
**NMR-spektroskopische Untersuchungen an dem
ABC-Transporter ArtMP-J aus *G. stearothermophilus***

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
Vivien Lange
aus Eberswalde

Februar 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Oschkinat

2. Gutachter: PD Dr. C. Freund

Disputation am 22.05.2008

FÜR SEBASTIAN
UND MEINE MUTTER

AUCH AUS STEINEN, DIE IN DEN WEG GELEGT WERDEN,
KANN MAN WAS SCHÖNES BAUEN.

Johann Wolfgang von Goethe

Danksagung

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hartmut Oschkinat für die Überlassung dieses fesselnden Themas, für seine Gesprächsbereitschaft sowie für sein Vertrauen und seine Unterstützung, wodurch die Durchführung dieser Arbeit erst möglich wurde. Ich möchte mich ausdrücklich für die Ermöglichung meiner Teilnahme an nationalen und internationalen Tagungen, Workshops und Symposien bedanken.

Prof. Dr. Erwin Schneider danke ich für die Bereitstellung des ABC-Transporters, Rebecca Fleischer für die freundliche Überlassung der ArtMP-J-Protokolle und besonders Dr. Frank Scheffel, der mich fachlich unterstützt, inspiriert und motiviert hat. Frank – Du warst nicht nur einmal mein Retter in der Not - danke!

Frau Dr. Anne Diehl und Frau Dr. Katja Fälber danke ich, dass sie mir mit Kompetenz, konstruktiver Kritik und Diskussionsbereitschaft stets zur Seite standen. Danke für Eure unermüdliche, gutgelaunte Hilfsbereitschaft, nicht nur im wissenschaftlichen Bereich.

Dr. Ludwig Krabben, Dir besonderen Dank für das gründliche und geduldige Lektorat. Bedanken möchte ich mich ebenfalls für die fachliche Betreuung und Unterstützung, besonders am Anfang meiner Arbeit am FMP.

Dr. Peter Schmieder, vielen Dank für die unermüdlichen NMR-Messungen am Bindeprotein, das es uns nicht immer leicht machte.

Bei Prof. Dr. Andreas Engel und den Mitarbeitern der AG Strukturbiologie im Biozentrum Basel möchte ich mich für die Einweisung in die 2D-Kristallisation bedanken. Besonders Fabio Casagrande danke ich für die intensive Betreuung und Unterstützung, nicht nur während meines Gastaufenthaltes.

Frau Dr. Yvette Roske und den Mitarbeitern der AG Udo Heinemann des MDC-Berlin danke ich für die Kristallisationsscreens und ihre freundliche Unterstützung.

Johanna Becker, ich danke Dir nicht nur für die Festkörper-MAS-NMR-Messungen und Deine geduldige Einweisung in die Geheimnisse der NMR-Spektroskopie, sondern auch für Deine Freundschaft und die schönen außerwissenschaftlichen Ablenkungen.

Ein herzliches Dankeschön meiner Laborkollegin Janina Hahn für die entspannte Arbeitsatmosphäre im Labor und den Spaß außerhalb des Instituts. Ich werde Konzertkarten nie wieder in der Handtasche vergessen – versprochen!

Meinen Laborkollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und Eure Hilfsbereitschaft, auch außerhalb des FMP. Christian und Henrik, Ihr habt's echt drauf, auf zur nächsten Maibowle! Matthias, ich dank' Dir für die Idee, in Basel anzufragen und für Deine handwerklichen Fähigkeiten. Carolyn, Dir danke ich für die vielen Tassen Kaffee und Deine aufmunternden Worte. Kristina, danke für Deine oft rettende Hilfe und Unterstützung im Laboralltag und dafür, dass Du so bist wie Du bist.

Andrea Steuer, ich danke Dir für Deine unermüdliche Hilfe bei der Bewältigung von Formularen, administrativen Fragen und die vielen netten Gespräche. Lilo Handel und Martina Leidert, danke für Eure rettende oder organisatorische Hilfe in so mancher Situation.

Meinen engsten Freundinnen Ellen und Oliwia, von Herzen einfach nur –Danke für alles!

Meiner Mutter bin ich dankbar für ihre Unterstützung, ihre Kraft und ihre Liebe, die mich durch all die Jahre meiner Ausbildung begleitet haben. Danke, dass Du immer an mich geglaubt hast und für mich da bist.

Schließlich möchte ich einem unbeschreiblich wichtigen Menschen in meinem Leben danken. Sebastian, ich danke Dir dafür, dass Du an mich glaubst und mich so sein lässt wie ich bin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Funktion und Aufbau von ABC-Transportern	1
1.1.1	Die integralen Membranproteine der ABC-Transporter	4
1.1.2	Die Nukleotid-bindenden Domänen der ABC-Transporter	5
1.1.3	Die extrazellulären Substrat-Bindeproteine der ABC-Transporter	9
1.2	Dreidimensionale Strukturen vollständiger ABC-Transporter	10
1.3	Zum Mechanismus der ABC-Transportsysteme	14
1.4	Das ABC-Transportsystem ArtMP-J aus <i>G. stearothermophilus</i>	15
1.4.1	Der thermophile Organismus <i>G. stearothermophilus</i>	15
1.4.2	Der ABC-Importer ArtMP-J	16
1.5	NMR-Spektroskopie in der Strukturbiologie	17
1.5.1	Lösungs-NMR-Spektroskopie	18
1.5.2	Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie an ABC-Transportern	18
1.5.3	Selektives Markieren einzelner Aminosäuren	19
1.6	Motivation und Zielsetzung	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Chemikalien, Enzyme und Materialien	22
2.1.2	Oligonukleotide	22
2.1.3	Verwendete Vektoren und Plasmide	23
2.1.4	Verwendete Detergenzien	23
2.2	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Zellkultur	24
2.2.1	Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	24
2.2.2	Verwendete Medien	25
2.2.3	Anzuchtbedingungen	25
2.2.4	Expressionsuntersuchungen	25
2.3	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>-Zellkultur	26
2.3.1	Medium und Anzuchtbedingungen	26
2.3.2	Lipidextraktion	26
2.4	Molekularbiologische Methoden	26
2.4.1	Plasmidpräparation	26
2.4.2	Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen	26
2.4.3	Modifikation von DNA	27
2.4.4	Fällung von DNA	27

2.4.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.4.6	Subklonierung von <i>artP</i> und <i>artM</i>	28
2.4.7	Transformation	28
2.5	Expression rekombinanter Proteine	28
2.5.1	Expression von unmarkiertem Protein	28
2.5.2	Expression von ¹⁵ N- oder ¹³ C-, ¹⁵ N-markiertem Protein	29
2.5.3	Expression von selektiv markiertem ArtMP und ArtP	29
2.6	Reinigung rekombinanter Proteine	29
2.6.1	Zellaufschluss	29
2.6.2	Reinigung von ArtMP aus der Cytoplasmamembran	30
2.6.3	Reinigung von ArtP aus dem Cytosol	31
2.6.4	Reinigung von ArtJ aus dem Cytosol	31
2.7	Quantifizierung von Proteinen	32
2.7.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.8	Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese	32
2.8.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
2.8.2	Blau-Native-Polyacrylamidelektrophorese	32
2.8.3	Protein-Größenstandards	33
2.8.4	Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau	34
2.9	Spezifischer Nachweis von Proteinen	34
2.9.1	Immunoblotting	34
2.10	Präparation von Proteoliposomen	34
2.10.1	Herstellung eines Lipid-OG-Gemisches	35
2.10.2	Zusammensetzung eines Rekonstitutionsansatzes	35
2.11	Charakterisierung von ArtMP und seinen Untereinheiten	35
2.11.1	Bestimmung der ATPase-Aktivität	35
2.11.2	Inhibierung der ATPase-Aktivität durch Vanadat	36
2.11.3	Stabilitätsuntersuchungen gegenüber chaotropen Substanzen	36
2.11.4	Auftrennung von ArtMP in seine Untereinheiten	36
2.12	Optimierung der Detergenzbedingungen für ArtMP	37
2.12.1	Untersuchung der Detergenzverträglichkeit mit SDS-PAGE	37
2.12.2	Untersuchung der Detergenzverträglichkeit mit Blau-Nativer-PAGE	37
2.13	Kristallographische Methoden	37
2.13.1	Zweidimensionale Kristallisation von ArtMP	37
2.13.2	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von ArtMP-2D-Kristallen	38
2.13.3	Dreidimensionale Kristallisation von ArtP	38
2.14	Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie	39

2.15	Lösungs-NMR-Spektroskopie	39
2.15.1	2D- ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-Experimente	39
2.15.2	1D- ³¹ P- Experimente	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Präparation des ABC-Transporters ArtMP für biochemische und NMR-spektroskopische Untersuchungen	42
3.1.1	Präparation des ABC-Transporters ArtMP	42
3.1.2	Untersuchung des Einflusses verschiedener Detergenzien und des Oligomerzustandes von ArtMP durch SDS- und Blau-Native-PAGE	44
3.1.3	Rekonstitution des ABC-Transporters ArtMP in Lipide aus <i>G. stearothermophilus</i>	46
3.2	Biochemische Charakterisierung von ArtMP als Vorbereitung für die MAS-NMR-Untersuchungen	48
3.2.1	ATPase-Aktivitätsanalysen an ArtMP-J	48
3.2.2	Inhibition der ATPase-Aktivität	50
3.2.3	Markierungsstrategie für die NMR-Untersuchung von ArtMP: Auftrennung und Reassemblierung des ABC-Transporters	54
3.3	Getrennte Expression und Präparation der Untereinheiten des ABC-Transporters ArtMP	59
3.3.1	Präparation des Membranproteins ArtM	59
3.3.2	Präparation des ABC-Proteins ArtP	59
3.4	Kristallisation von ArtMP und ArtP	61
3.4.1	Zweidimensionale Kristallisation des ABC-Transporters ArtMP	61
3.4.2	Dreidimensionale Kristallisation von ArtP	66
3.5	Festkörper-MAS-NMR an ArtMP und ArtP	69
3.5.1	Markierungsstrategie für ArtMP und ArtP	70
3.5.2	MAS-NMR-Spektroskopie am ABC-Protein ArtP	71
3.5.3	MAS-NMR-Untersuchungen an dem ABC-Transporter ArtMP	77
3.5.4	Zusammenfassung der MAS-NMR-Messungen an ArtP und ArtMP	80
3.6	Lösungs-NMR-Untersuchungen am Substrat-Bindeprotein ArtJ	80
3.6.1	NMR-Messung an ¹⁵ N-ArtJ ohne weitere Zusätze	80
3.6.2	NMR-Messung an ¹⁵ N-ArtJ nach Substrat-Zugabe	81
3.6.3	NMR-Messung an der ¹⁵ N-ArtJ/Arginin-Probe nach Zugabe von ArtMP	83
3.6.4	NMR-Messung an ¹⁵ N-ArtJ unter Zugabe von Arginin, ArtMP und ATP/ MgCl ₂	84
3.6.5	Zusammenfassung der NMR-Messungen an ArtJ	85
4	Diskussion	86
4.1	Präparation und biochemische Untersuchung des ABC-Transporters ArtMP	86

4.1.1	Präparation des ABC-Transporters ArtMP _____	87
4.1.2	Untersuchungen zur ATPase-Aktivität von ArtMP _____	88
4.1.3	Auftrennung und Reassemblierung der Untereinheiten des ArtMP-Komplexes _____	90
4.1.4	Separate Herstellung der Untereinheiten des ABC-Transporters ArtMP _____	91
4.2	Kristallisation des ABC-Transporters ArtMP und des isolierten ArtP aus	
	<i>G. stearothermophilus</i> _____	92
4.2.1	2D-Kristallisation von ArtMP _____	92
4.2.2	2D-Kristallisation von ArtMP mit oder ohne ATP-Zugabe – Ausbildung unterschiedlicher Kristallformen _____	94
4.2.3	3D-Kristallisation des isolierten ArtP _____	97
4.3	Festkörper-MAS-NMR-Messungen an ArtP und ArtMP - im	
	Nukleotid-gebundenen und -ungebundenen Zustand _____	98
4.3.1	MAS-NMR-Messungen an ArtP-3D-Kristallen im Nukleotid-ungebundenen und - gebundenen Zustand _____	98
4.3.2	MAS-NMR-Messungen an 2D-Kristallen des ABC-Transporters ArtMP - im Nukleotid-freien und -gebundenen Zustand _____	100
4.3.3	Kombination der PDS-D-NMR-Spektren von ArtMP und ArtP _____	101
4.3.4	Zusammenfassung der NMR-Messungen an ArtP und ArtMP _____	102
4.4	NMR-spektroskopische Untersuchungen an ArtJ _____	103
	Zusammenfassung _____	106
	Summary _____	109
	Literaturverzeichnis _____	111
	Abkürzungsverzeichnis _____	121
	Veröffentlichungen _____	122

1 Einleitung

Die Zellen aller Organismen sind von Membranen umgeben, die das Cytoplasma vom extrazellulären Milieu abgrenzen. Gleichzeitig stellt die Cytoplasmamembran eine hochselektive Permeabilitätsbarriere dar, über die der essentielle Stoffaustausch zwischen dem Zellinneren und der extrazellulären Umgebung stattfindet. Die selektive Permeabilität der Membran beruht auf eingelagerten Transportproteinen, die nicht nur die spezifische Nährstoffaufnahme sowie die Sekretion der Stoffwechsel-Endprodukte regulieren, sondern auch für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Potentials verantwortlich sind. Diese Transportvorgänge erfolgen zum einen passiv durch Diffusion entlang eines elektrochemischen Gradienten oder aktiv unter Energieverbrauch gegen den Konzentrationsgradienten. Zum anderen gibt es aktive Transporter, die wie die primär aktiven Transportsysteme ihre Energie direkt aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) oder Phosphoenolpyruvat (PEP) beziehen, und die sekundär aktiven Transporter, die zur Energetisierung den elektrochemischen Gradienten über der Membran nutzen (Krämer, 1994). In der Klasse der aktiven Transportsysteme bilden die *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter eine der größten Proteinfamilien, die für eine Vielzahl von zellulären Vorgängen verantwortlich sind (Hyde *et al.*, 1990; Higgins & Linton, 2004; Linton & Higgins, 2006).

1.1 Funktion und Aufbau von ABC-Transportern

ABC-Transporter sind Membranproteinkomplexe, die ATP binden, hydrolysieren und die freiwerdende Energie zur unidirektionalen Translokation diverser Substrate über die Membran nutzen. Nachdem 1982 erstmals die Gene eines ABC-Transporters (Histidin-Importer HisQMP₂ aus *Salmonella typhimurium*) kloniert und sequenziert wurden (Higgins *et al.*, 1982), nahm die Anzahl bekannter ABC-Transportsysteme stetig zu. Diese Transporter gehören zur größten Familie homologer Membranproteine und sind sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryoten an vielen physiologischen Prozessen in der Zelle beteiligt (Saurin *et al.*, 1999). ABC-Transportsysteme zeichnen sich durch ihr breites Spektrum an transportierten Substraten aus, das von Ionen, über Zucker, Vitamine, Aminosäuren, Peptide, Lipide bis zu Toxinen, wie z.B. Antibiotika, reicht (Übersicht: Higgins, 1992). Zur Familie der ABC-Transportkomplexe gehören auch Vertreter, die keine aktiven Transporter sind. Der *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) beispielsweise

besitzt keine aktive Transportfunktion, sondern stellt einen Nukleotid-regulierten Ionenkanal dar (Hanrahan *et al.*, 2003). Dazu gehört ebenfalls das *suphonyl urea receptor* (SUR)-Protein, das in ähnlicher Weise einen Kalium-Kanal reguliert (Inagaki *et al.*, 1995; Matsuo *et al.*, 2003), sowie Proteine, die in die Chromatin-Organisation (Hirano, 2006) oder in die DNA-Reparatur (Hopfner *et al.*, 2000) involviert sind.

Im menschlichen Genom wurden bisher 48 ABC-Transportsysteme identifiziert. Einige Vertreter sind von hoher medizinischer Relevanz, da ihre Mutation die Ursache für Erbkrankheiten wie Mukoviszidose, Adrenoleukodystrophie oder Stargardtsche Makuladegeneration sind (Dean *et al.*, 2001; Linton, 2007). Des Weiteren ist in der Überexpression bestimmter ABC-Transporter, wie die des humanen P-Glykoproteins (*P-gp*, MDR1), die als „*multidrug-resistance*“ (MDR) bezeichnete Resistenz von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika begründet.

ABC-Transporter besitzen trotz ihrer großen Komplexität in Funktion und Substratspezifität eine gemeinsame Architektur, die schon 1986 von Higgins *et al.* beschrieben wurde. Ein typischer ABC-Transportkomplex besteht aus vier Untereinheiten (Abbildung 1). Zwei integrale, hydrophobe Transmembran-Domänen (TMDs - in Abbildung 1 gelb/blau) bilden die Translokationspore für ein spezifisches Substrat und zwei cytoplasmatisch assoziierte Nukleotid-bindende Domänen (NBDs - in Abbildung 1 grün/violett) energetisieren den Transportvorgang durch die Hydrolyse von ATP (Higgins, 1992).

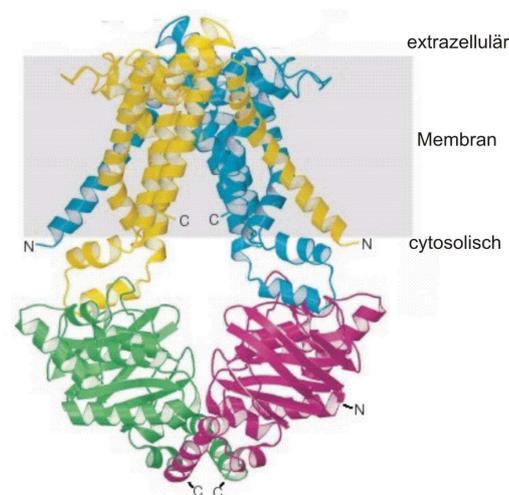


Abbildung 1 **Modulare Organisation von ABC-Transportern.** Beispielhaft für den einheitlichen Aufbau der ABC-Transporter ist das Wolframat/Molybdat-Transportsystem ModBC (Proteindatenbank Zugangscode 2ONK) aus *Archaeoglobus fulgidus* gezeigt, bestehend aus zwei TMDs ModB und zwei NBDs ModC (Hollenstein *et al.*, 2007).

Während eukaryotische ABC-Transporter ausschließlich Exportsysteme sind, finden sich in Prokaryoten auch importierende Transportsysteme, die zusätzlich ein extrazelluläres Substrat-Bindeprotein besitzen (Boos & Lucht, 1996). In prokaryotischen Organismen sind die einzelnen Untereinheiten des Transportkomplexes häufig separate Proteine (Abbildung 2 - A und D), die Domänen vieler eukaryotischer ABC-Transporter hingegen sind oft fusioniert (Abbildung 2 - E, F, G). Einige prokaryotische ABC-Transportsysteme verfügen zudem über spezielle Porine in der äußeren Membran, die die Diffusion der Substrate in den periplasmatischen Raum erleichtern (Nikaido & Vaaro, 1985; Nikaido, 1994).

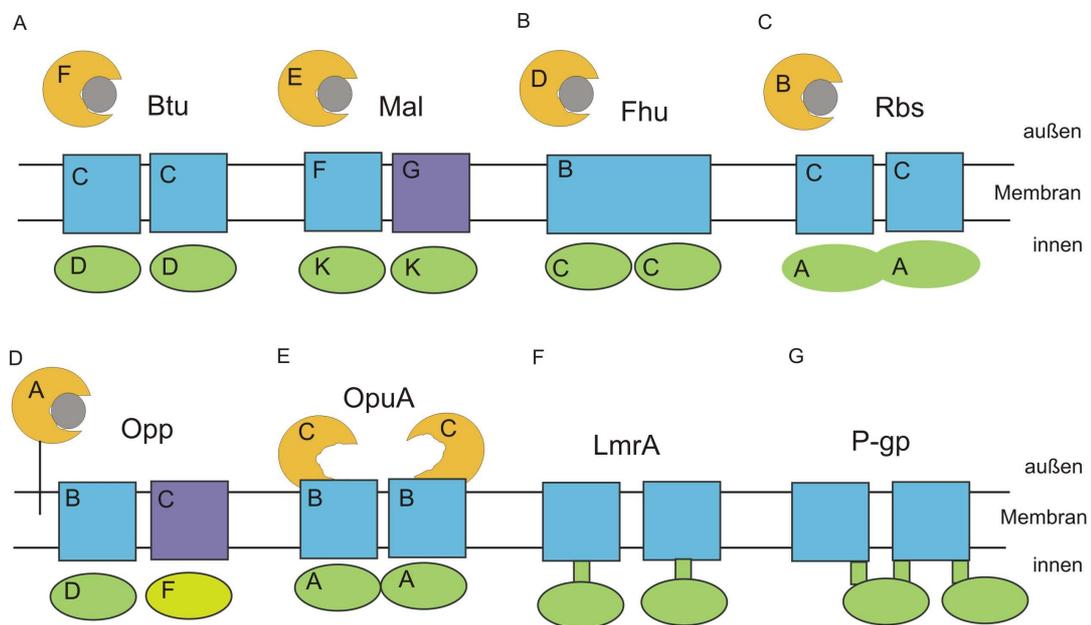


Abbildung 2

Domänenorganisation von ABC-Transportern. Farbige Darstellung: orange - Bindeprotein; blau/violett - TMD; grün - NBD. Beispielhaft sind dargestellt: **(A)** die aus je vier (fünf mit dem Substrat-Bindeprotein) getrennten Untereinheiten organisierten Vitamin B₁₂- und Maltose-Transporter, in denen die TMDs als Homo- (BtuC) oder Heterodimer (MalFG) auftreten, **(B)** der aus getrennten NBDs und fusionierten TMDs bestehende Eisen-Hydroxamat-Transporter, **(C)** der aus fusionierten NBDs und separaten TMDs aufgebaute Ribose-Transporter, **(D)** OppABCDF bestehend aus verschiedenen TMDs und NBDs sowie einem Substrat-Bindeprotein OppA, das in gram-positiven Bakterien in der Zellmembran verankert ist, **(E)** der OpuABC-Transporter, in dem die Substrat-Bindedomäne direkt mit den TMDs fusioniert ist, **(F)** LmrA, ein aus zwei TMD-NBD Kombinationen aufgebauter MDR-ABC-Transporter und **(G)** der aus einer Polypeptidkette mit vier Domänen bestehende MDR-ABC-Transporter P-Glykoprotein (MDR1).

