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **62**: 279-299.

Ulrich, E. L., Akutsu, H., Doreleijers, J. F., Harano, Y., et al. (2008) BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* **36**, 402-408..

- Vahedi-Faridi, A., Eckey, V., Scheffel, F., Alings, C., Landmesser, H., Schneider, E. and Saenger, W. (2008)** Crystal structures and mutational analysis of the arginine-, lysine-, histidine-binding protein ArtJ from *Geobacillus stearothermophilus*. Implications for interactions of ArtJ with its cognate ATP-binding cassette transporter, Art(MP)2. *J. Mol. Biol.*, **375**: 448-459.
- van der Does, C., Presenti, C., Schulze, K., Dinkelaker, S. and Tampé, R. (2006)** Kinetics of the ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of Mdl1 studied by a novel site-specific labeling technique. *J. Biol. Chem.*, **281**: 5694-5701.
- van der Heide, T. and Poolman, B. (2002)** ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep.* **3**: 938-943.
- van Melckebeke, H., Wasmer, C., Lange, A., Ab, E., Loquet, A., Böckmann, A. and Meier, B. H. (2010)** Atomic-resolution three-dimensional structure of HET-s(218-289) amyloid fibrils by solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**: 13765-13775.
- van Veen, H. W., Margolles, A., Muller, M., Higgins, C. F., and Konings, W. N. (2000)** The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *EMBO J.*, **19**: 2503-2514.
- Varga, K. and Watts, A. (2008)** Introduction to solid-state NMR and its application to membrane protein-ligand binding studies. In: *Biophysical Analysis of Membrane proteins*. (ed) Pebay-Peyrola, E., *Wiley-VCH*, 55-87.
- Verardi, R., Shi, L., Traaseth, N. J., Walsh, N. and Veglia, G. (2011)** Structural topology of phospholamban pentamer in lipid bilayers by a hybrid solution and solid-state NMR method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **108**: 9101-9106.
- Verdon, G., Albers, S. V., van Oosterwijk, N., Dijkstra, B. W., Driessen, A. J. and Thunnissen, A. M. (2003)** Formation of the productive ATP-Mg²⁺-bound dimer of GlcV, an ABC-ATPase from *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.*, **334**: 255-267.
- Walker, J. E., Saraste, M., Rundswick, M. J. and Gay, N. J. (1982)** Distantly related sequences in the α - and β -subunit of ATP-synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**: 945-951.
- Watts, A. (1998)** Solid-state NMR approaches for studying the interaction of peptides and proteins with membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1376**: 297-318.
- Wilkinson, A. J. and Verschuere, J. K. H. G. (2003)** Crystal structures of periplasmic solute-binding proteins in ABC transport complexes illuminate their function. In Holland, I. B., Cole, S. P., Kuchler, K. and Higgins, C. F. (eds), *ABC from bacteria to man*. Academic Press, Amsterdam.
- Wittekind, M. and Müller, L. (1993)** HNCACB: a high sensitivity 3D NMR experiment to correlate amide proton and nitrogen resonances with the α -carbon and β -carbon resonances in proteins. *J. Magn. Reson.*, **B101**: 201-205.
- Yamaguchi, S., Huster, D., Waring, A., Lehrer, R. I., Kearney, W., Tack, B. F. and Hong, M. (2001)** Orientation and dynamics of an antimicrobial peptide in the lipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys. J.*, **81**: 2203-2214.
- Yang, J., Tasayco, M. L. and Polenova, T. (2007)** Magic angle spinning NMR experiments for structural studies of differentially enriched protein interfaces and protein assemblies. *JACS*, **130**: 5798-5807.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985)** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**: 103-119.
- Yi, M., Cross, T. A. and Zhou, H. X. (2009)** Conformational heterogeneity of the M2 proton channel and a structural model for channel activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **106**: 13311-13316.
- Zhang, H., Kurisu, G., Smith, J. L. and Cramer, W. A. (2003)** A defined protein-detergent-lipid complex for crystallization of integral membrane proteins: The cytochrome b6/f complex of oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**: 5160-5163.

Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I.B. and Schmitt, L. (2005) H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC-Transporter HlyB. *EMBO J.* **24**: 1901-1910.

Zaitseva, J., Oswald, C., Jumpertz, T., Jenewein, S., Wiedenmann, A., Holland, I. B. and Schmitt, L. (2006) A structural analysis of asymmetry required for catalytic activity of an ABC-ATPase domain dimer. *EMBO J.*, **25**: 3432-3443.

Zhou, D. H., Shah, G., Cormos, M., Mullen, C., Sandoz, D. and Rienstra, C. M. (2007) Proton-detected solid-state NMR spectroscopy of fully protonated proteins at 40 kHz Magic angle spinning. *JACS*, **129**: 11791-11801.