1.1.1 Die integralen Membranproteine der ABC-Transporter

Die TMDs der ABC-Transportsysteme formen den Translokationsweg für die Substrate und bestehen aus α -Helizes, die die Cytoplasmamembran mehrfach durchspannen. Die Anzahl der Transmembran-Helizes variiert innerhalb der verschiedenen ABC-Transporter-Untergruppen stark und liegt zwischen vier und zehn α -Helizes pro TMD. Die Mehrzahl der TMDs besteht aus sechs transmembranen Helizes, deren C- und N-Termini in das Cytoplasma gerichtet sind (Boos & Lucht, 1996).

Die Substratdiversität der ABC-Transporter spiegelt sich in der geringen Sequenzkonservierung der TMDs innerhalb der Proteinfamilie wider, wodurch vergleichende Analysen deutlich erschwert werden. In den bisher veröffentlichten Kristallstrukturen der vollständigen ABC-Transporter ist zu erkennen, dass die TMDs zumindest zwei deutlich verschiedene Konformationen einnehmen können (Abbildung 3). Der aus den TMDs geformte Translokationskanal ist dabei entweder zur cytoplasmatischen oder zur extrazellulären Seite der Membran geöffnet (Higgins & Linton, 2004; Hollenstein *et al.*, 2007; Dawson & Locher, 2007).

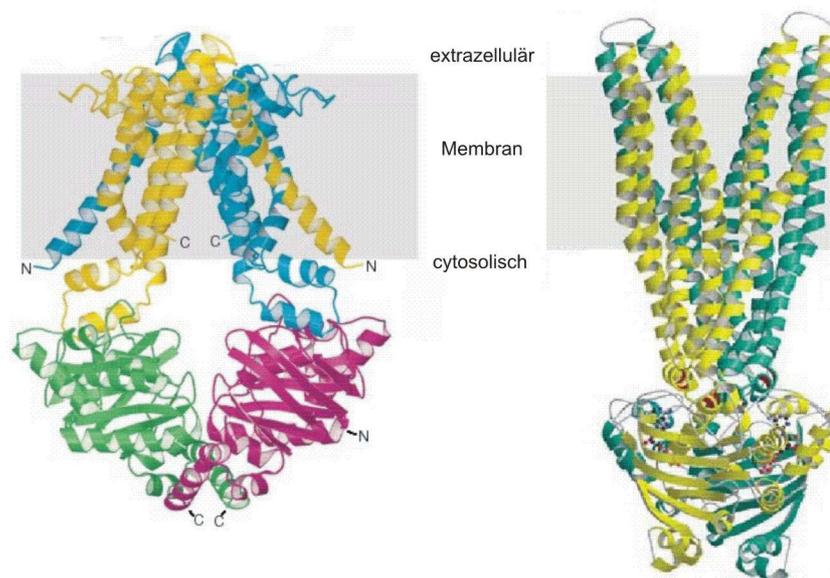


Abbildung 3 **Unterschiedliche Konformationen der TMDs.** In der linken Kristallstruktur des Wolframat/Molybdat-Transporters ModBC aus *A. fugidus* (Proteindatenbank Zugangscode 2ONK) nehmen die TMDs eine zur cytosolischen Membranseite geöffnete Konformation ein. Die Kristallstruktur von Sav1866 aus *S. aureus* (Proteindatenbank Zugangscode 2HYD) zeigt die Membranproteine in einer zum extrazellulären Raum geöffneten Konformation.

Eine der wenigen Übereinstimmungen in der Sequenz der TMDs ist das EAA-Motiv (EAA-x₃-G-x₉-I-x-LP, wobei x für eine beliebige Aminosäure steht), das sich in der vierten cytoplasmatischen Schleife fast aller TMDs von ABC-Importsystemen befindet (Dassa & Hofnung, 1985; Mourez *et al.*, 1997). Das EAA-Sequenzmotiv wird als Kontaktbereich zwischen TMD und NBD angesehen, in dem die Signalübertragung zwischen den Transportkomplex-Unterheiten stattfindet (Locher *et al.*, 2002; Linton & Higgins, 2006). Die Bedeutung dieses Sequenz-Motivs wurde mit Mutationsanalysen belegt, in denen der Austausch von Aminosäuren oder die Mutation des hoch konservierten Glycins, zu einem Verlust der Transportaktivität führte (Mourez *et al.*, 1997).

1.1.2 Die Nukleotid-bindenden Domänen der ABC-Transporter

Die NBDs oder ABC-Proteine sind in den ABC-Transportsystemen für die Kopplung der aus ATP-Bindung und -Hydrolyse freiwerdenden Energie mit der Translokation des Substrats verantwortlich (Ames, 1992; Higgins, 1992; Schneider & Hunke, 1998). Die NBDs sind als Homo- oder Heterodimer auf der cytoplasmatischen Seite an die Membrandomänen assoziiert. Sie weisen Sequenzidentitäten von mehr als 30 % auf, wobei die pro- oder eukaryotische Herkunft der NBDs und die Art des transportierten Substrats unerheblich sind (Pinkett *et al.*, 2007). Sie sind durch mehrere charakteristische, hoch konservierte Sequenzmotive gekennzeichnet (siehe Sequenzalignment Abbildung 4; Higgins *et al.*, 1986). Dazu gehören die für viele ATP-abhängige Proteine typischen Walker A- (G-x-x-G-x-G-K-T/S, x steht für eine beliebige Aminosäure) und Walker B-Motive (h-h-h-h-D, wobei h eine hydrophobe Aminosäure darstellt) (Walker *et al.*, 1992). Durch die Interaktion der Walker A- und B-Regionen wird ein Phosphatbindungsmotiv, die P-Schleife, geformt, das die ATP-Bindestelle bildet. Ein weiterer hoch konservierter Bereich ist die vor dem Walker B-Motiv lokalisierte ABC-Signatursequenz (Konsensus: LSGGQ, auch C-Schleife genannt), die charakteristisch für die NBD ist und zur Identifikation von Mitgliedern der ABC-Transporter-Familie genutzt wird (Schmees *et al.*, 1999). Weitere konservierte Sequenzbereiche sind die D-, H- und Q-Schleifen.

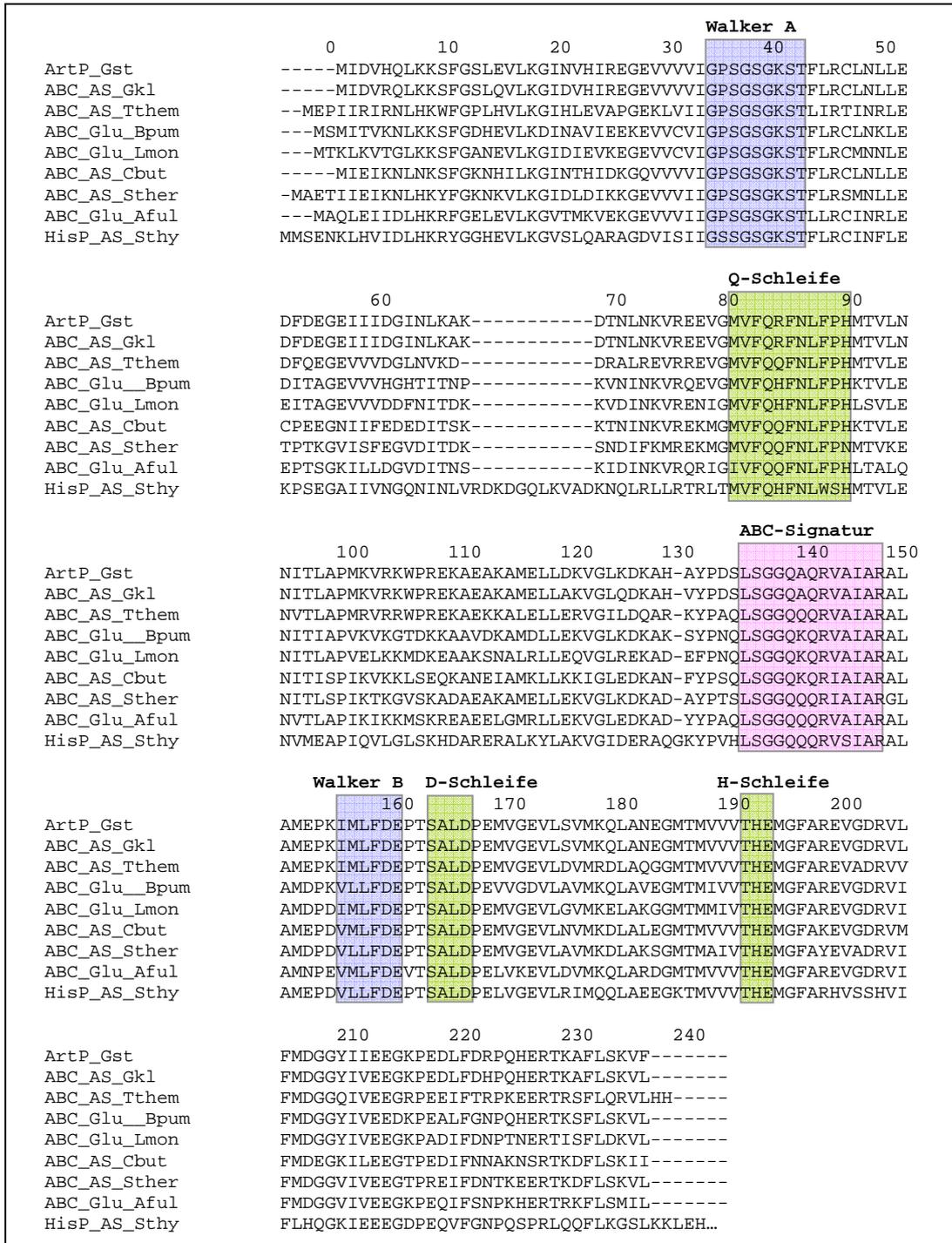


Abbildung 4 Sequenzalignment von ArtP aus *G. stearothermophilus* (ArtP_Gst) mit verwandten ABC-Proteinen aus Aminosäure-Importsystemen verschiedener Organismen. Konservierte Sequenzmotive sind benannt und durch Rahmen hervorgehoben. Die verglichenen NBDs stammen aus: *Geobacillus kaustophilus* (ABC_AS_Gkl, acc. no. YP_149308), *Thermus thermophilus* (ABC_AS_Tthem, acc. no. YP_004768), *Bacillus pumilus* (ABC_Glu_Bpum, acc. no. YP_001488700), *Listeria monocytogenes* (ABC_Glu_Lmon, acc. no. ZP_00232468), *Clostridium botulium* (ABC_AS_Cbut, acc. no. YP_001254518), *Streptococcus thermophilus* (ABC_AS_Sther, acc. no. YP_141017), *Archaeoglobus fulgidus* (ABC_Glu_Aful, acc. no. NP_069514) und *Salmonella typhimurium* (HisP_AS_Sthy, acc. no. P02915).

Als erste Kristallstruktur einer isolierten NBD wurde 1998 die des HisP der Histidin-Permease aus *S. typhimurium* von Hung *et al.* beschrieben. Seitdem sind weitere dreidimensionale Strukturen von NBDs in unterschiedlichen funktionellen Zuständen bestimmt worden. Die Kristallstrukturen bestätigen die L-förmige Grundstruktur der NBDs, die aus der katalytischen und der helikalen Subdomäne aufgebaut sind (Diederichs *et al.*, 2000; Gaudet & Wiley, 2001; Schmitt *et al.*, 2003) (Abbildung 5). Die helikale Domäne, die vollständig aus α -Helizes besteht, enthält die konservierte ABC-Signatursequenz und eine gering konservierte strukturell variable Region, die den Kontaktpunkt zu den TMD darstellt (Schmitt *et al.*, 2003). In der katalytischen NBD-Subdomäne befinden sich alle weiteren konservierten Bereiche, wie die Walker A- und B-Regionen. Die Subdomänen der NBD sind über die Q-Schleife miteinander verbunden. Einen Überblick über die Anordnung der Subdomänen und der Lage der beschriebenen konservierten Motive gibt Abbildung 5 anhand der Struktur der isolierten NBD des ABC-Transporters HlyB aus *E. coli* (Schmitt *et al.*, 2003).

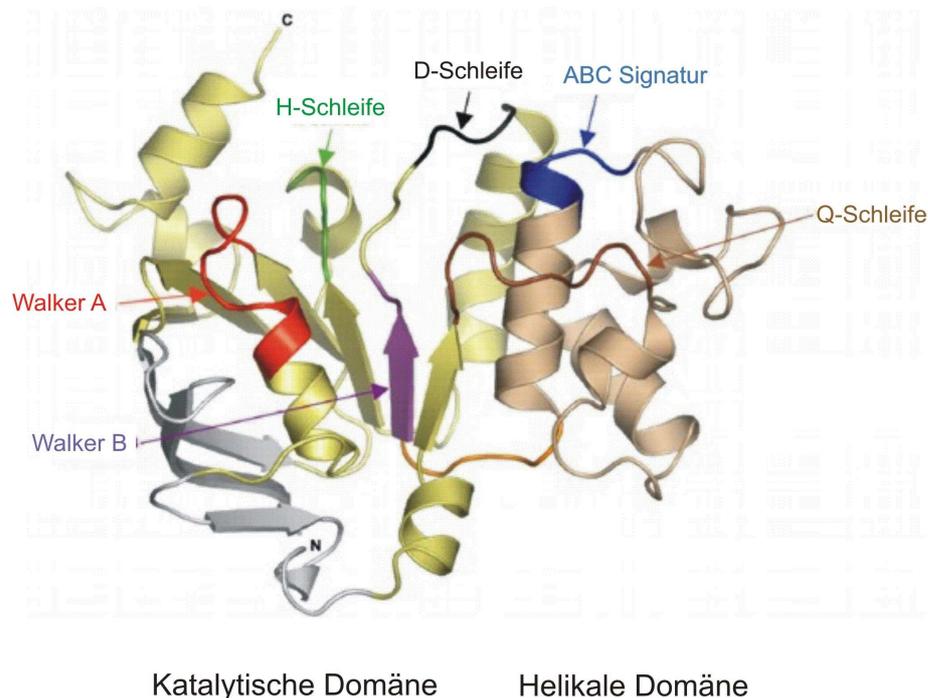


Abbildung 5 **NBD-Struktur mit konservierten Regionen.** Es ist die monomere Struktur der isolierten NBD des ABC-Transporters HlyB (Proteindatenbank Zugangscode 1MT0) gezeigt. Die konservierten Sequenzmotive und Schleifen der NBDs sind farblich hervorgehoben und bezeichnet. Die katalytische Subdomäne ist in hellgelb und hellgrau, die helikale Domäne in hellbraun dargestellt (modifiziert nach Zaitseva *et al.*, 2005b).

Einige der bestimmten Strukturen zeigen die NBDs in dimerisiertem Zustand (Zaitseva *et al.*, 2005b; Smith *et al.*, 2002). Zwischen den Monomeren sind zwei gebundene ATP-Moleküle zu finden. Biochemische und strukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Dimerisierung der monomeren NBDs durch die ATP-Bindung induziert wird und für die Funktion der ABC-Transporter essentiell ist (Fetsch & Davidson, 2002; Moody *et al.*, 2002; van Veen *et al.*, 2000; Linton, 2007). Die NBDs dimerisieren, indem jeweils das in der P-Schleife des einen Monomers gebundene ATP die Signatursequenz des anderen NBD-Monomers kontaktiert (Zaitseva *et al.*, 2005a; Hollenstein *et al.*, 2007). Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 6 ein NBD-Dimer in einer geschlossenen Konformation, also im ATP-gebundenen Zustand, dargestellt. Die durch die ATP-Bindung induzierte Dimerisierung verursacht sehr wahrscheinlich Konformationsänderungen in den benachbarten TMDs. Für die Signalübertragung zwischen den TMDs und den NBDs ist die Q-Schleife, die die NBD-Subdomänen miteinander verbindet, von besonderer Bedeutung (Hollenstein *et al.*, 2007; Linton, 2007). Die ATP-Bindung und -Hydrolyse an den NBDs erfolgt kooperativ (Davidson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997). Die Inaktivierung einer NBD des Dimers führt zu einem kompletten Funktionsverlust des Transporters (Davidson *et al.*, 2002).

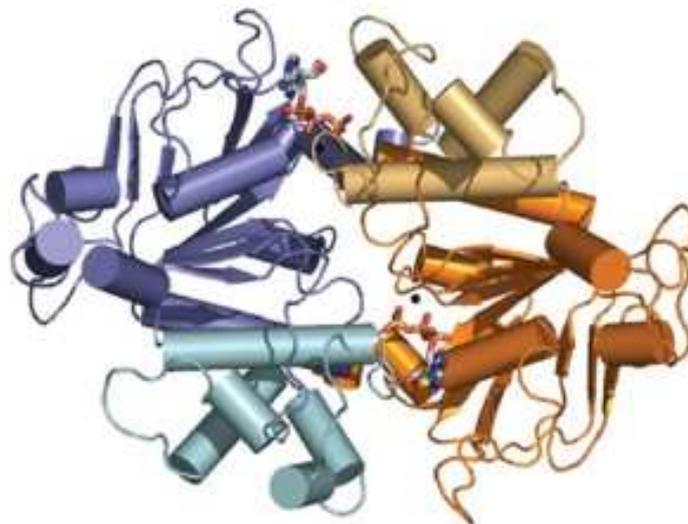


Abbildung 6 **Struktur eines NBD-Dimers.** Dargestellt ist ein Dimer aus NBDs, die einander entgegengesetzt orientiert sind und zwischen sich zwei ATP-Moleküle gebunden haben. Das NBD-Dimer ist von der Membranseite gesehen abgebildet. Die Monomere sind in Blau- bzw. Gelbtönen gezeigt. Die katalytischen Subdomänen sind in dunkelblau bzw. orange, die helikalen Subdomänen in hellblau bzw. gelb dargestellt. Es verdeutlicht die gegenständige Anordnung der NBD-Monomere im Dimer, die durch die Bindung des ATP stabilisiert wird (Linton, 2007).

1.1.3 Die extrazellulären Substrat-Bindeproteine der ABC-Transporter

Die Substrat-Bindeproteine der bakteriellen ABC-Importer sind für jedes Transportsystem spezifisch. Ihre Aufgabe ist es, das extrazelluläre Substrat zu binden und es an die TMDs der Transporter abzugeben, wodurch die Bindeproteine wesentlich für die Substratspezifität des Systems verantwortlich sind (Quioco & Ledvina, 1996; Boos & Lucht, 1996). Bei gram-negativen Bakterien liegen die Substrat-Bindeproteine gelöst im Periplasma vor. Im Unterschied dazu sind die Bindeproteine in gram-positiven Bakterien und Archaea durch eine an den N-Terminus des Proteins angehängte Lipidgruppe in der Membran verankert (Gilson *et al.*, 1988; Elferink *et al.*, 2001). Bei einigen ABC-Transportern, wie dem OpuABC-Protein des OpuA-Systems aus *L. lactis*, ist das Substrat-Bindeprotein mit den TMDs des ABC-Transporters fusioniert (van der Heide & Poolman, 2000).

Substrat-Bindeproteine weisen trotz ihrer geringen Sequenzhomologie und der unterschiedlichen Substratspezifität große strukturelle Ähnlichkeiten auf. Sie bestehen meist aus zwei ähnlich gefalteten globulären Domänen, die jeweils wiederum aus einem zentralen β -Faltblatt bestehen, das von α -Helizes flankiert wird. Die beiden Domänen sind über β -Faltblätter miteinander verbunden (Wilkinson & Verschuren, 2003; Abbildung 7). Die gelenkartige Verbindung der beiden Domänen ermöglicht eine konformationelle Flexibilität innerhalb des Proteins (Wilkinson & Verschuren, 2003).

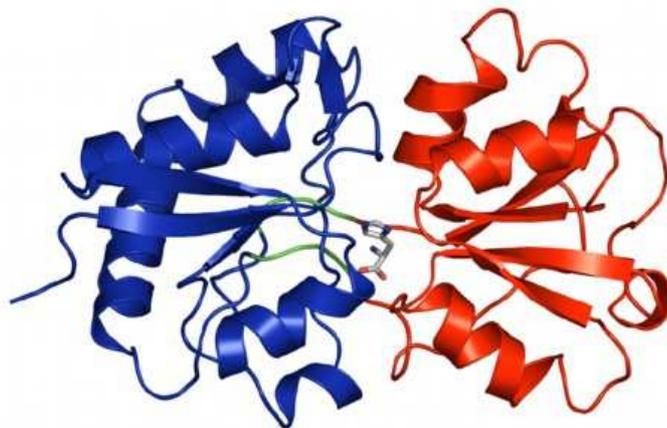


Abbildung 7 **Struktur der Substrat-Bindeproteine.** Dargestellt ist HisJ aus *E. coli* mit gebundenem Histidin (Proteindatenbank Zugangscode 1HSL). Die Domänenstruktur ist durch die unterschiedliche farbliche Kennzeichnung hervorgehoben.

In der Spalte zwischen den beiden Domänen befindet sich die Substrat-Bindestelle. Die Proteine liegen in Abwesenheit eines Liganden in einer offenen Konformation vor (Sharff *et al.*, 1992; Quicho & Ledvina, 1996; Davidson, 2002). Die Bindung des Liganden induziert Konformationsänderungen im Protein, die zum Schließen der Spalte und in den meisten Proteinen zu einem Einschluss des gebundenen Liganden im Protein führt (Quicho & Ledvina, 1996; Quicho *et al.*, 1997). In dieser geschlossenen Konformation tritt das Substrat-beladene Bindeprotein mit den TMDs der Transportkomplexe in Wechselwirkung. Der Kontakt zu den TMDs des Transporters ist entscheidend für das Öffnen der beiden Bindeprotein-Domänen und das Freigeben des gebundenen Liganden (Hvorup *et al.*, 2007, Oldham *et al.*, 2007). In den Kristallstrukturen von BtuCD-F und MalFGK₂ mit gebundenen Maltose-Bindeprotein (MBP) kontaktieren die Substrat-Bindeproteine mit je einer ihrer beiden Domänen ein Membranprotein des jeweiligen ABC-Transporters. Bei dem Vitamin B₁₂-Transporter findet diese Interaktion über Salzbrücken zwischen einem Argininrest der TMD und Glutamatresten des Bindeproteins statt. Beide, BtuCD-F und MBP-MalFGK₂, Strukturen zeigen, dass für das Entlassen des Substrates in den Translokationskanal nicht nur das Öffnen der Bindeprotein-Domänen verantwortlich ist, sondern auch eine periplasmatische Schleife der TMD, die in die Substrat-Bindetasche ragt. Dort nimmt sie den Platz des Vitamin B₁₂ bzw. der Maltose ein und verdrängt so das Substrat aus der Bindestelle.

1.2 Dreidimensionale Strukturen vollständiger ABC-Transporter

Die hohe medizinische Relevanz und das Interesse an der Aufklärung der molekularen Zusammenhänge des Transportmechanismus waren und sind Antrieb, die dreidimensionale Struktur der ABC-Transporter zu bestimmen und zu untersuchen. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit lagen sieben gelöste Kristallstrukturen von fünf verschiedenen ABC-Transportern vor (Abbildung 8). Vier der fünf Transportsysteme sind bakteriellen Ursprungs, eines stammt aus einem Archaea. Von dem Vitamin B₁₂-Importsystem BtuCD-F aus *E. coli* existieren momentan zwei Strukturen: die von BtuCD allein und die des ABC-Transporters im Komplex mit dem zugehörigen Substrat-Bindeprotein BtuF (Locher *et al.*, 2002; Hvorup *et al.*, 2007). Bei der dritten Struktur handelt es sich um den Metall-Chelat-Transporter HI1470/1471 aus *Haemophilus influenza* (Pinkett *et al.*, 2006), der aufgrund der Ähnlichkeit der

transportierten Substrate eine starke Homologie zu dem ABC-Transporter BtuCD aufweist. Die weiteren Kristallstrukturen sind die des bakteriellen *multidrug*-Transporters Sav1866 aus *Staphylococcus aureus*, sowohl im Nukleotid-freien als auch im Nukleotid-gebundenen Zustand (Dawson & Locher, 2006; Dawson & Locher, 2007), ModBC-A, ein Molybdat/Wolframat-Transporter aus *Archaeoglobus fulgidus* (Hollenstein *et al.*, 2007) und MBP-MalFGK₂, einem kompletten Maltose-Transportsystem aus *E. coli* (Oldham *et al.*, 2007).

Die ABC-Transportkomplexe BtuCD, HI1470/1471, ModBC und MalFGK₂ sind Bindeprotein-abhängige Importer, Sav1866 ist dagegen ein bakterieller *drug*-Exporter (Strukturen zusammengefasst in Abbildung 8). Die Importsysteme setzen sich jeweils aus vier separaten Proteinen zusammen. Hinzu kommt das jeweilige extrazelluläre Substrat-Bindeprotein. Die TMDs und NBDs der Transporter BtuCD, HI1470/1471 und ModBC bilden Homodimere. Der Maltose-Transporter MalFGK₂ hingegen besteht aus heterodimeren TMDs MalF und MalG sowie den homodimeren NBDs MalK. Der Exporter Sav1866 ist ein so genannter Halb-Transporter, bei dem jeweils eine Membran-Untereinheit mit einer NBD fusioniert ist. Der Halb-Transporter dimerisiert, um ein funktionelles Transportsystem zu bilden.

In den homologen Transportern BtuCD und HI1470/1471 weist jede TMD 10 Membran durchspannende Helizes auf, wohingegen die TMDs der ABC-Transporter mit der geringeren Sequenzidentität Sav1866, ModBC-A und MBP-MalFGK₂ aus sechs bzw. acht transmembranen Helizes bestehen. Der Molybdat- und Maltose-Transporter weisen in ihren Kristallstrukturen deutliche Ähnlichkeiten im Bereich der TMDs auf, obwohl ihre Sequenzen nur wenig homolog sind. Nach Meinung von Oldham *et al.* (2007) deutet das auf einen gemeinsamen Translokationsmechanismus hin. Zwischen den integralen Membranproteinen wird ein großer wassergefüllter Kanal gebildet, der den Translokationsweg für den Liganden darstellt. In den Strukturen der ABC-Importsysteme HI1470/1471 und ModBC-A ist die durch die TMDs geformte Kammer zur cytoplasmatischen Seite, in dem *multidrug*-Exporter Sav1866 hingegen zur extrazellulären Seite der Membran geöffnet. Die Kristallstruktur von MBP-MalFGK₂ bildet das gesamte ABC-Transportsystem in einem katalytischen Intermediärzustand ab, in dem das NBD-Dimer zur ATP-Hydrolyse geschlossen ist und das Substrat Maltose vom Bindeprotein an die TMD weitergegeben wurde. Die Strukturen des mit und ohne Bindeprotein kristallisierten Vitamin B₁₂-Transporters BtuCD stellen nach Meinung der

Autoren Hvorup *et al.* (2007) ebenfalls intermediäre Konformationszustände dar, die BtuCD bzw. BtuCD-F während eines Translokationszyklus einnehmen könnte.

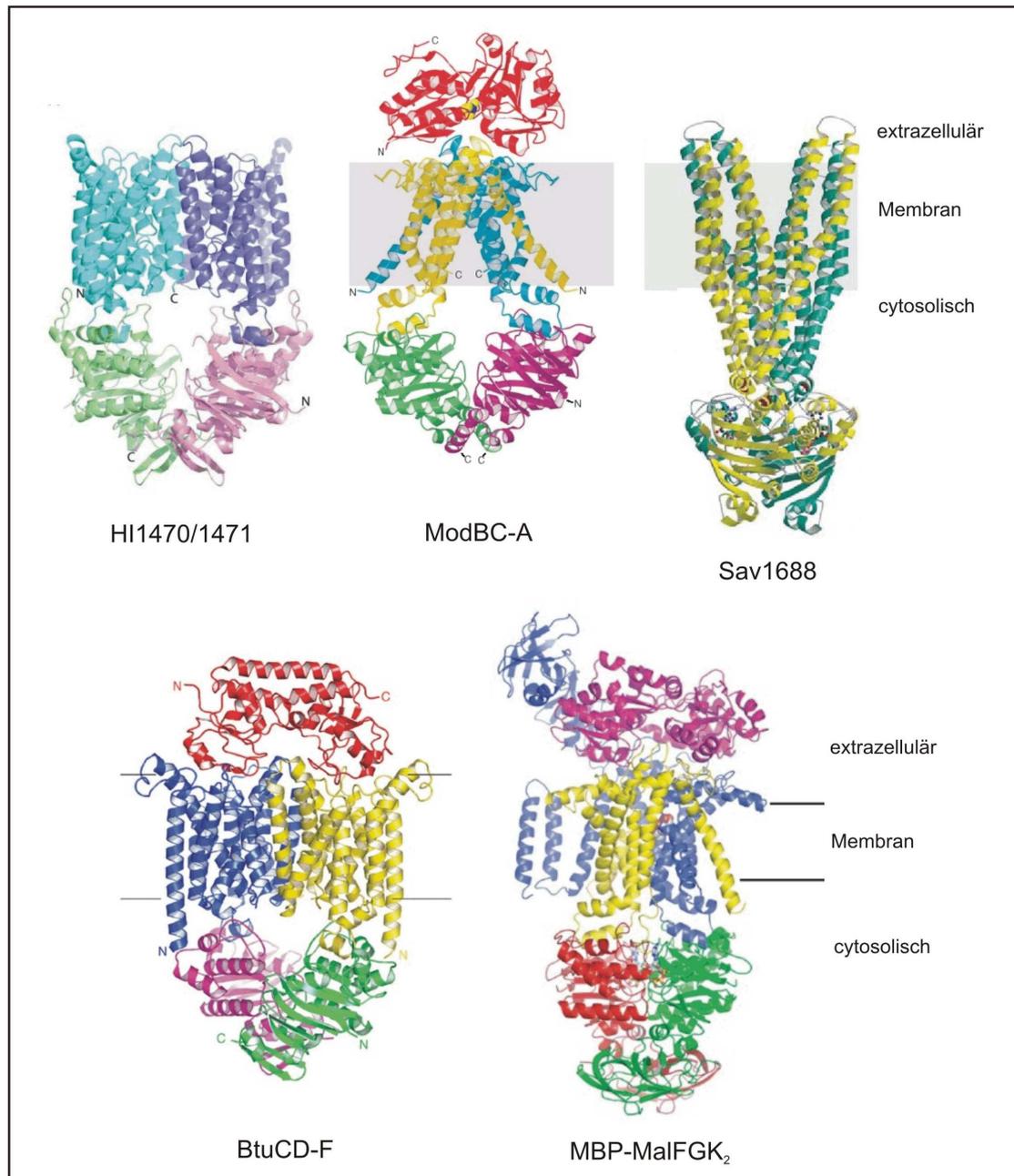


Abbildung 8 **Kristallstrukturen von ABC-Transportern.** Gezeigt sind die Strukturen der prokaryotischen Importsysteme BtuCD-F, HI1470/1471, ModBC-A und MBP-MalFGK₂ sowie der des *multidrug*-Exporters Sav1866. BtuCD-F (Proteindatenbank Zugangscode 2GI9) und HI1470/1471 (Proteindatenbank Zugangscode 2NQ2) wurden ohne Nukleotid-Zusätze, ModBC-A (Proteindatenbank Zugangscode 2ONK) mit Na₂WO₄, Sav1866 (Proteindatenbank Zugangscode 2HYD) mit ADP und MBP-MalFGK₂ (Proteindatenbank Zugangscode 2R6G) mit ATP kristallisiert. Membranen sind durch Striche oder grau gekennzeichnet.

In den Kristallstrukturen des *multidrug*-Exporters Sav1866 und des Maltose-Importers liegen die NBDs im Nukleotid-gebundenen Zustand als Dimer vor, so dass beide Systeme zur cytoplasmatischen Seite der Membran geschlossen sind. Die Ähnlichkeit zwischen der Nukleotid-gebundenen Konformation von Ex- und Importern deutet nach Meinung von Oldham *et al.* (2007) darauf hin, dass beide Transportsysteme trotz der gegensätzlichen Translokationsrichtung über einen gemeinsamen Kopplungsmechanismus zwischen ATP-Hydrolyse und Substrattransport verfügen.

Neben einem detaillierteren Verständnis von Aufbau und Organisation der ABC-Transporter bot die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur dieser fünf Vertreter der Proteinfamilie Lösungsansätze für noch ungeklärte oder kontrovers diskutierte Fragen, wie beispielsweise zum molekularen Ablauf der Translokation und zur Kopplung der verschiedenen Intermediärzustände der NBDs an die Konformationsänderungen der TMDs. In den Strukturen der ABC-Importsysteme BtuCD, HI1470/1471 und ModBC hat jede Untereinheit des Transportkomplexes nur Kontakt zu seinem direkten Nachbarn, nicht aber zu dem diagonal gelegenen, wodurch große Kammern im Zwischenraum der Membranproteine entstehen. Ein Großteil der Kontaktfläche wird von der Q-Schleife der NBDs und von cytoplasmatischen Schleifen der TMDs, die das EAA-Motiv enthalten, gebildet (Hollenstein *et al.*, 2007). In der MBP-MalFGK₂-Struktur kontaktiert ebenfalls jede TMD jeweils eine NBD, doch ist hier der C-Terminus des Membranproteins MalG in die Zwischenfläche des NBD-Dimers MalK₂ geschoben und kann so mit beiden NBD-Monomeren interagieren. In der Kristallstruktur des Exporters Sav1866 hingegen ist der Kontaktbereich zwischen den Domänen deutlich anders. Hier kontaktiert jede der beiden TMD jeweils beide NBDs. Es wurde innerhalb der bereits beschriebenen strukturell variablen Region der NBDs ein konserviertes Sequenzmotiv (TEVGERG) gefunden (Schmitt *et al.*, 2003; Dawson & Locher, 2006), das für ABC-Transporter mit einer exportierenden Funktion spezifisch zu sein scheint und vermutlich für die Kommunikation zwischen den integralen Membranproteinen und den NBDs verantwortlich ist (X-Schleife). Dieses Sequenzmotiv kommt in den ABC-Importern nicht vor.

Für eine zweifelsfreie und zufriedenstellende Beantwortung der noch immer offenen oder diskutierten Fragen zu den ABC-Transportern und ihrer Funktion reicht die Kristallstruktur einzelner Konformationen eines ABC-Transportsystems nicht aus. Wünschenswert wären hingegen strukturelle Informationen und hochaufgelöste Strukturen eines ABC-Transportkomplexes, der sich in verschiedenen

konformationellen Zuständen innerhalb des Translokationszyklus befindet, um so die molekularen Zusammenhänge des Transportprozesses zu verstehen.

1.3 Zum Mechanismus der ABC-Transportsysteme

Die aus den Kristallstrukturen der ABC-Transporter gewonnenen Erkenntnisse wurden zusammen mit den Ergebnissen biochemischer Untersuchungen dazu verwendet, ein Modell zum Ablauf der Substrattranslokation aufzustellen. Der Transportmechanismus beinhaltet eine Kopplung des ATP-katalytischen Zyklus der NBDs mit Konformationsänderungen der TMDs, die in der Translokation des Substrats resultieren (Higgins & Linton, 2004; Does & Tampe, 2004; Linton, 2007; Hollenstein *et al.*, 2007; Hvorup *et al.*, 2007). Als Schlüsselereignis des Transportvorgangs wird die durch die Bindung des ATP induzierte Dimerisierung der NBDs angesehen. Diese mechanische Bewegung verursacht große Konformationsänderungen in den TMDs, die zu einer Öffnung des Translokationskanals für das Substrat führen. Die anschließende Hydrolyse des ATP führt zu einer Destabilisierung und Dissoziation des NBD-Dimers, wodurch erneute strukturelle Änderungen in den TMDs hervorgerufen werden. Nach dem Verlassen der Hydrolyse-Produkte ADP und P_i aus den NBDs befindet sich der Transporter wieder im Grund- oder Ruhezustand.

Für die Importsysteme wurde zuletzt aufgrund der vorhandenen hochaufgelösten Kristallstrukturen der ABC-Transporter BtuCD-F, ModBC-A, MBP-MalFGK₂ und HI1470/1471 ein Modell zum Mechanismus der Substrattranslokation aufgestellt, das „*basic two-state scenario*“ (Pinkett *et al.*, 2007; Hollenstein *et al.*, 2007; Hvorup *et al.*, 2007; Oldham *et al.*, 2007). Die Autoren stellen den durch die ATP-Bindung induzierten Wechsel der TMD-Konformation von einer zur cytoplasmatischen Seite der Membran geöffneten („*inward-facing state*“) zur extrazellulären Seite der Lipidmembran erweiterten Form („*outward-facing state*“) in den Mittelpunkt des skizzierten Ablaufs. ABC-Importer erhalten diesem Modell entsprechend in der ATP-gebundenen, nach außen hin geöffneten Konformation ihr Substrat vom jeweiligen Bindeprotein. Durch die Dissoziation der Hydrolyse-Produkte ADP und P_i werden erneute Konformationsänderungen der TMDs verursacht, die zu einer Öffnung des Transporters zur cytoplasmatischen Seite der Membran und zu einem Entlassen des Substrats in das Cytoplasma führen (Davidson, 2004; Oldham *et al.*, 2007).

Die Konformationsänderungen der NBDs, die zwischen dem Nukleotid-freien, monomeren und dem ATP-gebundenen, dimeren Zustand wechseln, ist wahrscheinlich innerhalb der gesamten ABC-Transporter-Familie konserviert. Die Konformationen der TMDs sind in den sieben bisher bekannten Strukturen hingegen divers. Möglicherweise entwickelten die TMDs aufgrund der Verschiedenartigkeit der transportierten Substrate und der Transportsrichtungen unterschiedliche Wege, die konformationellen Änderungen der NBDs an die Substrattranslokation zu koppeln.

1.4 Das ABC-Transportsystem ArtMP-J aus *G. stearothermophilus*

Das ABC-Transportsystem ArtMP-J des thermophilen Organismus *Geobacillus stearothermophilus* ist für die Aufnahme von polaren Aminosäuren verantwortlich und gehört zur PAAT (*polar amino acid transporters*)-Unterfamilie der Aminosäuren-importierenden ABC-Transportsysteme (Fleischer *et al.*, 2005). Viele Transportsysteme der PAAT-Unterfamilie sind funktionell und strukturell noch wenig charakterisiert.

1.4.1 Der thermophile Organismus *G. stearothermophilus*

G. stearothermophilus ist ein gram-positiver, thermophiler Organismus, der erstmals aus den heißen Quellen im Yellowstone National Park (USA) isoliert wurde (Stenesh *et al.*, 1968). Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 55-60 °C, Wachstum ist jedoch bis zu 75 °C möglich (Buswell & Twomey, 1975). Eine charakteristische Eigenschaft von *G. stearothermophilus* ist die Zusammensetzung seiner Lipidmembran, in der neben den für *Bacillus* und *Geobacillus*-Arten typischen Phospholipiden ein hoher Anteil eines seltenen Glykocardiolipins enthalten ist, das sonst nur in Lipidmembranen kokkoider Organismen zu finden ist (Card, 1973; Jurado *et al.*, 1991). Es wird angenommen, dass diese spezielle Lipidzusammensetzung die destabilisierenden Effekte der im Lebensraum des Organismus herrschenden hohen Temperaturen auf die Membranen ausgleichen können (Schäffer *et al.*, 2002b). Der Zellmembran ist eine als *surface layer* bezeichnete Schicht aufgelagert, die aus Glykoproteinen aufgebaut ist (Schäffer *et al.*, 2002a).

1.4.2 Der ABC-Importer ArtMP-J

Das Importsystem ArtMP-J besteht aus zwei homodimeren integralen Membranproteinen ArtM, zwei NBDs ArtP, die ebenfalls ein Homodimer bilden, und dem extrazellulären Substrat-Bindeprotein ArtJ. Dieses Bindeprotein besitzt eine Substratspezifität gegenüber L-Arginin, bindet aber auch mit geringerer Affinität L-Lysin und L-Histidin (Fleischer *et al.*, 2005). In Abbildung 9 ist der Transportkomplex ArtMP-J schematisch dargestellt. Der ABC-Transporter ArtMP besitzt eine Gesamtgröße von 116 kDa, die sich aus zwei 25 kDa ArtM- und zwei 28 kDa ArtP-Untereinheiten zusammensetzt. Das zugehörige Substrat-Bindeprotein ArtJ weist eine Größe von 30 kDa auf.

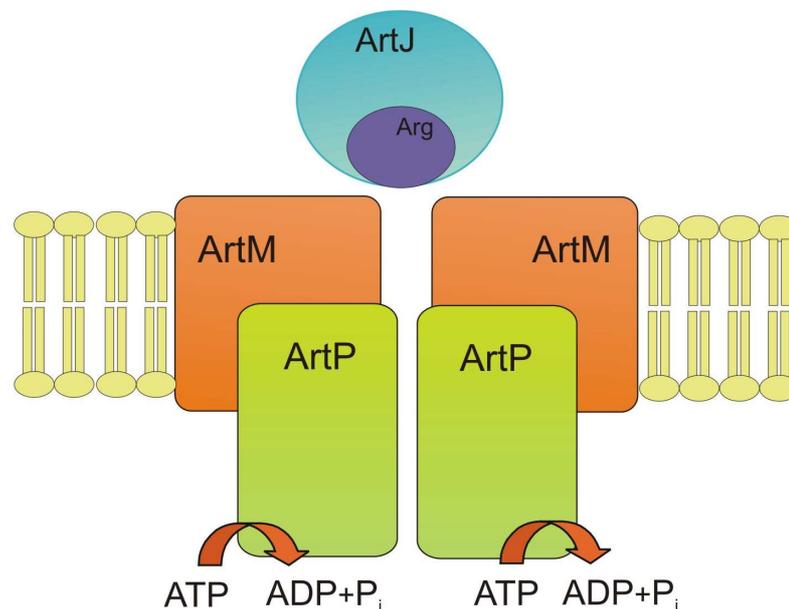


Abbildung 9 Modell des ABC-Importsystems ArtMP-J aus dem thermophilen Organismus *G. stearotherophilus* eingebettet in Lipidmembranen. Das Transportsystem besteht aus homodimeren integralen Membranproteinen ArtM (orange), den ebenfalls homodimeren NBDs ArtP (grün) und dem extrazellulären Substrat-Bindeprotein ArtJ (blau), dargestellt mit gebundenen Arginin als Substrat (violett).

Die Herkunft des ABC-Transporters ArtMP-J aus einem thermophilen Mikroorganismus verspricht eine erhöhte Stabilität der Proteine. Als Schutz vor negativen Einflüssen, die in den entsprechenden Lebensräumen vorherrschen wie die hohen Temperaturen, sind die Proteine Thermophiler häufig stabiler als die mesophiler Organismen (Das *et al.*, 2000).

1.5 NMR-Spektroskopie in der Strukturbiologie

Die Kernresonanzspektroskopie (im Weiteren mit NMR von *nuclear magnetic resonance* = Kernmagnetische Resonanz bezeichnet) und die Röntgenstrukturanalyse sind die derzeit meist verwendeten Methoden zur Strukturuntersuchung von Proteinen mit atomarer Auflösung. Für die strukturbiologischen Studien an dem ABC-Transportsystem ArtMP-J wurde in dieser Arbeit die NMR-Technik verwendet. Es gibt eine große Menge an Literatur zu diesem Thema, von denen folgende beispielhaft genannt sind: Abragam (1961), Wüthrich (1986), Cavanagh *et al.*, (1996) und Lewitt, (2001).

Das grundlegende Phänomen der Kernspinresonanz beruht darauf, dass die Energieniveaus des Kernspins im homogenen Magnetfeld in mehrere Zustände aufspalten und durch Einstrahlen von Radiowellen ein Übergang zwischen ihnen induziert werden kann. (Bloch *et al.*, 1946; Purcell *et al.*, 1946). Besonders in den letzten Jahren hat die NMR-Spektroskopie auf dem Gebiet der Strukturaufklärung von Proteinen mit atomarer Auflösung an Bedeutung gewonnen. Die NMR-Methode bietet gegenüber der Röntgenstrukturanalyse den Vorteil, dass für die strukturellen Untersuchungen keine perfekten dreidimensionalen Proteinkristalle notwendig sind. Die Qualität der Kristalle bestimmt entscheidend die Auflösung der Kristallstruktur. Es lassen sich jedoch nicht alle Proteine problemlos und in ausreichender Qualität kristallisieren. Besonders im Bereich der Membranproteine ist die Erzeugung von dreidimensionalen Proteinkristallen noch immer eine Herausforderung, worin auch die geringe Zahl der bekannten Strukturen vollständiger ABC-Transporter begründet ist. Die NMR-Spektroskopie ermöglicht sowohl die Betrachtung der Struktur als auch der intramolekularen Dynamiken von Proteinen unter weitgehend physiologischen Bedingungen. Die natürliche Umgebung der Proteine wird nachgeahmt, indem lösliche Proteine in wässriger Lösung und hydrophobe Membranproteine rekonstituiert in Lipidmembranen vorliegen. Eine Grundvoraussetzung für strukturelle Untersuchungen von Proteinen mittels der NMR-Technik ist eine Zuordnung der NMR-Signale zu den entsprechenden Atomen der Polypeptidkette. Besonders für die Untersuchung großer Proteine oder Proteinkomplexe wie ABC-Transporter mittels NMR werden spezielle Strategien zur Markierung der Proteinproben, wie die selektive und gezielte Isotopen-Markierung einzelner Aminosäuren, verwendet.