Zhou, Y., Cierpicki, T., Jimenez, R. H., Lukasik, S. M., Ellena, J. F., Cafiso, D. S., Kadokura, H., Beckwith, J. and Bushweller, J. H. (2008) NMR solution structure of the integral membrane enzyme DsbB: functional insights into DsbB-catalyzed disulfide bond formation. *Mol. Cell*, **31**: 896-908.

Abkürzungsverzeichnis

1,2 & 3D	ein-, zwei und dreidimensional
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Acc. no.	Zugangscode (<i>accession number</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
AMPPCP	Adenylyl- β , γ -Methylen-Diphosphat
AMPPNP	Adenylyl- β , γ -Imido-Diphosphat
Ampr	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CP	<i>cross polarization</i> , Kreuzpolarisation
CTFR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
DARR	<i>dipolar assisted rotational resonance</i>
ddH ₂ O	aqua bidest
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-Maltosid
DM	<i>n</i> -Decyl- β -D-Maltosid
DNA	Deoxy-Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EM	Elektronenmikroskopie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
HZDF	Hochzellichtefermentation
IMAC	Metall-Affinitätschromatographie (<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl-Thiogalactosid
kb	kilo Basen DNA
kDa	kilo Dalton
K	Kelvin
LPR	Lipid-protein-ratio
MAS	<i>magic-angle spinning</i>
MBP	Maltose-Bindeprotein
NBD	Nukleotid-Bindende Domäne
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
OD	Optische Dichte
OG	<i>n</i> -Octyl- β -D-Glucopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pdB	Proteindatenbank
PDSD	<i>proton-driven-spin-diffusion</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PEG	Polyethylenglycol

RNase	Ribonuclease
rpm	<i>rounds per minute</i>
SBP	Substrat-Bindeprotein
SDS	Natriumdodecylsulfat
Temed	Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembran Domäne
Tris	Tris(-hydroxymethyl-)aminomethan
TROSY	<i>transverse relaxation optimised spectroscopy</i>

Lebenslauf

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

Veröffentlichungen

Lange, V., Becker-Baldus, J., **Kunert, B.**, van Rossum, B. J., Casagrande, F., Engel, A., Roske, Y., Scheffel, F. M., Schneider, E. and Oschkinat, H. (2010) A MAS NMR study of the bacterial ABC transporter ArtMP. *Chembiochem.*, **11**: 547-555.

Franks, W. T., Linden, A. H., **Kunert, B.**, van Rossum, B.-J. and Oschkinat, H. (2011) Solid-state magic-angle spinning NMR of membrane proteins and protein-ligand interactions. *Eur. J. Cell Biol.* (akzeptiert, doi: 10.1016/j.ejcb.2011.09.002)

Kunert, B., Erdmann, N., Dorn, M., Lange, V. and Oschkinat, H. Production of deuterated lipids of the thermophile bacterium *G. stearothermophilus* using High cell density fermentation. (Manuskript in Vorbereitung)

Kunert, B., Voreck, A., Hiller, M., Ploskon-Arthur, E., Erdmann, N., Schmieder, P., Lange, V. and Oschkinat, H. Proton-detected solid-state NMR spectroscopy of the ABC-Transporter ArtMP-J from *G. stearothermophilus*. (Manuskript in Vorbereitung)

Vorträge

EDICT (European Drug Initiative on Channels and Transporters)

General Assembly in Madrid (2011) Investigation of an ABC transporter by solid-state MAS NMR

General Assembly in Tallin (2010) Investigation of the ABC transporter ArtMP-J from *G. stearothermophilus* by NMR

Postervorträge

3rd FEBS Special Meeting: ATP Binding Cassette (ABC) proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, in Innsbruck (2010): **Kunert, B.**, Franks, T., Becker-Baldus, J., Erdmann, N., Lange V. and Oschkinat, H. Structural investigation of a thermostable ABC transport system by MAS NMR.

EMBN-Train Advanced Course in Membrane proteins, in Leeds: **Kunert, B.**, Franks, T., Becker-Baldus, J., Erdmann, N., Lange V. and Oschkinat, H. Structural investigation of a thermostable ABC transport system by MAS NMR.

2nd FEBS Special Meeting: ATP Binding Cassette (ABC) proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, in Innsbruck (2008): **Kunert, B.**, Lange, V., Becker, J., Jehle, S. and Oschkinat, H. Investigating different conformational states of the nucleotide binding domain of a thermostable ABC transport system by MAS NMR.

Teilnahme an Workshops

EMBN-Train Advanced Course in Membrane proteins, in Leeds (2009)

Membrane Protein Expression, Purification, 2D-Crystallization and Imaging, in Basel (2008)

CMP 2nd Summer School, in Frankfurt am Main (2007)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin,

.....

(Britta Kunert)