1.5.1 Lösungs-NMR-Spektroskopie

Bisher wurde die Mehrzahl der NMR-spektroskopischen Untersuchungen an gelösten Proteinen durchgeführt. Heute können Strukturen von Proteinen bis zu einer Größe von 30 kDa vollständig und bis zu einer Größe von 60 kDa teilweise bestimmt werden. Neuere Entwicklungen machen strukturelle Untersuchungen von größeren Proteinen und sogar von Membranproteinen in Detergenzlösung möglich.

Die NMR-Technik ermöglicht neben der Proteinstrukturbestimmung auch die Beobachtung von Konformationsänderungen im Protein aufgrund von Protein-Substrat- und Protein-Protein-Wechselwirkungen. Diese konformationellen Veränderungen sind anhand der Verschiebung von Kreuzsignalen im NMR-Spektrum, deren Position konformationsabhängig ist, zu erkennen und zuzuordnen. Beispielsweise werden im Rahmen von Bindungsstudien interagierende Regionen von Ligand und Protein identifiziert, wodurch ein besseres Verständnis der biologischen Aktivitäten von Proteinen erreicht wird, das besonders in der Wirkstoffsuche der pharmakologischen Forschung von Bedeutung ist.

1.5.2 Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie an ABC-Transportern

Die Festkörper-NMR-Spektroskopie wird zunehmend zur strukturellen Untersuchung von membrangebundenen Peptiden verwendet und besitzt das Potential zur Erforschung von größeren integralen Membranproteinen (Basting *et al.*, 2006). Die MAS-NMR (nach engl. *magic-angle-spinning*) stellt eine der NMR-spektroskopischen Techniken für Festkörper-Studien dar, bei der durch eine schnelle Rotation der Probe um den „magischen“ Winkel von $54,7^\circ$ die Anisotropie der Wechselwirkungen vermindert und so die Signalauflösung in den NMR-Spektren erhöht wird (Engelhardt & Michel, 1987; Canet, 1991; Diehl *et al.*, 1994).

Die ersten allein auf MAS-NMR-Daten basierenden Proteinstrukturen waren die kleiner unlöslicher Peptide (Jaronec *et al.*, 2004; Rienstra *et al.*, 2002). Es folgten Studien an mikrokristallinen Proteinen (Castellani *et al.*, 2002; Seidel *et al.*, 2005; Zech *et al.*, 2005) und zunehmend werden auch große Membranproteine mit der MAS-NMR-Technik untersucht. Dabei sind Präparationsformen wie 2D-Kristalle (Hiller *et al.*, 2005), 3D-Kristalle (Lorch *et al.* 2005a) und Proteoliposomen (Mason *et al.* 2004) verwendet worden. Es gibt bisher keine allgemeingültige Methode zur Präparation von integralen Membranproteinen für die Untersuchung mit MAS-NMR, so dass sie auf jedes Membranprotein individuell angepasst werden muss.

ABC-Transporter werden erst seit wenigen Jahren mit der MAS-NMR-Methode auf ihre strukturellen Eigenschaften hin untersucht (Überblick siehe: Basting *et al.*, 2006). Die ersten NMR-Studien wurden an sekundären Transportsystemen durchgeführt und beschäftigten sich mit der Interaktion von Substrat und Protein, bei der Liganden Isotopen-markiert und die Transportsysteme unmarkiert waren (Spooner *et al.*, 1993; Spooner *et al.*, 1998; Patching *et al.*, 2004a). Es gibt bisher aufgrund ihrer Größe und ihrer Eigenschaft als integrale Membranproteine nur sehr wenige Daten zu ABC-Transportern, die mit Hilfe der MAS-NMR-Spektroskopie ermittelt wurden (Mason *et al.*, 2004; Basting *et al.*, 2006). Die Anforderungen der MAS-NMR-Spektroskopie an die zu untersuchende Probe sind hoch. So werden für die NMR-Messungen ca. 10 mg Protein benötigt, markiert mit magnetisch aktiven Kernen wie ^{13}C und ^{15}N und homogen geordnet wie beispielsweise in zwei- oder dreidimensionalen Kristallen.

1.5.3 Selektives Markieren einzelner Aminosäuren

In der Strukturbiologie und Biochemie sind vorwiegend die Kerne ^1H , ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P von Interesse. Diese besitzen einen halbzahligen Spin und liefern hochaufgelöste Signale im Lösungs-NMR-Spektrum. Aufgrund der starken ^1H - ^1H dipolaren Kopplung und der quadropolaren Natur von ^{15}N werden die meisten Festkörper-NMR-Experimente an den Kernen ^{13}C und ^{15}N durchgeführt, da diese einen relativ großen Bereich der chemischen Verschiebung sowie geringe dipolare Kopplungen aufweisen. Proteine von einer Größe von bis zu 10 kDa werden häufig vollständig mit ^{13}C - und ^{15}N -Isotopen angereichert. Eine uniforme ^{13}C -Markierung von Proteinen wird durch deren rekombinante Expression in *E. coli*-Zellen erreicht. Das dazu verwendete Medium enthält als einzige Kohlenstoffquelle vollmarkierte ^{13}C -Glukose oder ^{13}C -Glycerol (Lian & Middleton, 2001b; Goto & Kay, 2000; Hong & Jakes, 1999; Lehninger *et al.*, 1998). Zur ^{15}N -Markierung wird dem Medium $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ zugegeben, das den Zellen als einzige Stickstoffquelle dient (Castellani *et al.*, 2002).

Bei großen Proteinkomplexen wie ABC-Transporter führt ein vollständiges Markieren mit ^{13}C - und ^{15}N -Isotopen zu einer starken Signalüberlagerung im NMR-Spektrum. Zur Verringerung der Signalsätze und zur Vereinfachung der Spektren können einzelne Aminosäurereste des zu untersuchenden Proteins selektiv markiert werden, wie erstmals von Mason *et al.* (2004) erfolgreich an dem *multidrug*-ABC-Exporter LmrA aus *L. lactis* gezeigt wurde. Zur Synthese der selektiv markierten

Proteine werden den Mikroorganismen Isotopen-markierte Aminosäuren zur Verfügung zu gestellt (Mason *et al.*, 2004; Basting *et al.*, 2006).

1.6 Motivation und Zielsetzung

ABC-Transporter erkennen eine außerordentlich große Zahl an strukturell verschiedenen Substraten und sind an vielen physiologischen Prozessen beteiligt. Einige eukaryotischen Vertreter sind von medizinischer Relevanz, da deren Mutationen Erbkrankheiten zur Folge haben und in Resistenzen gegenüber Antibiotika und Chemotherapeutika involviert sind. Noch ist der Kopplungsmechanismus zwischen der ATP-Bindung/-Hydrolyse und der Substrattranslokation nicht im Detail aufgeklärt. Die bekannten Kristallstrukturen zeigen die ABC-Transportkomplexe lediglich in einer Momentaufnahme während des Transportvorgangs. Für ein molekulares Verständnis des Translokationsprozesses und der damit verbundenen Mechanismen sind Strukturen von unterschiedlichen Konformationszuständen *eines* ABC-Transportkomplexes notwendig, am besten in seiner natürlichen Lipidumgebung.

Das Ziel dieser Dissertation besteht darin, mit der Etablierung eines Modellsystems der ABC-Transporter-Familie für die NMR-Spektroskopie die Grundlage für weiterführende strukturelle Studien zu schaffen, die zur Aufklärung des komplexen Translokationsvorgangs dieser Systeme beitragen. Als methodische Plattform dient das Arginin-Importsystem ArtMP-J des thermophilen Organismus *G. stearothermophilus*, bestehend aus dem ABC-Transportkomplex ArtMP und dem zugehörigen Substrat-Bindeprotein ArtJ. Die besondere Eignung von ArtMP-J als Modellsystem begründet sich auf der relativ geringen Größe der Untereinheiten des Komplexes und dem symmetrischen Aufbau von ArtMP. Zudem wird aufgrund der Herkunft des Transporters aus dem thermophilen Organismus *G. stearothermophilus* erwartet, dass der Proteinkomplex relativ stabil ist.

Im Zentrum dieser Arbeit steht, die Präparation des ABC-Transportsystems und seiner Komponenten für die NMR-Spektroskopie zu optimieren, die Proteine mit Isotopen zu markieren und erste NMR-spektroskopische Untersuchungen durchzuführen. Der ABC-Transporter ArtMP und das isolierte ArtP sollen dabei jeweils im Nukleotid-gebundenen und -ungebundenen Zustand vorliegen, um über erste Festkörper-MAS-NMR-Messungen einen Einblick in die konformationellen Auswirkungen der Nukleotid-Bindung zu erhalten. Die parallele Untersuchung des

Substrat-Bindeproteins ArtJ mit der Lösungs-NMR soll Erkenntnisse zu den Wechselwirkungen des Proteins mit dem Transportkomplex, mit seinem Liganden und auch über den Einfluss der Nukleotid-Bindung an ArtMP ergeben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Materialien

Die Chemikalien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Glycon Biochemicals GmbH (Luckenwalde), Sigma-Aldrich (München) und VWR International (Darmstadt) in der höchst möglichen Reinheit bezogen. Als Mediumzusatz wurde Sojamehlpepton der Firma Oxoid Ltd. (Basingstoke, Hampshire, England) verwendet. Das TALON-Material für die Metall-Affinitätschromatographie stammte von BD Biosciences Clontech, (Palo Alto, USA) und das Säulenmaterial der Gelfiltration Superdex 75 von Amersham Biosciences (Little Chalfont, GB). Die uniform ^{13}C -, ^{15}N -markierten Aminosäuren Prolin, Tyrosin und Threonin wurden von Cambridge Isotopes und Spectra Stable Isotopes (Columbia, USA) bezogen. *Hampton Research* (Laguna Niguel, USA) lieferte Kristallisationszubehör. Restriktionsenzyme, Chemikalien und Enzyme für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR sowie Restriktionsenzyme stammen von den Firmen Invitrogen (Eggenstein), Novagen, Merck (Darmstadt) und New England Biolabs (Schwalbach). Für die DNA-Fragmentisolierung aus Agarose-Gelen wurde das *Montagé DNA Gel Extraction Kit* der Firma Millipore (Bedford, USA) genutzt.

2.1.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ (Berlin-Buch) synthetisiert und sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 **Verwendete Oligonukleotide für PCR und Klonierung**

Bezeichnung	Sequenz
artP-N forward	5'- GAC-GAC-GAC-AAG-ATG-ATC-GAC-GTA-CAC-CAG-TTG-AAA-AAA-TCG -3'
artP-N reverse	5'- GAG-GAG-AAG-CCC-GGT-CTA-AAA-TAC-TTT-TGA-CAA-AAA-CGC -3'
artP-C reverse	5'- GAG-GAG-AAG-CCC-GGT-CTA-GTG-ATG-GTG-ATG-GTG-ATG-AAA-TAC-TTT-TGA-CAA-AAA-CGC -3'
artM-N forward	5'- GAC-GAC-GAC-AAG-ATG-GAT-TTT-CGT-TTT-GAT-ATT-ATT-GTC -3'
artM-N reverse	5'- GAG-GAG-AAG-CCC-GGT-CTA-TTG-GGT-TGA-ATA-CTT-CCT-TTC -3'
artM-C reverse	5'- GAG-GAG-AAG-CCC-GGT-CTA-GTG-ATG-GTG-ATG-GTG-ATG-AGA-ACC-TTG-GGT-TGA-ATA-CTT-CCT-TTC -3'

Fett hervorgehoben sind die Überhänge für die Ligations-unabhängige Klonierung.

2.1.3 Verwendete Vektoren und Plasmide

Die für diese Arbeit verwendeten Expressionsvektoren sind in Tabelle 2, die Plasmide in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 2 Expressionsvektoren

Plasmid	Genotyp/Beschreibung	Referenz
pQE60	Klonierungsvektor, 6x His-Tag, T5-Promotor, Carb ^r	QIAGEN
pET46 Ek/LIC	Klonierungsvektor, N-terminaler 6x His-Tag, T7-Promotor, Carb ^r	Novagen
pET30 Ek/LIC	Klonierungsvektor, N-&C-terminaler 6x His-Tag, T7-Promotor, Kan ^r	Novagen
pBAD/HisA	Klonierungsvektor, <i>ParaBAD</i> , <i>araC</i> , N-terminaler 6x His-Tag, T5-Promotor, Carb ^r	Promega

Tabelle 3 Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp/Beschreibung	Referenz
pRF2	<i>artMP</i> aus <i>G. stearothermophilus</i> auf pQE60	Fleischer <i>et al.</i> , 2005
pVL4-P1	<i>artP</i> auf pET46 Ek/LIC	diese Arbeit
pVL4-P2	<i>artP</i> auf pET30 Ek/LIC	diese Arbeit
pVL5-M1	<i>artM</i> auf pET46 Ek/LIC	diese Arbeit
pVL5-M2	<i>artM</i> auf pET30 Ek/LIC	diese Arbeit
pSS1	<i>artJ</i> auf pET15	AG E. Schneider, HU-Berlin

2.1.4 Verwendete Detergenzien

In der Tabelle 4 sind die Detergenzien aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 4 Auflistung genutzter Detergenzien und ihre Eigenschaften.

Abkürzung	Detergenzien	MW (Da)	CMC (mM)	Ionische Eigenschaft
OG	<i>n</i> -Octyl- β -D-glucopyranosid	292	18-23	nicht-ionisch
DS	<i>n</i> -Decanoyl-sucrose	496	2,5	nicht-ionisch
DM	<i>n</i> -Decyl- β -D-maltosid	483	1,8	nicht-ionisch
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid	510	0,17	nicht-ionisch
UDM	<i>n</i> -Undecyl- β -D-maltopyranosid	496	0,59	nicht-ionisch
DTM	<i>n</i> -Decyl- β -thio-maltopyranosid	499	0,9	nicht-ionisch

NG	<i>n</i> -Nonyl-β-D-glucopyranosid	306	6,5	nicht-ionisch
OTG	<i>n</i> -Octyl-β,D-thioglucopyranosid	308	9	nicht-ionisch
FC-10	<i>n</i> - Decylphosphocholin	323	11	Zwitter-ionisch
FC-12	<i>n</i> - Dodecylphosphocholin	351	1,5	Zwitter-ionisch
LDAO	Lauryldimethylamin oxid	229	1-2	Zwitter-ionisch
SLS	<i>Sodium lauryl sulphate</i>	293	8,3	anionisch
SDS	Natrium-Dodecylsulfat	289	8,1	anionisch

2.2 *Escherichia coli* (*E. coli*)-Zellkultur

2.2.1 Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

In der Tabelle 5 sind die *E. coli*-Stämme mit ihren jeweiligen genetischen Charakteristika aufgeführt, die für diese Arbeit genutzt wurden.

Tabelle 5 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F ⁻ φ80 <i>lac</i> 15 Δ(<i>lacZY A-argF</i>) U169 <i>recA1</i> <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻ thi⁻¹</i> <i>gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
JM109	<i>e14'(mcrA⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 relA1 Δ(lac-proAB)</i> [F ⁺ <i>traD36 proAB lacI^q lacZΔM15</i>]	Yanish-Peron <i>et al.</i> , 1985; Stratagene
BL21(DE3)	F ⁻ <i>lon ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal λ(DE3)</i>	Studier & Moffat, 1986 ; Novagen
Rosetta(DE3)	F ⁻ <i>lon ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal (dcm) λ(DE3)</i> pRARE(Cm ^R)	Novagen
Rosetta(DE3)pLysS	F ⁻ <i>lon ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal (dcm) λ(DE3)</i> pRARE(Cm ^R) pLysS(Cm ^R)	Novagen
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 13240	Wildtyp	DSMZ; Nazina <i>et al.</i> , 2001

2.2.2 Verwendete Medien

LB-Medium bestand aus 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl und wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellt (Miller, 1992). LB-Platten enthielten zusätzlich 1,5 % Agar-Agar. Das Minimalmedium M9 enthielt auf 1 Liter: 10 ml Spurenelementlösung (500 ml: 2,5 mg EDTA, 0,25 g FeSO₄, 25 mg ZnCl₂, 5 mg CuSO₄, pH 7,5-7,7), 100 ml 10 x M9-Salz (80 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 20 g K₂HPO₄, 5 g NaCl), 1 ml MgSO₄ (1 M), 0,3 ml CaCl₂ (1 M), 1,5 ml Thiamin-HCl (1mg/ml), 15 ml Biotin (0,1 mg/ml), 10 ml Glukose (40 %), 0,5 g NH₄Cl, ad 1 Liter H₂O. Zur Herstellung des markierten ArtMP-Proteinkomplexes und des ArtP-Proteins wurde dem Medium 200 mg/l ¹³C,- ¹⁵N-markiertes Prolin, Tyrosin und Threonin hinzugefügt. Für die Markierung des Bindeproteins ArtJ mit ¹⁵N oder ¹³C,- ¹⁵N wurden 2 g ¹⁵NH₄Cl und 2 g ¹³C₆-Glukose zugesetzt. Allen Medien wurden zur Plasmidselektion Antibiotika entsprechend den Resistenzen der verwendeten Plasmide in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt: Carbenicillin - 60 µg/ml, Chloramphenicol -20 µg/ml und Kanamycin - 50 µg/ml.

2.2.3 Anzuchtbedingungen

Vorkulturen wurden von bei 4 °C gelagerten Stammplatten angeimpft, die von einer frischen Transformation oder von Dauerkulturen stammten. Das jeweilige Medium wurde mit einer frischen Übernachtskultur 1:100 beimpft. Die Zellen wuchsen, wenn nicht anders angegeben, schüttelnd bei 37 °C. Das Wachstum wurde durch die Messung der Optischen Dichte (OD) an einem Spektralphotometer (Utrospec 2000, Pharmacia) bei 650 nm verfolgt.

2.2.4 Expressionsuntersuchungen

Für die Überexpression von Genen wurden die Zellen in LB- und M9-Medium bei verschiedenen Temperaturen unter Schütteln bei 180 rpm (Modell G25, *New Brunswick Scientific*, Nürtingen) kultiviert und bei Erreichen einer OD_{650nm} von 0,3 - 0,4 mit 0,5 - 1 mM IPTG induziert. Das Ernten der Zellen durch Zentrifugation erfolgte 2 - 6 Stunden nach dem Induktionszeitpunkt. Die Auswertung der Proteinexpression erfolgte über SDS-PAGE.

Für einen schnellen Überblick über die Expression eines bestimmten Gens wurde eine über Nacht gezogene Kultur verwendet. Deren OD wurde bestimmt, 1 ml abgenommen und 1 min bei 14.000 rpm pelletiert. Pro 1 OD wurden die Zellen in 68 µl 1 x Loading Buffer (2.8.1) resuspendiert, 5 min bei 100 °C inkubiert und davon 15 µl auf ein SDS-PAGE aufgetragen. Auf diese Art konnte der Anteil des exprimierten Proteins in den ganzen Zellen bestimmt und der Expressionstest ausgewertet werden.

2.3 *Geobacillus stearothermophilus*-Zellkultur

2.3.1 Medium und Anzuchtbedingungen

Das Vollmedium zur Anzucht von *G. stearothermophilus* setzte sich aus 1,5 % Pepton, gewonnen aus Casein, 0,5 % Sojamehlpepton und 0,5 % NaCl zusammen. Der pH-Wert des Mediums wurde mit 1 N NaOH auf 7,3 eingestellt. Die Zellen wurden für 6 Stunden bei 55 °C angezogen.

2.3.2 Lipidextraktion

Lipide aus *G. stearothermophilus* wurden für Rekonstitutionsexperimente und 2D-Kristallisationen nach der Methode von Folch *et al.* (1957) extrahiert. Getrocknete Lipide wurden in einer Konzentration von 20 mg/ml in Chloroform aufgenommen und unter Stickstoff bei - 80°C gelagert. Es wurden pro g Zellen (Nassgewicht) ca. 30 mg Lipide isoliert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Plasmidpräparation

Zur Präparation kleiner Mengen von Plasmid-DNA wurde das *NucleoSpin Plasmid Quick Pure* (Macherey-Nagel, Düren)-Set verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA erfolgte mit dem *ConcertTM Rapid Midi Prep System* (Invitrogen).

Zur schnellen Unterscheidung von Plasmidgrößen wurde eine Versuchsreihe nach der Methode von Riggs & MacLachan (1986) durchgeführt. Dazu wurden 1,5 ml Übernachtskultur pelletiert und dieses Pellet anschließend in 200 µl Lysepuffer (0,9 mg/ml Lysozym; 8 % Sucrose; 0,5 % Triton-X; 50 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl, pH 8) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 40 s – 120 s bei 100 °C wurden die Ansätze zentrifugiert und jeweils 10 µl des Überstandes auf ein Agarosegel aufgetragen.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm gemessen und die Konzentration nach der Formel $C_{\text{DNA}}[\text{mg/ml}] = (\text{OD}_{260\text{nm}} \times 0,063) - (\text{OD}_{280\text{nm}} \times 0,036)$ (Harwood & Cutting, 1990) berechnet.

2.4.2 Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von geschnittener und ungeschnittener Plasmid-DNA wurde die Agarose-Gelelektrophorese nach Sambrook *et al.* (1989) genutzt. Hierzu wurden die DNA-Proben 1:10 mit 10 x-Probenpuffer [50 % Glycerin; 1 % SDS; 0,1 M EDTA; 0,1 % Bromphenolblau; gelöst in 40 mM Tris/HCl; 8,5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8 eingestellt (TAE-Puffer)] versetzt und in 1%

bzw. 1,5 % Agarose-Gelen in 1 x TAE -Puffer bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt. Zur Auswertung und zum Größenvergleich der DNA-Fragmente wurde ein Marker mit definierten DNA-Fragmentgrößen mitgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (4 µg/ml H₂O) angefärbt und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Elution von DNA aus präparativen Gelen erfolgte mit dem *Montagé DNA Gel Extraction Kit* (Millipore, Bedford, USA) nach Angaben des Herstellers.

2.4.3 Modifikation von DNA

Die Standard-DNA-Techniken wie Restriktionen und Ligationen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) and Ausubel *et al.* (1992) ausgeführt. Die *in vitro*-Veränderungen der DNA zur Ligations-unabhängigen Klonierung (Novagen) erfolgten nach Angaben des Herstellers.

2.4.4 Fällung von DNA

Zur Fällung wurde der DNA 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) zugegeben, gemischt und mit dem dreifachen Volumen an eiskaltem 96 % Ethanol 2 Stunden bei -80 °C gefällt. Anschließend wurde die gefällte DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen, und in 10 - 30 µl Tris-EDTA, pH 8,0 (TE)-Puffer resuspendiert.

2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden im Gerät *Mastercycler epgradientS* (Eppendorf) in 200 µl Reaktionsgefäßen amplifiziert. Für die Subklonierung der Gene *artM* und *artP* diente das Plasmid pRF2 als Template. Als Enzym wurde die thermostabile KOD Polymerase (Novagen) genutzt. Ein PCR-Ansatz für die ligationsunabhängigen Klonierung setzte sich wie folgt zusammen:

<u>PCR-Ansatz</u>	<u>Reaktionsprofil</u>
2,0 µl 10 x Polymerase-Puffer	5 min 94°C
0,5 µl Template	3 Zyklen
1,0 µl Primer 1 (= 10 µM)	30 s Denaturierung 94°C
1,0 µl Primer 2 (= 10 µM)	30 s Primerannealing 54°C
2,0 µl dNTP-Mix (= 2 mM)	2 min Elongation 72°C
0,8 µl MgSO ₄ (= 25 mM)	30 Zyklen
0,8 µl KOD Polymerase (= 1 U/µl)	30 s Deanturierung 94°C
- auf 20 µl Endvolumen mit ddH ₂ O auffüllen.	30 s Primerannealing 60°C
	2 min Elongation 72°C
	7 min Nachsynthese 71°C
	Lagerung 4°C

2.4.6 Subklonierung von *artP* und *artM*

Das Plasmid pRF2 (Fleischer *et al.*, 2005) diente als Ausgangspunkt einer Subklonierung von *artM* und *artP*. Die Klonierung erfolgte nach der *ligation-independent-cloning* (LIC)-Methode der Firma Novagen nach Angaben des Herstellers. Die Genkonstrukte von *artP* und *artM* wurden jeweils in die Ek/LIC Vektoren pET46 und pET30 kloniert, die dem eingefügten Genfragment jeweils sechs Histidin-Codons vor- bzw. nachschaltet. Damit wurde ein Protein ausgebildet, das mit einem N-terminalen bzw. C-terminalen His-Tag versehen ist, wodurch eine Reinigung über Metall-Affinitätschromatographie ermöglicht wird.

2.4.7 Transformation

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurde mit der CaCl₂-Methode nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Hierzu wurden 2,5 ml LB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur angeimpft (1:100) und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Das Wachstum wurde bis zu einer OD von ~ 0,5 verfolgt. Danach wurden die Zellen pelletiert (3.000 x g, 10 min, 4 °C) und das Pellet in 100 mM CaCl₂ in 1/10 des Ausgangsvolumens resuspendiert. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend 100 µl der kompetenten Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA gemischt und für eine weitere Stunde auf Eis belassen. Darauf folgte die Hitzeschockbehandlung. Der Ansatz wurde 1 Minute bei 42 °C inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis gestellt, mit 800 µl LB-Medium versetzt und für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Dieser Ansatz wurde 1 Minute bei 3.000 x g zentrifugiert, das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer LB-Selektionsplatte ausplattiert.

2.5 Expression rekombinanter Proteine

2.5.1 Expression von unmarkiertem Protein

Die Anzucht von Zellen zur Herstellung von unmarkierten Proteinen fand in LB-Medium statt, das das jeweils nötige Antibiotikum enthielt. Für die Synthese des Proteinkomplexes ArtMP wurden der *E. coli*-Stamm JM109(pRF2) verwendet (Fleischer *et al.*, 2005). *ArtP* wurde von pVL4-P1 in Zellen des Stammes Rosetta(DE3) und das Substrat-Bindeprotein ArtJ in Rosetta(DE3)(pLysS)(pSS1) exprimiert. Kulturen wurden schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD_{650nm} von ~ 0,3 wurde die Genexpression mit 0,5 mM bzw. 1 mM IPTG induziert und das Wachstum der Kulturen kontrolliert. Die stationäre Phase trat nach ca. 2 stündigem Wachstum bei einer OD_{650nm} von 2- 2,5 ein. Die Ernte der Zellen erfolgte 4 Stunden nach der Induktion durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 5000 x g und 4 °C. Die Zellpellets wurden entweder nach Schockgefrieren bei -80 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

2.5.2 Expression von ^{15}N - oder ^{13}C -, ^{15}N -markiertem Protein

Zur Herstellung markierter Proben wurde zunächst eine LB-Vorkultur über Nacht herangezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 4 l LB-Medium mit einer $\text{OD}_{650\text{nm}}$ von 0,1 angeimpft und schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Bei einer $\text{OD}_{650\text{nm}}$ von 0,5 wurden die Zellen bei 20 °C und 3000 x g geerntet. Nach sorgfältigem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen mit 0,15 M NaCl gewaschen, zentrifugiert und in 2 Liter modifiziertem M9-Medium resuspendiert, das die Isotopen-markierten Aminosäuren enthielt (siehe 3.2.3). Für die Herstellung von ^{13}C -, ^{15}N -markiertem ArtJ hingegen wurde dem M9-Medium ^{13}C -markierte Glukose als Kohlenstoff- und $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als Stickstoffquelle hinzugefügt. Zur Präparation von ^{15}N -markiertem ArtJ wurde nur das $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ verwendet. Nach der Überführung der Zellen in M9-Medium wurde nach 30 Minuten die Genexpression mit der Zugabe von 0,5 mM bzw. 1 mM IPTG induziert und die Zellen nach weiteren 4 Stunden geerntet. Die Zellen wurden entweder nach Schockgefrieren gelagert oder sofort verwendet.

2.5.3 Expression von selektiv markiertem ArtMP und ArtP

Zur Herstellung von selektiv markierten Proteinen werden den Mikroorganismen mit Isotopen-markierte Aminosäuren zur Verfügung gestellt (Mason *et al.*, 2004). Zur Vermeidung von möglichen Kreuzmarkierungen, die durch Verstoffwechslung der Isotopen-markierten Aminosäuren entstehen und so eine Verringerung der Markierung der ausgesuchten Aminosäuren zur Folge hätte, werden dem Expressionsmedium alle 20 Aminosäuren (200 mg/l) zugefügt, sowohl die unmarkierten als auch die markierten. So werden die Biosynthesewege der Zellen gehemmt und die zugesetzten Aminosäuren, markiert und unmarkiert, für die Proteinsynthese genutzt. Die weitere Expression verläuft wie unter 2.5.2 beschrieben.

2.6 Reinigung rekombinanter Proteine

2.6.1 Zellaufschluss

Der Aufschluss von *E. coli*-Zellen wurde in Anlehnung an die von Hobson *et al.* (1984) beschriebene Methode vorgenommen. Die Zellen wurden 15 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert, mit 150 mM NaCl-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in Puffer A (50 mM MOPS/K⁺, pH 7; 0,1 M NaCl; Protease-Inhibitor) zu 10 ml/g Nassgewicht der Zellpellets resuspendiert und anschließend homogenisiert. Den Ansätzen wurde Benzonase (Novagen) zugefügt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch die *French press* (Amicon French Press, 14.000 psi). Durch eine anschließende Zentrifugation für 15 min bei 6.500 x g wurden die unlöslichen Bestandteile pelletiert. Der Überstand wurde entweder direkt für die weitere Proteinpräparation verwendet oder in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.6.2 Reinigung von ArtMP aus der Cytoplasmamembran

Die Reinigung des Komplexes ArtMP erfolgte nach einem modifizierten Protokoll aus der Diplomarbeit von R. Fleischer (Humboldt-Universität Berlin; 2003).

Präparation von Cytoplasmamembranen

Zur Präparation der Cytoplasmamembran wurde der Überstand des Zellaufschlusses durch Ultrazentrifugation (1 Stunde, 200.000 x g, 4 °C) in Cytoplasmamembran- und Cytosolfraction aufgetrennt. Die pelletierten Membranen wurden in einem 1/8 des Ausgangsvolumens in Puffer A (2.6.1) resuspendiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden direkt zur Präparation von ArtMP genutzt oder in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Solubilisierung von ArtMP aus der Cytoplasmamembran

Die Membranfraktionen wurden zentrifugiert (30 min, 4 °C, 200.000 x g) und in der Hälfte des Ausgangsvolumens mit Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH 8; 5 % Glycerol, Protease-Inhibitor) gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend wieder in diesem Puffer resuspendiert. Das Volumen entsprach dabei dem des vorherigen. Zur Solubilisierung wurde 1,2 % *n*-Decanoyl-Sucrose oder 1 % *n*-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM) zugegeben und 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz für 30 min bei 200.000 x g und 4 °C ultrazentrifugiert. Der Überstand, das Solubilisat, wurde unmittelbar für die anschließende Reinigung verwendet.

Reinigung des ABC-Transporters ArtMP

Die Reinigung des Proteinkomplexes aus dem Solubilisat erfolgte über Metall-Affinitätschromatographie mit Hilfe eines am ArtP-Protein fusionierten His-Tags durch Affinitätschromatographie. Als Säulenmatrix diente eine TALON-Matrix (Clontech). Das Solubilisat wurde mit dem Puffer C (50 mM Tris/HCl, pH 8; 0,2 % DS oder 0,4 % DM, 5 % Glycerol) 1:2 verdünnt und mit der äquilibrierten TALON-Matrix versetzt und 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Die Matrix wurde mit 10 Bettvolumen Puffer C und Puffer C + 10 mM Imidazol gewaschen. Anschließend wurde der gebundene Komplex mit 5 Bettvolumen Puffer C + 100 mM Imidazol eluiert. Die Fraktionen, die nach Proteinbestimmung den Komplex enthielten, wurden in einer Amicon-Zelle mit einem YM10-Filter oder mit *Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices* (Ausschlussgröße 10 oder 5 kDa, Millipore, Bedford, USA) ankonzentriert. Das Imidazol wurde entweder mit Hilfe einer über Nacht durchgeführten Dialyse oder durch Gelchromatographie (PD10-Säule, Amersham Pharmacia Biotech.) entfernt.

2.6.3 Reinigung von ArtP aus dem Cytosol

Zur Reinigung des löslichen ArtP aus dem Cytoplasma von JM109(pRF2)- und Rosetta(DE3)(pVL4-P1)-Zellen wurde nach dem Zellaufschluss und einer 30 minütigen Zentrifugation wurde das Cytosol mit einer äquilibrierten TALON-Matrix für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Matrix auf eine Säule gegeben und mit dem 10 Bettvolumen Puffer C sowie mit 10 Bettvolumen Puffer C + 10 mM Imidazol gewaschen. Die Proteine wurden mit 5 Bettvolumen Puffer C mit 100 mM Imidazol eluiert. Die Aufreinigung fand bei Raumtemperatur statt. Die vereinten Eluatfraktionen wurden in einer Amicon-Zelle mit einem YM10-Filter oder mit *Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices* (Ausschlussgröße 10 oder 5 kDa, Millipore, Bedford, USA) konzentriert. Das Imidazol durch Dialyse über Nacht oder mit Gelfiltration entfernt.

2.6.4 Reinigung von ArtJ aus dem Cytosol

Das Substrat-Bindeprotein wurde für ATPase-Aktivitätsbestimmungen, die an dem ABC-Transporter durchgeführt wurden, unmarkiert und für Bindungsstudien mit Lösungs-NMR ^{13}C , ^{15}N -markiert hergestellt. Die Reinigung des löslichen Bindeproteins ArtJ aus dem Cytosol der *E. coli*-Zellen Rosetta(DE3)(pLysS) verlief wie für ArtP beschrieben (2.6.3). Die Reinigung des ^{15}N -markierten ArtJ aus dem Cytosol ist in der Abbildung 10 gezeigt. Da in den Eluatfraktionen neben ArtJ auch noch Verunreinigungen zu erkennen waren, wurde im Anschluss eine Gelfiltration durchgeführt. Aus 1 Liter LB-Medium wurden 60 mg unmarkiertes Protein isoliert. Die Ausbeute an ^{15}N -markiertem Protein betrug ebenfalls 60 mg und für das ^{13}C , ^{15}N markierte ArtJ 45 mg pro 1 Liter Kultur. Die präparierten Proteine wurden umgehend für die NMR- Experimente verwendet.

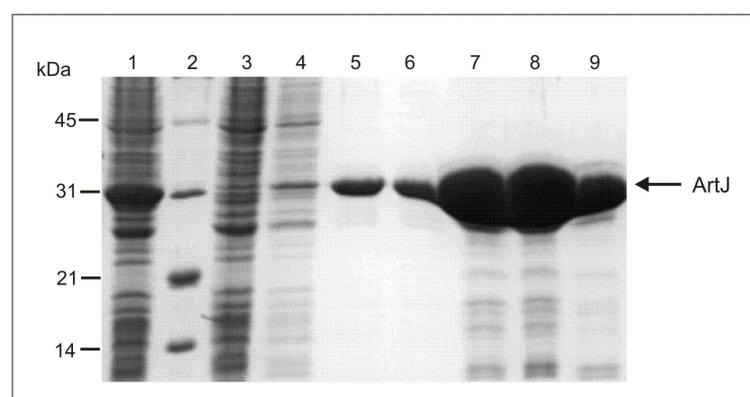


Abbildung 10 Metall-Affinitätschromatographie von ^{15}N -markiertem ArtJ. Spur 1 – Überstand nach Aufschluss der Rosetta(DE3)(pLysS)-Zellen; Spur 2 - Standardproteine; Spur 3 - Durchfluss; Spur 4 - Waschfraktion (50 mM Tris/HCl, pH 8; 5 % Glycerol, 10 mM Imidazol); Spuren 5 – 9 Eluate mit darin enthaltenem ArtJ. Es wurde je 10 μl der jeweiligen Fraktion über ein 15 % SDS-Gel aufgetrennt.

2.7 Quantifizierung von Proteinen

2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde entweder mit Hilfe des *BCA-Kits* (Pierce, Rockford, USA) oder bei gereinigtem Protein durch Messung der Absorption der Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz $A_{280} = c * d * \epsilon$ wurde die unbekannte Proteinkonzentration c [$\text{mol} + \text{l}^{-1}$] berechnet, wobei A die Absorption bei 280 nm, d die Küvettenlänge [cm] und ϵ der molare Extinktionskoeffizient des untersuchten Proteins/Komplexes [$\text{l} * \text{mol} * \text{cm}^{-1}$] ist. Der molare Extinktionskoeffizient wurde auf der Basis der Proteinsequenz mit Hilfe des ProtParam Protokolls www.expasy.ch ermittelt.

2.8 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Identifizierung von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970) verwendet. Es wurde mit 12,5 %- und 15 %-igen Minigelen (Trennlänge ca. 6 cm) gearbeitet. Die Elektrophorese erfolgte in Kammern des Typs *Mighty Small SE250* (Hoefer, San Francisco, USA) bei einer Spannung von 100 V. Die Sammelgele setzten sich aus jeweils 4,9 % Acrylamid und 0,13 % Bisacrylamid bei einem pH-Wert von 6,8 zusammen. Im Trenngel war die Acrylamid-Konzentration entweder 12,5 % oder 15 % und dementsprechend die Bisacrylamid-Konzentration 0,32 % oder 0,37 %. Der pH-Wert im Sammelgel betrug 8,6. Die elektrophoretische Auftrennung fand in Elektrophorese-Puffer (250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 35 mM SDS) statt. Pro Tasche wurden 10 bis 20 μg Protein aufgetragen, das zuvor mit zweifachem Probenpuffer (4 % SDS, 25 % Sammelgelpuffer, 30 % Glycerin, 10 % β -Mercaptoethanol, 0,002 % Bromphenolblau) versetzt wurde. Zur Bestimmung des relativen Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine diente ein bei jedem Gellauf mitgeführter Proteinstandard LMW-Größenstandard (Amersham, Pharmacia Biotech). Die Anfärbung der Proteine erfolgte mit Serva-Blau R nach den bei Walter (1992) beschriebenen Bedingungen.

2.8.2 Blau-Native-Polyacrylamidelektrophorese

Die Methode der Blau-Nativen-Polyacrylamidelektrophorese (PAGE) wurde von Schagger und Jagow (1991) entwickelt. Sie dient zur Auftrennung von Membranproteinkomplexen nach ihrer Ladung ohne deren Konformation zu verändern. Mit dieser Technik können neben der Analyse der Zusammensetzung von Proteinkomplexen auch Protein-Protein-Interaktionen und die Wirkung verschiedener Detergenzien untersucht werden.

Es wurden 5-12 % Polyacrylamid-Gradientengele und 4 % Sammelgele verwendet, die in Gelpuffer ohne SDS angesetzt wurden. Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und bei konstant 80 Volt und Raumtemperatur aufgetrennt. Die untere Reservoirkammer enthielt Anodenpuffer, die obere blauen Kathodenpuffer. Dem blauen Kathodenpuffer wird Coomassie Blau G250 zugefügt, das in die Proben einwandert und an die Proteine bindet. Nach ca. zwei Dritteln der Laufstrecke wurde der Kathodenpuffer durch hellblauen Kathodenpuffer ausgetauscht, um eine Entfärbung des Gellaufs zu erreichen. Zum Nachweis oder Identifikation von Proteinen und Proteinkomplexen wurde das Gel mit Coomassie Blau G250 gefärbt.

Blauer Kathodenpuffer

15 mM BisTris, pH 7,0
 50 mM Tricin
 0,2 % (w/v) Coomassie Blau G250

Hellblauer Kathodenpuffer

15 mM BisTris, pH 7,0
 50 mM Tricin
 0,02 % (w/v) Coomassie Blau G250

Anodenpuffer

50 mM BisTris, pH 7,0

2 x Probenpuffer

40 mM BisTris, pH 7,0
 1 M ε-Aminocaprinsäure
 20 % (v/v) Glycerin
 0,015 % (w/v) Coomassie Blau G250

3 x Gelpuffer

150 mM BisTris, pH 7,0
 200 mM ε-Aminocaprinsäure

2.8.3 Protein-Größenstandards

Als Größenstandards bei der SDS-PAGE (2.9.1) dienen Proteine des *Low Molecular Weight Calibration Kit* (LMW-Größenstandard) von Amersham Pharmacia Biotech. Bei der Blau-Nativen-PAGE (2.9.2) wurden Proteine des *High Molecular Weight Native Marker Kit* (nativer HMW Größenstandard) als Größenstandard eingesetzt.

LMW-Größenstandard		Nativer HMW-Größenstandard	
Molekulargewicht (kDa)	Protein	Molekulargewicht (kDa)	Protein
97	Phosphorylase b	660	Thyreoglobulin
66	Albumin	440	Ferritin
45	Ovalbumin	320	Katalase
30	Carboanhydrase	150	Laktatdehydrogenase
20,1	Trypsininhibitor	66	Albumin
14,4	A-Laktalbumin		

2.8.4 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau

Das Färben von SDS-Polyacrylamidgelen wurde in Anlehnung an Meyer & Lamberts (1965) durchgeführt. Es wurde der Farbstoff Coomassie Blue R250 von Serva (Heidelberg) verwendet. Die Gele wurden für mindestens 15 Minuten in Färbelösung gelegt. Anschließend wurden die Gele bis zum Erreichen des gewünschten Färbegrades entfernt.

<u>Färbelösung</u>	<u>Entfärbelösung</u>
0,2 % (w/v) SERVA Blue R	30 % (v/v) Ethanol
30 % (v/v) Ethanol	10 % (v/v) Essigsäure
10 % (v/v) Essigsäure	

2.9 Spezifischer Nachweis von Proteinen

2.9.1 Immunoblotting

Zum immunologischen Nachweis wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit der *Trans-Blot SD semi-dry* Apparatur (BioRad, München) 25 min bei konstant 20 V bzw. 45 min bei konstant 50 mA pro Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,45 µm) transferiert. Zuvor wurden Gel, Membran und Filterpapier in Blotpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 20 (v/v) Methanol) äquilibriert. Der Transfer wurde anschließend durch Anfärben der Membran mit Ponceau-Rot (0,2 % PonceauS in 3 % TCA) kontrolliert und sowohl der Standard als auch die Laufspuren markiert. Darauf folgte ein mehrmaliges Spülen mit H₂O und mit TNT (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween20). Die unbelegten Protein-Bindestellen wurden durch Zugabe von 10 ml 5 % Magermilch in TNT abgesättigt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Zu dieser Lösung wurde ein gegen den His-Tag der zu untersuchenden Proteins gerichteter Antikörper in der Verdünnung von 1:10.000 gegeben und 45 min bei 37 °C bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Waschen mit TNT wurde der gegen den primären Antikörper gerichtete sekundäre Antikörper, der mit Merrettich-Peroxidase gekoppelt ist, in 10 ml TNT zugegeben und 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach Waschen mit TNT folgte eine Entwicklung des Blots mit dem *Chemiluminescence Reagent Plus System* (NEN, Boston, USA) nach Angaben des Herstellers. Die Chemilumineszenz wurde mittels CCD-Kamera nachgewiesen.

2.10 Präparation von Proteoliposomen

Für die Rekonstitution von ArtMP in die Lipide von *G. stearothermophilus* zur Charakterisierung des ABC-Transporters, wie ATPase-Aktivitäts-Untersuchungen und

Stabilitätstests, wurden *BioBeads* genutzt. Dabei wurde in Anlehnung an das Protokoll von Cornelius *et al.* (1984) verfahren.

2.10.1 Herstellung eines Lipid-OG-Gemisches

Zur Rekonstitution wurden die Lipide von *G. stearothermophilus* verwendet. Für die Präparation wurden 20 mg Lipid durch Stickstoffbegasung aus 1 ml Lipid-Chloroform-Lösung eingetrocknet und mit Puffer-Detergenz-Lösung (50 mM MOPS/K⁺, pH 7,5; 1 % OG) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 15 Minuten im Ultraschallbad (Bandelin, Sonarex) unter Stickstoff beschallt.

2.10.2 Zusammensetzung eines Rekonstitutionsansatzes

Für nachfolgende Untersuchungen der ATPase-Aktivität wurde zu den Rekonstitutionsansätzen das Substrat-Bindeprotein und das Substrat Arginin zugegeben.

Rekonstitutionsansatz:

125 µl	Lipid-OG-Lösung
50 µg	ArtMP
230 µg	ArtJ
1 mM	Arginin
auf 300 µl	50 mM MOPS/K ⁺ , pH 7,5
auffüllen	

Dem Ansatz wurden 100 mg *BioBeads* (*SM-2 Absorbent*, Bio-Rad, München) zur Entfernung des Detergenz hinzugefügt. Der Rekonstitutionsansatz wurde leicht rührend über Nacht und nach einem anschließenden Wechsel der *BioBeads* nochmals für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 300 x g wurde der Überstand für die jeweiligen Untersuchungen genutzt. Der Proteineinbau in die Lipid-Bilayer wurde über SDS-PAGE kontrolliert. Dazu wurden 100 µl des Rekonstitutionsansatzes ultrazentrifugiert (200.000 x g, 4 °C, 30 min) und je ein Aliquot von Überstand und Pellet auf ein 15 % SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt.

2.11 Charakterisierung von ArtMP und seinen Untereinheiten

2.11.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität

ATPase-Aktivitäten wurden in Mikrotiterplatten (Costar, *Ultra low cluster*, 96 well flat bottom, Corning Incorporated, USA) gemessen. Die Bestimmung der ATP-Hydrolyse wurde sowohl an solubilisierten als auch an rekonstituierten Proteinkomplexen modifiziert nach Nikaido *et al.* (1997) durchgeführt. 125 µl Messansatz wurden 1 min bei 60 °C vorinkubiert.

Die Reaktion wurde mit 2 mM ATP/3 mM MgCl₂ gestartet. Zu 4 Zeitpunkten wurden jeweils 25 µl entnommen und in eine der Plattenvertiefungen gegeben, die bereits 25 µl einer 12 %igen SDS-Lösung enthält. Für die Bildung eines Farbkomplexes wurden den Ansätzen anschließend 50 µl Lösung A (3 % Ascorbat in 1 M HCl, 0,5 % Ammoniummolybdat) und nach 5 Minuten 75 µl Lösung B (2 % Natriumcitrat, 2 % Natriumarsenat, 2 % Essigsäure) zugegeben. Nach 20 min wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen (*Safire, Tecan, Crailsheim, Deutschland*). Als Standard diente Na₂HPO₄, als Kontrollen wurden jeweils ein Ansatz ohne ATP-Zugabe und ein Ansatz ohne Probe mitgeführt. Die Messungen wurden mindestens doppelt durchgeführt.

2.11.2 Inhibierung der ATPase-Aktivität durch Vanadat

Die ATPase-Aktivität von ABC-Transportern kann durch die Behandlung mit Orthovanadat, einem Phosphat-Analogon, gehemmt werden. Dazu wurde ArtMP-J sowohl in Lösung als auch im rekonstituierten Zustand mit 1 mM Vanadat behandelt - 15 min Inkubation bei 60 °C. Die Aktivitätsmessungen wurden wie unter 2.11.1 beschrieben durchgeführt. Eine 1 molare Vanadat-Lösung wurde mit 10 N HCl auf pH 10 eingestellt. Das führte zu einer Gelbfärbung der Lösung. Anschließend wurde diese für mehrere Minuten gekocht, um die farbigen Polymere zu zerstören. Durch eine Extinktionsbestimmung bei 265 nm wurde die Konzentration der Vanadat-Lösung ($\epsilon_{265} = 2.925 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt und eingestellt.

2.11.3 Stabilitätsuntersuchungen gegenüber chaotropen Substanzen

Zur Untersuchung der Stabilität von ArtMP gegenüber ausgewählten Chemikalien wurden rekonstituierte Transportkomplexe mit chaotropen Substanzen inkubiert. Chaotrope Substanzen wie NaI, NaBr, NaSCN und Harnstoff haben eine destabilisierende Wirkung auf Proteine und Proteinkomplexe (Parrett *et al.* 1989). In den Versuchen wurden 50 µl eines Rekonstitutionsansatzes (Lipid-zu-Protein-Verhältnis 0,5 oder 0,75; auch LPR nach engl. *lipid-to-protein-ratio*) mit den oben genannten Substanzen zu Konzentrationen von 1, 2, 3 und 4 M (Harnstoff bis zu 8 M) versetzt und mit 50 mM Tris/HCl pH 8, 5 % Glycerol auf 100 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden für jeweils 20 min unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt: 16 °C, 25 °C, 37 °C, 50 °C und 80 °C. Anschließend wurden die Ansätze 30 min bei 100.000 x g ultrazentrifugiert, die Pellets resuspendiert und jeweils Aliquots vom Überstand und Pellet über SDS-PAGE aufgetrennt.

2.11.4 Auftrennung von ArtMP in seine Untereinheiten

Nach der von Liu und Ames (1998) beschriebenen Methode wurde ArtMP in Cytoplasmamembranen (Endkonzentration 1 mg/ml in 50 mM Tris/HCl, pH 8 und 5 % Glycerol) zur Destabilisierung variierend mit 6,6 und 8 M Harnstoff oder 6 M GdnHCl, 1 mM DTT, 15 mM ATP und MgCl₂ für 2 Stunden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und

anschließend 2 Stunden bei 200.000 x g und 4 °C ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde über Nacht mit Aceton gefällt, anschließend für 1 h bei 20.000 x g pelletiert, nochmals mit 70 % Ethanol, 2 % Natriumacetat gewaschen und erneut zentrifugiert. Eine Analyse der Versuche fand über SDS-PAGE statt. Bei weiteren Untersuchungen wurde nach der Methode von Parrett *et al.* (1989) verfahren. Es wurden PLS mit 1, 2, 3 und 4 M NaI, NaBr und NaSCN bei verschiedenen Temperaturen von 4 °C bis 80 °C inkubiert, pelletiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.12 Optimierung der Detergenzbedingungen für ArtMP

2.12.1 Untersuchung der Detergenzverträglichkeit mit SDS-PAGE

Für die Untersuchung der Wirkung von verschiedenen Detergenzien auf das solubilisierte ArtMP und dessen Stabilität wurde 1 mg ArtMP mit jeweils einem der folgenden Detergenzien für 2 Tage bei Raumtemperatur inkubiert: 0,1 % DDM, 1 % UDM, 1 % DTM, 1 % DM, 1 % NG, 2 % OTG, 4 % FC-10, 1 % FC 12 und 1 % LDAO (siehe Tabelle 4), wobei die Prozentangaben als Endkonzentrationen des jeweiligen Ansatzes zu verstehen sind. Die Proben wurden ultrazentrifugiert (45 min, 200.000 x g, 4 °C). Aliquots der Überstände und der möglicherweise entstandenen Pellets wurden über SDS-PAGE aufgetrennt analysiert.

2.12.2 Untersuchung der Detergenzverträglichkeit mit Blau-Nativer-PAGE

Die Proben enthielten 1 mg ArtMP und Detergenzien in folgenden Endkonzentrationen: 0,075 %, 0,15 %, 0,3 % und 0,6 % DDM, 0,1 % FC-10, 0,1 % FC-12, und 0,1 % SDS. Die Ansätze wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Aliquots der Ansätze wurden 10:1 mit 10 µl Blue-Native-Probenpuffer (5 % [w/v] Coomassie Brilliant Blau G250) versetzt und über Blau-Native-PAGE aufgetrennt.

2.13 Kristallographische Methoden

2.13.1 Zweidimensionale Kristallisation von ArtMP

Zur 2D-Kristallisation von ArtMP wurde weitgehend nach der von Hasler *et al.* (1998) beschriebenen Methode verfahren. Für die zweidimensionale Kristallisation wurden die Lipide von *G. stearothermophilus* genutzt. Es wurden 20 mg Lipid durch Stickstoffbegasung aus 1 ml Lipid-Chloroform-Lösung eingetrocknet und mit Lipid-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 2 % OG) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 2 Stunden im Ultraschallbad (Bandelin, Sonarex) unter Stickstoff beschallt. Zu den so hergestellten Liposomen wurde ArtMP (2 mg/ml) in einem Lipid-zu-Protein-Verhältnis von 1:2

(w/w) gegeben. Das Detergenz wurde über Dialyse in Mikrodialyse-Knöpfen mit einem Fassungsvermögen von 70 µl oder in Dialyse-Schläuche (Ausschlussvolumen: 6-8 kDa, Roth, Karlsruhe) entfernt. ArtMP wurde jeweils mit und ohne Nukleotid zweidimensional kristallisiert. Der Kristallisationsansatz des mit ^{13}C ,- ^{15}N -Prolin und -Tyrosin markierten ArtMP enthielt kein ATP und der ^{13}C ,- ^{15}N -Prolin, Tyrosin, Threonin-markierte Proteinkomplex wurde mit ATP kristallisiert. Zur Unterdrückung der Hydrolyse des zugesetzten ATP wurde dem Ansatz 0,1 mM EDTA zugegeben und auf den Cofaktor Magnesium verzichtet. Die Kristallisation fand bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 2 bzw. 4 Wochen statt, wobei alle 3 bzw. 5 Tage der Dialysepuffer gewechselt wurde. Die Kristalle wurden durch Zentrifugation (30 min, 20.000 x g, 4 °C) geerntet und in NMR-Rotoren überführt.

- **Zusammensetzung der Dialysepuffer für die 2D-Kristallisation von ArtMP**

<i>Kristallisationsansätze</i>	<i>ohne ATP-Zusatz</i>	<i>mit ATP-Zusatz</i>
Kristallisationspuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8 10 mM MgCl ₂ 300 mM NaCl 5 % Glycerol 0,01 % Azid	20 mM Tris/HCl, pH 8 ————— 300 mM NaCl 5 % Glycerol 0,01 % Azid 10 mM ATP 0,1 mM EDTA
Kristallisationsdauer	2 Wochen	4 Wochen

2.13.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von ArtMP-2D-Kristallen

Ansätze der 2D-Kristallisation von ArtMP wurden durch Transmissions-Elektronen-Mikroskopie analysiert. Dafür wurden 4,5 µl der jeweiligen Kristallisationsansätze auf ein mit Carbon beschichtetes *grid* (400 mesh copper rhodium) von PLANO (Wetzlar, Deutschland) aufgetragen, 30 s inkubiert und anschließend 3 x gewaschen. Auf die beladenen *grids* wurde 2 x 4,5 µl Uranyl Acetat (2 %, w/v) aufgetragen und durch das Entfernen der Lösung getrocknet. Die Aufnahmen wurden an einem H7000 Elektronen-Mikroskop (*Hitachi*) bei einer Beschleunigungsspannung (*accelerating voltage*) von 100 kV auf einem *Kodak* SO-163 Film bei einer 50.000fachen Vergrößerung (*magnification*.) durchgeführt.

2.13.3 Dreidimensionale Kristallisation von ArtP

Das gereinigte Protein ArtP wurde mit *Amicon Ultra Centrifugal Filter*-Konzentratoren (Ausschlussgröße 10 kDa, Millipore, Bedford, USA) auf eine Konzentration von ca. 30 mg/ml

eingestellt. Die Kristallisation wurde mit Hilfe des *sitting drop*-Verfahrens nach der Dampfdiffusionsmethode durchgeführt (Übersicht: Drenth, 1999). Für die 3D-Kristallisation von ArtP wurden 500 μ l bzw. 2 x 0,6 ml des gereinigten Proteins jeweils 1:1 mit Reservoirpuffer (25 % PEG 3350; 0,1 M BisTris, pH 6; 2 % Glycerol) vermischt. Die Kristallisation fand über eine Dauer von 18 bzw. 21 Tagen und in der ersten Woche bei Raumtemperatur, anschließend bei 16 °C statt. ArtP wurde jeweils mit und ohne ATP kristallisiert. Zur Unterdrückung der Hydrolyse des zugesetzten ATP wurde dem Kristallisationsansatz 0,1 mM EDTA zugesetzt.

2.14 Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie

Die MAS-NMR-Spektren von ArtMP und ArtP wurden in Zusammenarbeit mit Dipl.-Chem. Johanna Becker an einem *Bruker Avance* 900 Spektrometer, ausgestattet mit einem 3,2 mm Triple-Resonanz-MAS-Probenkopf, und an einem *Bruker Avance* 600 Spektrometer, versehen mit einem 4 mm Triple-Resonanz-MAS-Probenkopf, durchgeführt. Die Messungen fanden bei 280 K und einer Rotationsgeschwindigkeit von 12 oder 10 kHz statt. Bei den ^{13}C - ^{13}C Korrelationen erfolgte der Magnetisierungstransfer durch PDS (*proton-driven-spin-diffusion*; Szeverenyi *et al.*, 1982) mit Mischzeiten von 20, 200 oder 400 ms. Für die ^{13}C - ^{15}N Korrelationsexperimente wurde die ^{15}N Magnetisierung mit einer *rotational echo double resonance* (REDOR)-Pulsfolge (Gullion & Schaefer, 1989; Jaroniec *et al.*, 2000) über 4 Rotor-Perioden erzeugt und nach einer Evolutionszeit t_1 durch eine zweite REDOR-Pulsfolge der selben Länge wieder auf ^{13}C übertragen.

2.15 Lösungs-NMR-Spektroskopie

Die NMR-spektroskopische Analysen an ArtJ wurden von Dr. Peter Schmieder durchgeführt.

2.15.1 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Experimente

(heteronuclear single quantum coherence – heteronukleare Einquanten-Kohärenz)

Für die Lösungs-NMR-Untersuchungen lag ArtJ ^{15}N -markiert vor. Die Proteinprobe wurde mit *Centricon*-Konzentratoren (Ausschlussvolumen 5 kDa) auf eine Konzentration von 1 mM in 500 μ l konzentriert und vor der Messung mit 10 % (v/v) D_2O (99,9 %) versetzt. Die Spektren wurden bei 300 K an einem *Bruker AVANCE* 900 Spektrometer aufgenommen. Zu ArtJ wurde nacheinander 5 mM Arginin und 1 mM ArtMP gegeben. Die Konzentration des zugesetzten ATP/ MgCl_2 variierte zwischen 3 mM ATP/5 mM MgCl_2 und 30 mM ATP/50 mM MgCl_2 . Es wurden Kontrollmessungen mit ArtJ und ATP/ MgCl_2 durchgeführt, um Wechselwirkungen, die für den Transportvorgang nicht relevant waren, auszuschließen.

2.15.2 1D-³¹P- Experimente

Diese Messreihe diente der NMR-spektroskopischen Untersuchung der ATPase-Aktivität des ABC-Transporters ArtMP-J und des Einfluss verschiedener Faktoren, wie die Wirkung des Inhibitors Orthovanadat. Anhand des Verhältnisses von ATP zu ADP/P_i wurde, ähnlich wie bei dem biochemischen ATPase-Aktivitätstest (Nikaido *et al.*, 1997, 2.6.10), auf den Grad der Transporter-Aktivität geschlossen.

Es wurden eindimensionale NMR-Spektren aufgenommen, bei denen das in ATP und ADP/P_i vorkommende ³¹P-Isotop (natürliche Häufigkeit 100 %) detektiert wurde. Im 1D-³¹P-Spektrum traten typische Signale für ATP und ADP auf, die sich klar unterscheiden lassen, wie in der Abbildung 11 gezeigt ist. Die dargestellten 1D-³¹P-Spektren von ATP (oberes 1D-Spektrum) bzw. ATP/ADP/P_i (unteres 1D-Spektrum) wurden jeweils vor Substanz-Zugabe und zum Abschluss der NMR-Messungen aufgenommen. Die ³¹P-Spektren von ArtMP-J wurden an einem *Bruker Avance* 600 MHz Spektrometer bei 300 K aufgenommen, wobei die Phosphorfrequenz 243 MHz betrug.

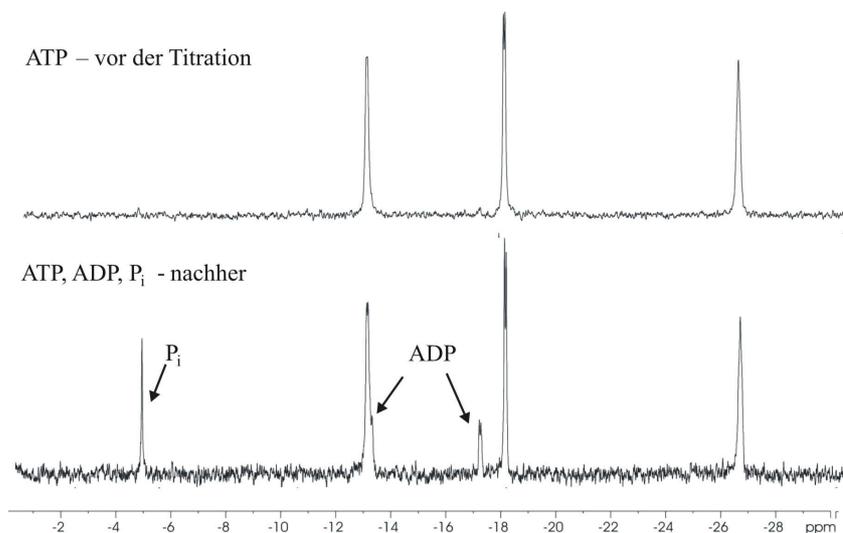


Abbildung 11 1D-³¹P-Spektren von ATP/ADP/P_i. Im oberen der beiden dargestellten Spektren sind deutlich die drei ³¹Phosphor-Signale des ATP erkennbar. Im unteren 1D-³¹P-Spektrum sind die zusätzlich durch die Hydrolyse von ATP hinzugekommenen Signale von ADP und P_i mit Pfeilen gekennzeichnet. Auf der x-Achse ist die chemische Verschiebung und auf der y-Achse die Intensität aufgetragen. Die Spektren wurden am 600 MHz Spektrometer (*Bruker*, Karlsruhe) aufgenommen. Die Frequenz für Phosphor betrug dabei 243 MHz.

Es wurden über 3 Stunden fortlaufend 1D-³¹P-Spektren, insgesamt 40, mit jeweils 40 *scans* aufgenommen. Das in den NMR-Proben enthaltene ArtMP und das Substrat-Bindeprotein ArtJ lagen unmarkiert vor. Die 500 µl Ansätze enthielten jeweils 2 mg des Komplexes und des Bindeproteins, die jeweils in 50 mM Tris/HCl, pH 8; 5 % Glycerol mit 0,4

% DM vorlagen. Als zu transportierendes Substrat wurde 5 mM Arginin hinzugefügt. Zur Inhibierung der ATPase-Aktivität von ArtMP-J wurde dem Ansatz Vanadat in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und 15 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde die NMR-Messung mit der Zugabe von 3 mM ATP/5 mM MgCl₂ gestartet. Allen Ansätzen wurde für die NMR-Messungen 10 % (v/v) D₂O (99,9 %) zugegeben.

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Untersuchung des ABC-Transportsystems ArtMP-J aus dem thermophilen Organismus *G. stearothermophilus* mit der NMR-Spektroskopie. An dem ABC-Transporter ArtMP und dem separat isolierten ABC-Protein ArtP wurden erste strukturelle Studien mit der Festkörper-MAS-NMR durchgeführt. Dafür wurde der Membranproteinkomplex und ArtP mit ^{13}C -, ^{15}N -Isotopen selektiv markiert. Die NMR-Messungen erforderten zudem eine Form der Probenpräparation, bei der die Proteine möglichst geordnet vorliegen sollten, ArtMP rekonstituiert in seiner natürlichen Lipidumgebung und ArtP im dreidimensionalen Kristall. An dem zum ABC-Transportsystem gehörenden Substrat-Bindeprotein ArtJ wurden in Lösung NMR-spektroskopische Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen Protein und den Membranproteinen des ABC-Transporters durchgeführt.

3.1 Präparation des ABC-Transporters ArtMP für biochemische und NMR-spektroskopische Untersuchungen

3.1.1 Präparation des ABC-Transporters ArtMP

Die strukturelle Untersuchung von ABC-Transportern mittels Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie stellt hinsichtlich der Präparation aber auch der Markierung mit ^{13}C -, ^{15}N -Isotopen eine Herausforderung dar. Bei den bis zum Beginn dieser Arbeit im Frühjahr 2003 durchgeführten Festkörper-MAS-NMR-Messungen war meist der Ligand und nicht der Transportkomplex Isotopen-markiert (Appleyard *et al.*, 2000; Spooner *et al.*, 1994a; Spooner *et al.*, 1998), so dass in der Literatur nur wenige Daten zur Herstellung eines Membranproteinkomplexes für die NMR-Spektroskopie existierten.

Als Grundlage für die Suche nach geeigneten Anzucht- und Expressionsbedingungen diente das in der Diplomarbeit von R. Fleischer (Humboldt-Universität Berlin, 2001) beschriebene Protokoll, das an die Anforderungen der Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie angepasst wurde. Dafür wurde nach den optimalen Expressionsbedingungen für *artMP* gesucht, die getesteten Bedingungen sind in der Tabelle 6 zusammengefasst. Die Expression von *artMP* in M9-Minimal-Medium wurde besonders intensiv untersucht und optimiert, da in diesem Medium die

erforderliche Isotopen-Markierung des Komplexes für die NMR-Untersuchungen erfolgte (siehe 2.5.1).

Tabelle 6 Zusammenfassung getesteter Expressionsbedingungen für *artMP*.

Bedingungen	Parameter
<i>E. coli</i> -Expressionsstämme	BL21(DE3); Rosetta(DE3); JM109
Anzuchtmedien	LB-, M9- und Autoinduktionsmedium
Temperaturen	16 °C; 20 °C; 25 °C; 30 °C; 37 °C
Geninduktion	- Zeitpunkt OD _{650nm} : 0,3-0,5; 0,6-0,8; 0,8-1 - Temperaturwechsel nach Induktion von 37 °C auf 25 °C oder 18 °C
Induktionsdauer	2; 4; 6 oder 10 Stunden

Das beste Expressionsergebnis sowohl in LB- als auch in M9-Minimal-Medium wurde im *E. coli*-Stamm JM109, mit einer Anzucht bei 37 °C, einer Geninduktion bei OD_{650nm} 0,3 bis 0,5 sowie einer anschließenden Wachstums- und Induktionsdauer von vier Stunden erhalten (Abbildung 12a).

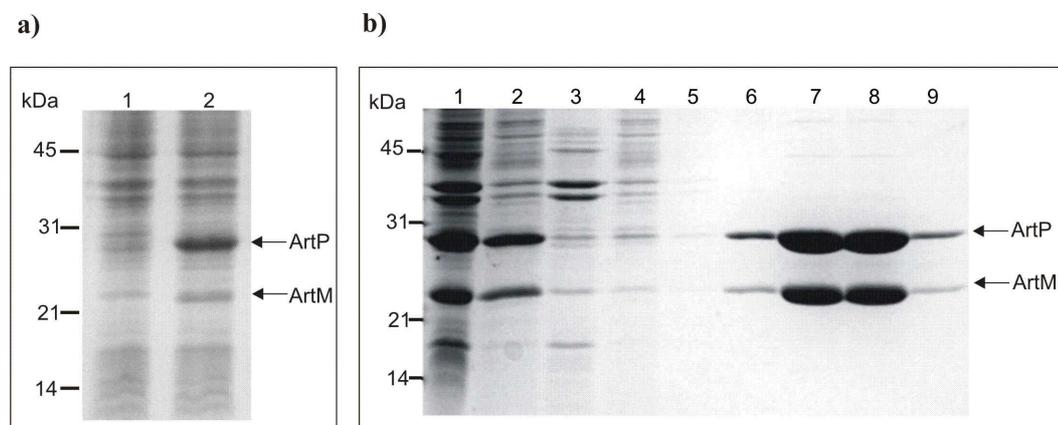


Abbildung 12 a) Expression von *artMP* in JM109(pRF2). Über ein 15 %iges SDS-PAGE aufgetrennte Zell-Lysate. Spur 1 - JM109(pRF2) ohne IPTG-Induktion; Spur 2 - JM109(pRF2) mit induzierter Expression von *artMP* in M9-Minimal-Medium. b) Präparation von ArtMP mittels TALON-Affinitätschromatographie. Spur 1 - Cytoplasmamembran; Spur 2 - Ultrazentrifugationsüberstand nach Solubilisierung; Spur 3 - Ultrazentrifugationspellet nach Solubilisierung der Cytoplasmamembran; Spur 4 - Durchlauf der Reinigung; Spur 5 - 1. Waschfraktion mit 10 mM Imidazol; Spur 6 - 10 - Eluatfraktionen.

Für die Solubilisierung von ArtMP wurde anfänglich das Detergenz *n*-Decanoyl-Sucrose (DS) verwendet. So lag der Komplex nach seiner Reinigung, die in Abbildung

12b gezeigt ist, gelöst in DS-Mizellen vor. Die Ausbeute der Präparationen waren ~ 8 mg ArtMP pro Liter LB und ~ 5 mg pro Liter M9-Minimal-Medium.

3.1.2 Untersuchung des Einflusses verschiedener Detergenzien und des Oligomerzustandes von ArtMP durch SDS- und Blau-Native-PAGE

Da einige Detergenzien die Stabilität von Proteinen negativ beeinflussen können, wurde in einer Versuchsreihe die Wirkung verschiedener Detergenzien auf den ABC-Transporter ArtMP untersucht. Dazu wurde der Komplex jeweils mit einem der folgenden Detergenzien inkubiert:

<i>Abkürzung</i>	<i>Detergenz</i>
DM	<i>n</i> -Decyl- β -D-maltosid
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid
UDM	<i>n</i> -Undecyl- β -D-maltopyranosid
DTM	<i>n</i> -Decyl- β -thio-maltopyranosid
NG	<i>n</i> -Nonyl- β -D-glucopyranosid
OTG	<i>n</i> -Octyl- β ,D-thioglucopyranosid
FC-10	<i>n</i> - Decylphosphocholin
FC-12	<i>n</i> - Dodecylphosphocholin
LDAO	Lauryldimethylamin Oxid

Nach der anschließenden Ultrazentrifugation wurden die Proben über SDS-PAGE analysiert. Eine Präzipitation zeigt an, dass das verwendete Detergenz für die Solubilisierung von ArtMP ungeeignet war. In den Ansätzen, die die Detergenzien UDM, LDAO, OG, OTG oder DTM enthielten, lag ArtMP nach der Inkubation und Ultrazentrifugation im Pellet vor (nicht gezeigt). Die Detergenzien DDM, DM, NG, FC10 und FC12 hielten den Membranproteinkomplex in Lösung.

Zur weiteren Überprüfung der Stabilität von ArtMP in unterschiedlichen Detergenzien wurde eine Analyse über die Blau-Native-Gelelektrophorese durchgeführt, mit der das oligomere Verhalten des ABC-Transporters bestimmt wurde (Abbildung 13). Aufgrund der Ergebnisse der SDS-PAGE wurde ArtMP mit den folgenden Detergenzien inkubiert: DDM in den Konzentrationen von 0,075 % bis 0,6 % sowie je 0,1 % FC10 und FC12. Zum Vergleich wurden in einem Versuchsansatz denaturierende Bedingungen für ArtMP durch die Zugabe des Detergenz SDS erzeugt. Nach der Inkubation wurden die Membranproteinkomplexe und ihre Untereinheiten

über Blau-Native-PAGE in einem Gradientengel mit 5-12 % Acrylamid aufgetrennt. In dem Coomassie-gefärbten Gel ist eine deutliche Bande bei 130-150 kDa zu erkennen (Abbildung 13: Stern-Kennzeichnung). Diese repräsentiert den ArtMP-Proteinkomplex mit seiner umgebenden Detergenzmizelle: je zweimal 25 kDa und 28 kDa für die Homodimere ArtM und ArtP sowie 15-35 kDa für die Detergenzmizelle, die den Membranproteinkomplex umgibt. Bei der Bande, die sich im Bereich von 210 kDa befindet, handelt es sich möglicherweise um eine Zusammenlagerung mehrerer Proteinkomplexe aufgrund von Aggregation.

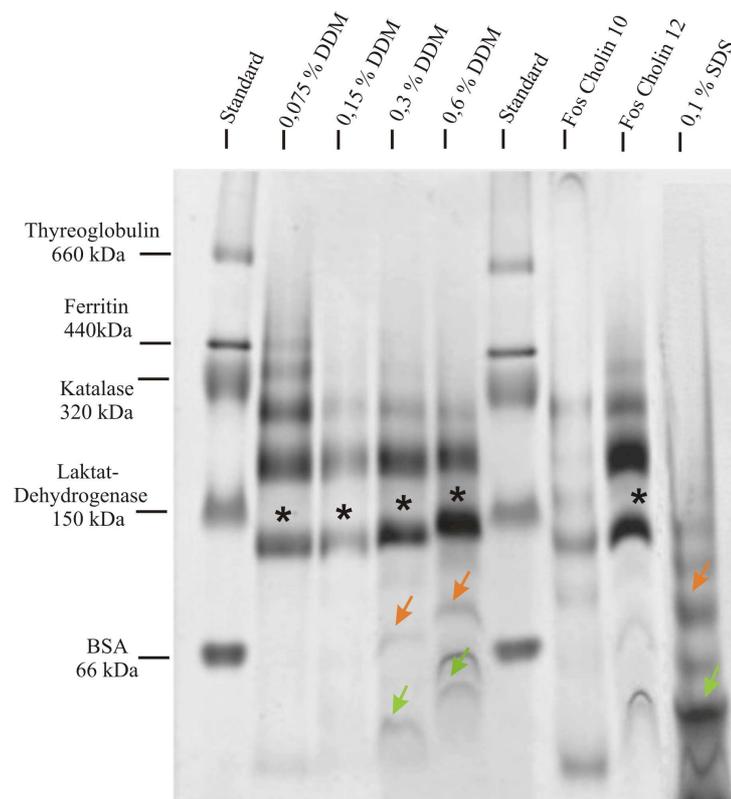


Abbildung 13 Analyse des Oligomierzustandes und der Stabilität von ArtMP bei Inkubation mit verschiedenen Detergenzien mittels Blau-Nativer-PAGE. ArtMP-Komplexe sind mit Sternen, das Membranprotein ArtM mit orange-farbigen und ArtP mit grünen Pfeilen gekennzeichnet. Zur Größenbestimmung der Proteine diente der *High Molecular Weight Standard* für Blau-Native-PAGE. Die in der jeweiligen Spur aufgetragenen Ansätze sind am Gel beschriftet.

In der Spur des mit SDS versetzten Ansatzes treten zwei mit Pfeilen gekennzeichnete Banden auf. Anders als in einem denaturierenden SDS-Gel, in dem das kleinere Membranprotein ArtM unterhalb von ArtP zu finden ist, stellt im Gel der Blau-Nativen-PAGE die obere Bande bei 66 kDa das Membranprotein ArtM mit der

umgebenden Detergenzmizelle und die niedrigere das ABC-Protein ArtP dar. In den Spuren, in denen Aliquots der ArtMP-Ansätze mit 0,3 % bzw. 0,6 % DDM aufgetragen wurden, sind mehrere schwache Banden zu erkennen. Die in Höhe von 75 kDa (0,3 % DDM) und 90 kDa (0,6 % DDM) laufenden Banden stellen ebenfalls die Membranproteine mit der Mizelle dar, markiert durch die orange-farbigen Pfeile. In der Spur des Ansatzes mit 0,6 % DDM tritt die ArtMP-Bande am deutlichsten hervor. Die darunter befindliche schwache Bande, gekennzeichnet mit einem grünen Pfeil, zeigt ArtP. Mit einem Anstieg der Detergenzkonzentration von 0,3 % auf 0,6 % verläuft die ArtM-Bande bei höherem Molekulargewicht aufgrund der Zunahme der Detergenzmoleküle, die das hydrophobe Protein umgeben. In dem Ansatz mit FC10 aggregierte der Proteinkomplex größtenteils und verblieb in der Auftragstasche des Gels. Das Laufverhalten des FC12-Ansatzes ähnelte dem, der mit DDM inkubierten Probe.

Für die Stabilität und die nachfolgende zweidimensionale Kristallisierung des ABC-Transporters erwies es sich als günstiger, für die weiteren Präparationen von ArtMP anstelle von *n*-Decanoyl-Sucrose (DS) das Detergenz *n*-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) zur Solubilisierung des Proteinkomplexes aus den Cytoplasmamembranen zu verwenden und bei der anschließenden Reinigung des Komplexes zu *n*-Decyl- β -D-maltosid (DM) zu wechseln.

3.1.3 Rekonstitution des ABC-Transporters ArtMP in Lipide aus *G. stearothermophilus*

Für die Rekonstitution von ArtMP wurden natürliche Lipide verwendet, die aus dem Originalstamm des ABC-Transporters *G. stearothermophilus* extrahiert wurden. Für die Rekonstitution werden die Lipide mit Detergenz versetzt und einer Ultraschallbehandlung unterzogen, um die benötigten Liposomen zu erzeugen. Anschließend werden die solubilisierten Membranproteine zu dem Ansatz gegeben. Der Einbau der Membranproteine in die Lipidmembranen wird erreicht, indem die Detergenzkonzentration in dem Rekonstitutionsansatz unter die kritische Mizellenkonzentration (*critical micellar concentration*, CMC) senkt wird. Die CMC gibt an, ab welcher Konzentration ein Detergenz Mizellen bildet. Unterhalb dieser Konzentration liegen die Detergenzmoleküle als Monomere vor und können die Membranproteine nicht in Lösung halten. Es kommt zu einem Einbau der Membranproteine in die Lipide (Abbildung 25). Zur Rekonstitution von ArtMP wurden

mehrere Methoden getestet: die Zugabe von *BioBeads*, die das Detergenz schnell absorbieren (Rigaud *et al.*, 1995), die Dialyse (Hasler *et al.*, 1998) oder die Ausverdünnung des Detergenz (Dolder *et al.*, 1996). Für die Herstellung von ArtMP-Proteoliposomen für biochemische Untersuchungen und die Aktivitätsbestimmungen wurden *BioBeads* zur Entfernung des Detergenz eingesetzt. Bei diesen Rekonstitutionen betrug das Lipid-zu-Protein-Verhältnis 50:1 (w/w) (auch LPR von engl. *lipid-to-protein-ratio*). Da sowohl die Aktivität als auch die Substratspezifität prokaryotischer ABC-Transporter von der Anwesenheit des Substrat-Bindeproteins abhängig ist (Sharma & Davidson, 2000; Hunke *et al.*, 2000), wurde den Rekonstitutionsansätzen für die ATPase-Aktivitätsbestimmungen neben dem solubilisierten Proteinkomplex ArtMP auch das Substrat-Bindeprotein ArtJ zugegeben (Präparation unter 2.6.4 dargestellt). Der Einbau des ABC-Transporters in die Lipidmembranen wurde kontrolliert, indem der Rekonstitutionsansatz ultrazentrifugiert und die sedimentierten Proteoliposomen sowie der Überstand über SDS-PAGE aufgetrennt wurden (Abbildung 14). Nach der Ultrazentrifugation ist nur das lösliche Substrat-Bindeprotein ArtJ im Überstand detektierbar. Die Membranproteine ArtM, die ABC-Proteine ArtP und das zum Teil eingeschlossene ArtJ liegen in den pelletierten Proteoliposomen vor.

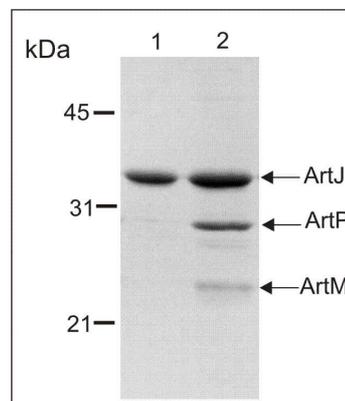


Abbildung 14 Kontrolle der Rekonstitution von ArtMP-J. Spur 1 - Ultrazentrifugationsüberstand vom Rekonstitutionsansatz; Spur 2 - Ultrazentrifugationspellet des Rekonstitutionsansatzes. Es wurde ein 15 %iges SDS-Gel verwendet.

3.2 Biochemische Charakterisierung von ArtMP als Vorbereitung für die MAS-NMR-Untersuchungen

An ArtMP wurden Untersuchungen bezüglich seiner Funktionalität, Stabilität und Sensibilität gegenüber verschiedenen Detergenzien durchgeführt. Die gewonnenen Erkenntnisse zu den Eigenschaften des Proteinkomplexes dienen zur Vorbereitung der MAS-NMR-spektroskopischen Untersuchungen.

3.2.1 ATPase-Aktivitätsanalysen an ArtMP-J

Die Aktivität von ArtMP-J wurde sowohl am solubilisierten Komplex in Detergenzlösung als auch rekonstituiert in Proteoliposomen biochemisch bestimmt (Methodenteil 2.11.1). An den rekonstituierten Proteinkomplexen wurde die ATPase-Aktivität unter Bedingungen untersucht, die der nativen Umgebung des ABC-Transportsystems weitgehend ähneln. Die Aktivitätsmessungen wurden in Gegenwart des Substrat-Bindeproteins ArtJ durchgeführt, da die Aktivität der ATPase und somit der Substrattransport von ABC-Importsystemen von der Anwesenheit des Bindeproteins abhängig ist. Die durchschnittliche ATPase-Aktivität für das solubilierte ArtMP-J in Detergenzlösung betrug $1,2 \mu\text{mol P}_i \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Proteinkomplex, für den rekonstituierten Transporters zwischen $0,7$ und $1,3 \mu\text{mol P}_i \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Proteinkomplex. In der Abbildung 15 ist die ATPase-Aktivität von ArtMP in Proteoliposomen in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit des Substrat-Bindeproteins dargestellt.

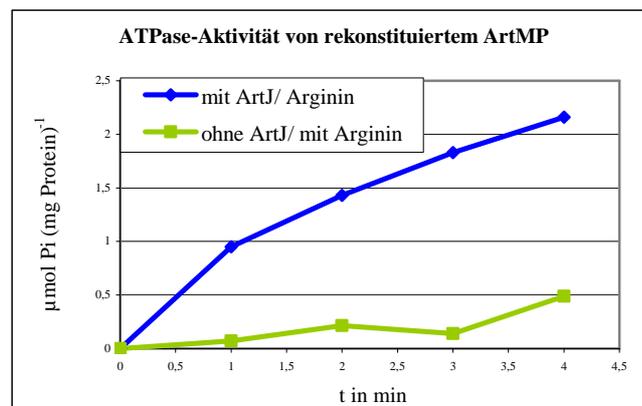


Abbildung 15 Abhängigkeit der ATPase-Aktivität des Komplexes von der Anwesenheit des Substrat-Bindeproteins. Die Präparation der Proteoliposomen (LPR 50:1 w/w) erfolgte jeweils mit oder ohne Zugabe von ArtJ. Die ATPase-Aktivitätsmessungen wurden bei 60 °C durchgeführt.

Die Untersuchung der stimulierenden Wirkung des Substrats Arginin auf die ATPase-Aktivität wurde ebenfalls sowohl an ArtMP in Detergenzlösung als auch am rekonstituierten Komplex durchgeführt. Entgegen der Erwartung wurde auch ohne zugegebenes Substrat eine Aktivität der ATPase des rekonstituierten Komplexes nachgewiesen, dargestellt in Abbildung 16. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung des Bindeproteins zeigte, dass in dem gereinigten ArtJ bereits Substrat gebunden war. Der komplexierte Ligand wurde auch während der verschiedenen Reinigungsschritte von der Metall-Affinitätschromatographie bis zur Dialyse nicht aus dem Protein entfernt. Dieses in ArtJ gebundene Substrat induzierte vermutlich die ATP-Aktivität von ArtMP in dem Messansatz, ohne dass zusätzlich Arginin zugegeben wurde. Das schnelle Abfallen der Aktivitätskurve während des Versuchs erfolgte vermutlich durch eine Limitierung des vorhandenen Arginins oder des ATP.

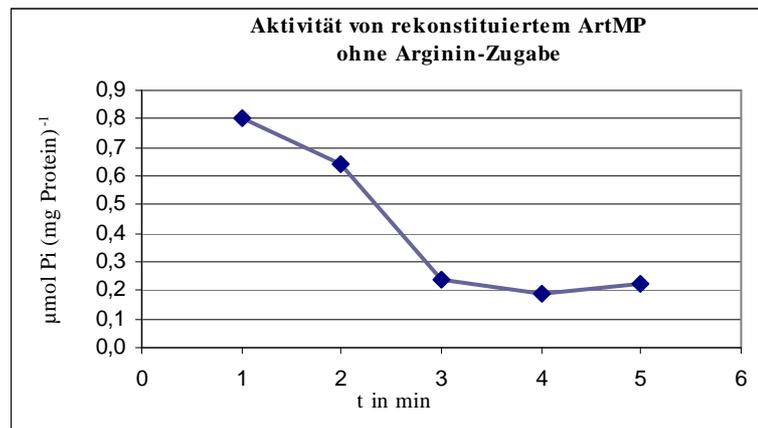


Abbildung 16 Darstellung der ATPase-Aktivität des rekonstituierten ArtMP-Komplexes ohne Substrat-Zugabe. Die Proteoliposomen wurden mit ArtJ, jedoch ohne zugegebenes Substrat präpariert. Die ATPase-Aktivitätsmessungen erfolgten wie zuvor beschrieben.

Die Aktivität des ABC-Transporters wurde über einen längeren Zeitraum wiederholt und verfolgt. ArtMP sollte möglichst lange stabil und aktiv bleiben, da die Dauer der Festkörper-MAS-NMR-Messungen mehrere Tage betragen kann. Zur Untersuchung der Stabilität des ABC-Transporters wurden ATPase-Aktivitätsmessungen über einen Zeitraum von einer Woche wiederholt. Am 1., 3., 5. und 7. Tag wurde die ATPase-Aktivität von ArtMP bestimmt, in DS-Detergenzlösung und in Proteoliposomen. Die Aktivität blieb während dieses Zeitraums annähernd gleich (Tabelle 7). Nach 10 Tagen Lagerung bei 4 °C fiel der Proteinkomplex aus. Es wurde untersucht, ob die Verwendung eines anderen Detergenz eine längere Lagerung des

Membranproteinkomplexes erlaubt. Wie weitere ATPase-Aktivitäts-Untersuchungen an in DM solubilisierten ArtMP zeigten, eignete sich dieses Detergenz besser, um den Proteinkomplex über einen Zeitraum von 14 Tagen stabil in Lösung zu halten (nicht gezeigt).

Tabelle 7 ATPase-Aktivitäten, von ArtMP-J-Proben in Detergenzlösung oder im rekonstituierten Zustand gelagert bei 4 °C.

Tag der Messung	ArtMP-J ATPase-Aktivitäten in $\mu\text{mol P}_i \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg Protein})^{-1}$	
	- in Detergenzlösung	- rekonstituiert in Proteoliposomen
1.	1,15 \pm 0,1	0,89 \pm 0,7
3.	1,10 \pm 0,1	0,87 \pm 0,5
5.	1,11 \pm 0,2	0,87 \pm 0,9
7.	1,05 \pm 0,3	0,86 \pm 0,9

3.2.2 Inhibition der ATPase-Aktivität

Das besondere Charakteristikum der ABC-Transporter ist die Kopplung von ATP-Hydrolyse und Substrattranslokation. Eine Möglichkeit zur Untersuchung dieses Zusammenhangs stellt die Hemmung der ATPase-Aktivität durch Inhibitoren dar (Liu *et al.*, 1997; Sharma & Davidson, 2000). Einer der Inhibitoren ist Orthovanadat, ein Phosphat-Analogen, das mit einem an der ATPase-Untereinheit gebundenen ADP einen stabilen Komplex eingeht. So wird die Dissoziation des ADP und eine Neubindung von ATP verhindert (Macara, 1980; Sharma & Davidson, 2000). Der ABC-Transporter liegt nun in einem Intermediär-Zustand des Transportzyklus vor, in dem ein ATP hydrolysiert wurde und sich das Substrat vermutlich im Translokationskanal befindet. Für die Festkörper-NMR wäre die Erzeugung und die strukturelle Untersuchung einer ArtMP-Probe, die den Komplex während des Translokationsvorgangs abbildet, ein interessanter Aspekt. Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse bilden die Grundlage für zukünftige Proben-Präparationen von ArtMP für NMR-spektroskopische Studien und dienen gleichzeitig zur näheren Charakterisierung des Komplexes. Die Hemmung der ATP-Hydrolyse des ABC-Transporters wurde sowohl NMR-spektroskopisch als auch biochemisch nachgewiesen.

- **NMR-spektroskopische Untersuchung der ATPase-Aktivität und deren Hemmung durch Vanadat**

Die Lösungs-NMR-Spektroskopie wurde hier verwendet, um die ATPase-Aktivität des ABC-Transportsystems ArtMP-J und der Einfluss eines Inhibitors auf die ATP-Hydrolyse über einen längeren Zeitraum zu verfolgen. Für diese NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden ^{31}P -Lösungs-NMR-Spektren aufgenommen. Während der NMR-Messung wurde die Zunahme des bei der ATP-Hydrolyse freiwerdenden ADP verfolgt. Während der NMR-Messung wurden fortlaufend 1D- ^{31}P -Spektren aufgenommen und die zeitliche Entwicklung der ADP-Signalintensität in einem Diagramm zusammengestellt (Abbildung 17).

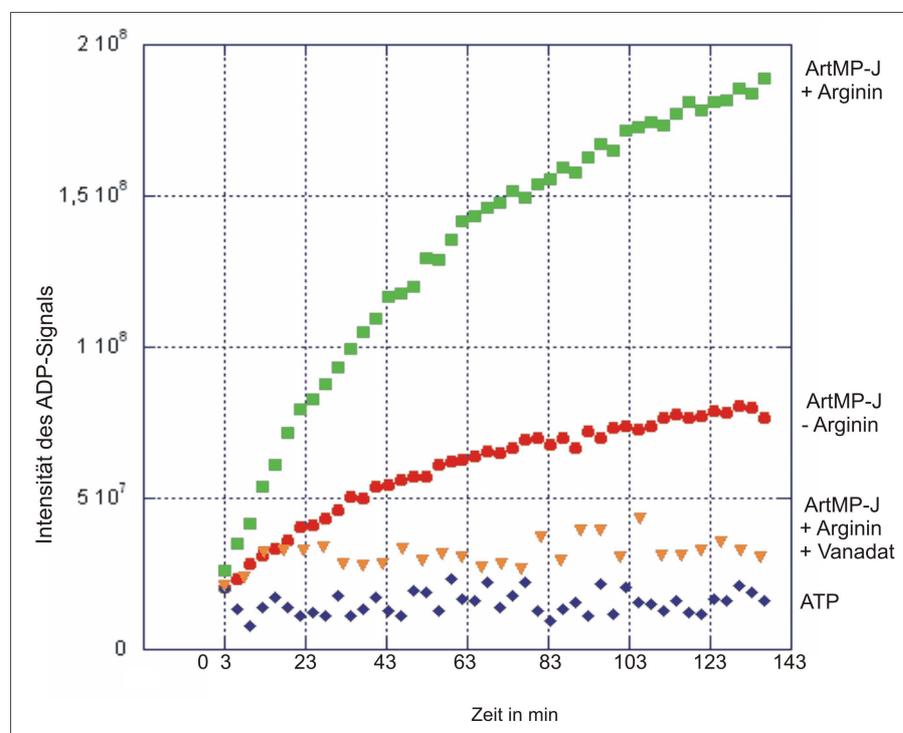


Abbildung 17 Darstellung der NMR-spektroskopischen Untersuchung der ATPase-Aktivität von ArtMP anhand der zeitlichen Entwicklung des ADP-Signals während der NMR-Messung. Jeder Punkt im Diagramm repräsentiert ein aufgenommenes 1D- ^{31}P -Spektrum. **blau:** ATP ohne Zusätze; **grün:** ArtMP-J mit Arginin; **rot:** ArtMP-J ohne Arginin; **gelb:** ArtMP-J mit Arginin und Vanadat. Da nur der Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die Aktivität von ArtMP gezeigt werden sollte, wurden die Einheiten für die Intensität des ADP-Signals beliebig gewählt. Der Nullpunkt der x-Achse liegt vor den eingezeichneten Werten, da zwischen der jeweiligen Zugabe und dem Start der NMR-Messungen eine zeitliche Differenz bestand. Die Aufnahme der ^{31}P -Spektren wurde auf einem *Bruker AVANCE 600* MHz Spektrometer bei 300 K durchgeführt.

Die Versuchsreihe wurde mit einer Kontrollmessung zur Stabilität von ATP begonnen (Abbildung 17 - blau). Die NMR-Messung erfolgte an ATP in 20 mM Tris/HCl-Puffer mit pH 8 ohne weitere Zusätze. Die über einen Zeitraum von mehreren Stunden bestimmten ADP-Signalintensitäten waren lediglich gering und somit vernachlässigbar. ATP/MgCl₂ blieb mehrere Stunden stabil in Lösung und wies keinen nachweisbaren Zerfall auf.

Die Probe der zweiten NMR-Messung enthielt alle für die Aktivität des Transporters nötigen Komponenten: den solubilisierten ArtMP-Komplex, ArtJ und Arginin als Substrat. Die Messung wurde durch die Zugabe von ATP/MgCl₂ gestartet (Abbildung 17 - grün). Die ADP-Signalintensität nahm gegenüber der ATP-Kontrollmessung deutlich zu, resultierend aus der ATP-Hydrolyse an den ATPase-Untereinheiten des ABC-Transporters. Diese Messung diente als positive Kontrolle für die nachfolgenden NMR-Messungen.

Anschließend wurde der Einfluss des Fehlens von Substrat auf die Aktivität des ABC-Transportsystems ArtMP-J untersucht. An dem Anstieg der gemessenen ADP-Signalintensitäten (Abbildung 17 - rot) war zu erkennen, dass auch ohne eine Zugabe von Arginin ATPase-Aktivität vorhanden war. Erwartet wurde keine oder lediglich eine geringe ADP-Signalintensität, da die Aktivität des Transporters von der Anwesenheit eines Substrat-beladenen Bindeproteins abhängig ist. Eine Erklärung für die gemessene ATPase-Aktivität war, dass am eingesetzten Bindeprotein bereits vor der NMR-Messung Substrat gebunden war. NMR-spektroskopische Untersuchungen am ¹⁵N-markierten ArtJ, aus dem über De- und Renaturierung der gebundene Ligand entfernt wurde, bestätigten diese Annahme. Das erklärt die festgestellte ATPase-Aktivität von ArtMP ohne zusätzlich zugegebenes Substrat.

In der letzten NMR-Messung dieser Versuchsreihe wurde eine Inhibition der ATPase-Aktivität von ArtMP durch die Zugabe von Vanadat induziert (Abbildung 17 - gelb). Die Intensitäten der ADP-Signale blieben nach anfänglichem Anstieg gering und nahmen während der laufenden NMR-Messung nicht weiter zu. Der Grund für den kurzen Anstieg des ADP-Signals ist, dass das Vanadat erst nach der Hydrolyse eines ATP das entstandene ADP komplexiert und so die Aktivität der ATPase hemmt. Diese NMR-Messung veranschaulicht den hemmenden Einfluss von Vanadat auf die ATPase-Aktivität von ArtMP.

- **Biochemische Untersuchung der Wirkung des ATPase-Inhibitors Vanadat**

Die Hemmung der ATP-Aktivität von ArtMP wurde ebenfalls biochemisch nachgewiesen, sowohl am in Detergenz gelösten Komplex als auch an Proteoliposomen (Abbildung 18). Die Aktivitäts-Unterschiede zwischen dem Transportkomplex ohne (Abbildung 18 - rot und blau) und mit Vanadat-Inkubation (Abbildung 18 – grau und hellblau) sind deutlich zu erkennen. Bei ArtMP in Detergenzlösung wurde nach der Inkubation mit Vanadat keine ATPase-Aktivität nachgewiesen.

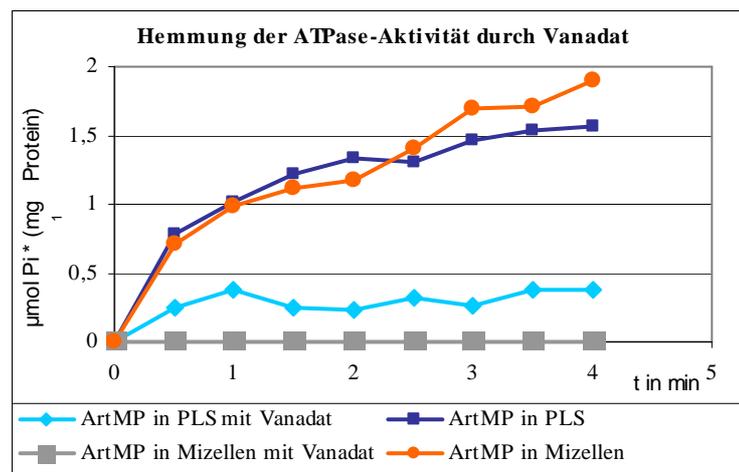


Abbildung 18 Darstellung der ArtMP ATPase-Aktivität und deren Hemmung durch Vanadat. **Dunkelblau:** ArtMP-J in Proteoliposomen; **orange:** ArtMP-J in Detergenzlösung; **hellblau:** Hemmung der ATPase-Aktivität - ArtMP in Proteoliposomen; **grau:** Hemmung der ATPase-Aktivität - ArtMP in Detergenzmizellen.

Eine Behandlung der Proteoliposomen mit dem Inhibitor führte zu einer deutlichen Verminderung der Aktivität. Die Restaktivität des rekonstituierten ArtMP beruht möglicherweise auf dem Einschluss eines Teils der ATPase-Untereinheiten im Inneren der Proteoliposomen, die so von der Wirkung des Vanadats unbeeinträchtigt blieben.

Die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen und biochemischen ATPase-Aktivitäts-Untersuchungen am solubilisierten und rekonstituierten Komplex bestätigten die hemmende Wirkung von Vanadat auf die Aktivität des ABC-Transporters. Diese Messungen bilden die Grundlage für zukünftige Präparationen von ArtMP-J in einem intermediären Zustand des Transportzyklus und dessen strukturelle Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie.

3.2.3 Markierungsstrategie für die NMR-Untersuchung von ArtMP: Auftrennung und Reassemblierung des ABC-Transporters

In diesem Abschnitt sind Versuche zur Trennung des Proteinkomplexes ArtMP in seine Untereinheiten dargestellt, die als Vorbereitung für eine besondere Markierung des ABC-Transporters mit Isotopen für die MAS-NMR-Untersuchungen dienen. In dem Komplex sollte nur eine der Domänen, TMD oder NBD, Isotopen-markiert sein. Dadurch ergibt sich eine Verminderung der Signale im NMR-Spektrum, die somit einfacher auszuwerten sind. Als Vorlage für diese Versuche diente die erfolgreiche Auftrennung und anschließende Reassemblierung der homologen Histidin-Permease HisQMP aus *Salmonella typhimurium* (Liu & Ames, 1998). Die Behandlung des rekonstituierten HisQMP mit 6,6 M Harnstoff führte zu einem vollständigen Ablösen der ATPase-Untereinheiten von den integralen Membranproteinen, ohne sie zu beschädigen. Die Untereinheiten wurden anschließend wieder zusammengefügt und die wiederhergestellte Funktionalität des ABC-Transporters nachgewiesen.

Auf ArtMP übertragen sollte mit diesem Verfahren ein Transportkomplex hergestellt werden, der aus ^{13}C -, ^{15}N -markierten Membranproteinen und unmarkierten ATPase-Untereinheiten besteht (schematisch dargestellt in Abbildung 19).

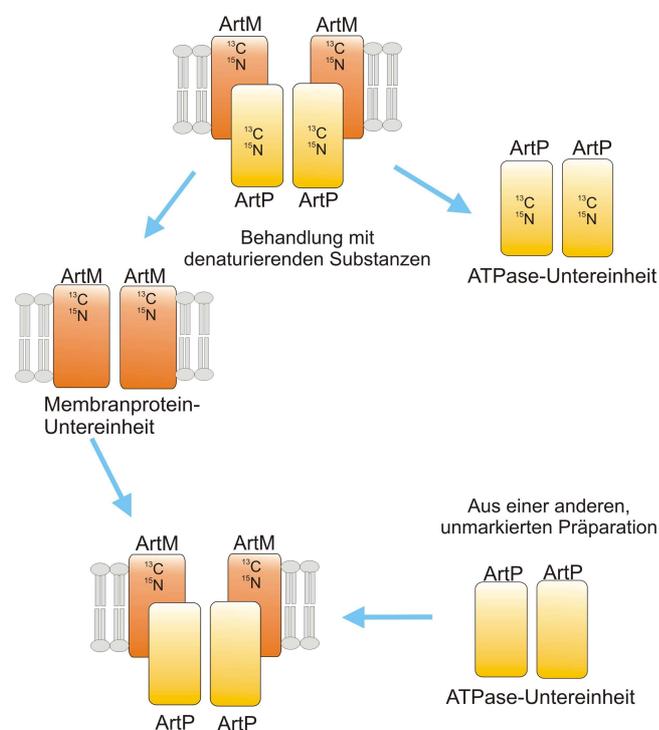


Abbildung 19 Schematische Darstellung einer ArtMP Markierungsstrategie für NMR-Untersuchungen. Gezeigt ist die Trennung von ArtMP in seine Untereinheiten mit anschließender Wiederherstellung eines funktionellen Transportsystems.

Die ersten Versuche wurden an *E. coli* JM109-Cytoplasmamembranen vorgenommen, die ArtMP enthielten. Die Membranen wurden mit verschiedenen Harnstoff-Konzentrationen bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert, um das ABC-Protein aus dem Transportkomplex zu lösen. Nach der Inkubation des Komplexes mit 6,6 M Harnstoff wurden die Ansätze zur Trennung der Membran- und der löslichen Fraktion ultrazentrifugiert. Abbildung 20a zeigt die erhaltenen Fraktionen nach ihrer Auftrennung im SDS-Gel. Der mit 6,6 M Harnstoff behandelte Ansatz (Spur 4 und 5) ähnelte dem der unbehandelten Cytoplasmamembranen (Spur 2 und 3) in ihrer Proteinzusammensetzung. Somit lässt sich ArtP durch eine Behandlung mit 6,6 M Harnstoff nicht aus dem Proteinkomplex lösen. Auch der Zusatz von Detergenz oder eine Ultraschallbehandlung führte nicht zu einer Destabilisierung des ABC-Transporters. Durch eine Erhöhung der Harnstoff-Konzentration auf 8 M wurde ein leichtes Abtrennen des ArtP-Proteins vom Transportkomplex bewirkt (Abbildung 20b). Wie diese Versuche zeigten, ist die Behandlung mit Harnstoff nicht geeignet, die ATPase-Untereinheiten vollständig abzutrennen.

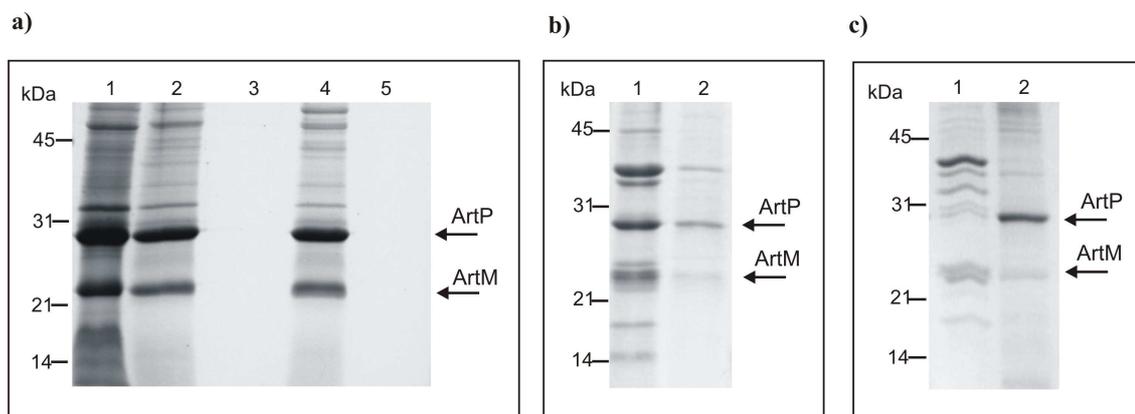


Abbildung 20 **Versuche zur Destabilisierung von ArtMP.** Inkubation von *E. coli* JM109(pRF2) Cytoplasmamembranen mit Harnstoff oder GdnHCl. Es sind jeweils die bei Ultrazentrifugation der Ansätze entstandenen Fraktionen aufgetragen. **a)** 6,6 M Harnstoff. Spur **1** - Ausgangsmaterial; Spur **2** und **3** - Pellet und Überstand ohne Harnstoff-Zugabe; Spur **4** und **5** - Pellet und Überstand nach der Inkubation mit Harnstoff. **b)** 8 M Harnstoff. Spur **1** und **2** - Pellet und Überstand des Ansatzes. **c)** 6 M GdnHCl. Spur **1** und **2** - Pellet und Überstand. Es wurden jeweils 10 µl der Reaktionsansätze über eine 15 %iges SDS-PAGE aufgetrennt.

In einem weiteren Experiment zur Destabilisierung des Komplexes und zum Abtrennen des ABC-Proteins wurden Cytoplasmamembranen, die ArtMP enthielten, mit 6 M Guanidinhydrochlorid (GdnHCl), einem stark chaotropen Salz, inkubiert. Wie

in Abbildung 20c zu erkennen ist, liegt ArtP nach der Ultrazentrifugation gelöst im Überstand des Ansatzes vor. Demzufolge bewirkt eine Behandlung mit GdnHCl das Ablösen der ABC-Proteine. Durch die Abtrennung von ArtP von den Membranproteinen war der erste Schritt zur Herstellung des speziell markierten ABC-Transporters ArtMP getan. Nun sollte der Proteinkomplex wieder zusammengesetzt und anschließend aus den Membranen solubilisiert werden. ArtP wurde aus dem Überstand der GdnHCl-Behandlung gereinigt und für die nachfolgenden Assemblierungs-Experimente verwendet. Die Cytoplasmamembranen, von denen ArtP zuvor abgewaschen worden und von denen das GdnHCl über Dialyse entfernt worden war, wurden mit dem abgelösten, gereinigten ABC-Protein inkubiert und anschließend ultrazentrifugiert. Bei der anschließenden Analyse mit SDS-PAGE (Abbildung 21a) wurde eine Bande in Höhe des ABC-Proteins in der Cytoplasmamembran-Fraktion identifiziert (Spur 5). Das führte zu der Annahme, dass ArtP erfolgreich mit den in der Membran verbliebenen TMDs reassemblierte.

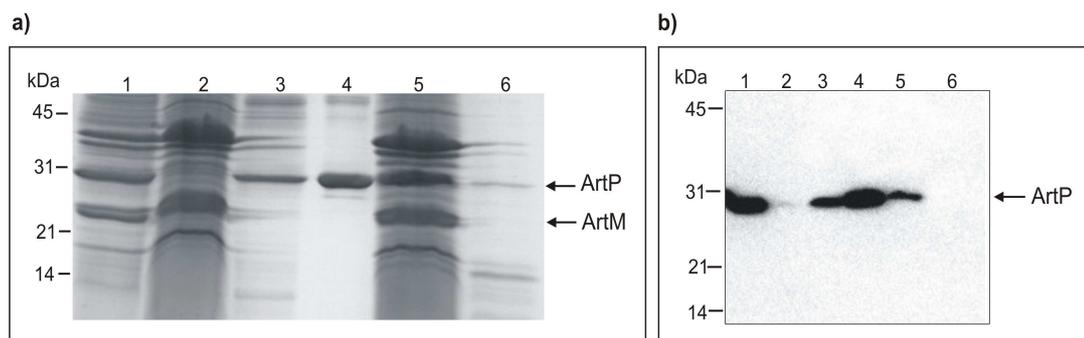


Abbildung 21 Experimente zur Trennung und zum Wiederausammenfügen von ArtMP an JM109(pRF2)-Cytoplasmamembranen. **a) Ablösen und Reinigung von ArtP mit anschließender Reassemblierung mit ArtM.** Spur 1 - unbehandelte Cytoplasmamembran; Spur 2 und 3 - Ultrazentrifugationspellet und -überstand der mit 6 M GdnHCl inkubierten Cytoplasmamembran; Spur 4 - gereinigtes ArtP; Spur 5 - Cytoplasmamembran nach Inkubation mit ArtP; Spur 6 - Ultrazentrifugationsüberstand des Reassemblierungsansatzes. Es wurden jeweils 7,5 µl der Ansätze über ein 15 %iges SDS-Gel aufgetrennt. **b) Immunoblot zum Nachweis der Bindung von ArtP an die Membranproteine ArtM** mit einem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper. Spur 1 - unbehandelte Cytoplasmamembran; Spur 2 - ultrazentrifugierte Cytoplasmamembran nach GdnHCl-Inkubation und Ablösen von ArtP; Spur 3 - Ultrazentrifugationsüberstand nach GdnHCl-Behandlung mit gelöstem ArtP; Spur 4 - gereinigtes ArtP; Spur 5 und 6 - Ultrazentrifugationspellet und -überstand nach Inkubation mit ArtP. Es wurden 10 µl pro Ansatz über ein 15 %iges SDS-Gel aufgetrennt.

Bei der zusätzlichen Bande (Spur 5 in Abbildung 21a) handelt es sich tatsächlich um das ABC-Protein des Komplexes, wie immunologisch über den His-Tag von ArtP nachgewiesen wurde (Abbildung 21b). Der anscheinend reassemblierte ArtMP-Proteinkomplex sollte nun aus der Cytoplasmamembran solubilisiert werden. Wie sich jedoch herausstellte, war es nicht möglich, ArtMP wieder in Lösung zu bringen. Es wurde ebenfalls erfolglos versucht, die in den GdnHCl-behandelten Cytoplasmamembranen verbliebenen ArtM-Untereinheiten zu solubilisieren. Die Membranproteine wurden durch die Wirkung des GdnHCl so geschädigt, dass eine Solubilisierung nicht mehr möglich war. Daraufhin wurde untersucht, ob das ArtP, das in der Membran-Fraktion des SDS-Gels (Abbildung 21a) identifiziert wurde, anstelle der Membranproteine unspezifisch an den Lipiden der Cytoplasmamembranen gebunden hatte. Hierzu wurde das gereinigte ArtP mit Lipiden inkubiert und ultrazentrifugiert. Die anschließend durchgeführte Analyse mit SDS-PAGE ergab, dass ein Teil des ArtP-Proteins in der pelletierten Membran-Fraktion vorlag und das Protein somit unspezifisch an die Lipidmembranen gebunden hatte.

In einer weiteren Versuchsreihe zu dem bestehenden Ziel, ArtMP in seine Untereinheiten zu trennen, unterschiedlich mit Isotopen zu markieren und wieder zu zusammensetzen, wurden Chemikalien verwendet, die in der Literatur für die Auftrennung ähnlicher Membranproteinkomplexe verwendet wurden. Parrett *et al.* (1989) beschrieb die Abtrennung des funktionellen F_A/F_B Polypeptids vom Photosystem I durch eine Behandlung mit chaotropen Reagenzien wie NaI, NaBr und NaSCN. Da die Experimente an einer thermophilen Art des Cyanobakteriums *Synechococcus* durchgeführt wurden, waren diese Methode möglicherweise auch für das ebenfalls aus einem thermophilen Organismus stammende ArtMP anwendbar.

Nachfolgend ist die Behandlung des ABC-Transporters mit NaBr, NaI und NaSCN dargestellt. Diese Versuche wurden an ArtMP-Proteoliposomen durchgeführt, die jeweils mit verschiedenen Konzentrationen von NaI, NaBr und NaSCN inkubiert und anschließend ultrazentrifugiert wurden. In diesen Versuchen wurde auf die Verwendung von Cytoplasmamembranen, die den Komplex enthalten, verzichtet, um mögliche störende Einflüsse wie Interaktionen mit anderen Proteinen auszuschließen. Durch die Behandlung mit den verschiedenen chaotropen Chemikalien wurde ein Teil des ArtP-Proteins aus dem Komplex gelöst, ohne die Proteine zu schädigen (Spur 3 in Abbildung 22). Ein Großteil des ArtP war jedoch in der Fraktion des Ultrazentrifugationspellets zu finden. Möglicherweise war es in den Proteoliposomen

eingeschlossen. Auch eine zusätzliche Behandlung mit Ultraschall führte nicht zu einem besseren Ergebnis. Mit keiner der verwendeten chaotropen Substanzen wurde ArtP vollständig von den Membranproteinen des ABC-Transporters bzw. von den Proteoliposomen getrennt.

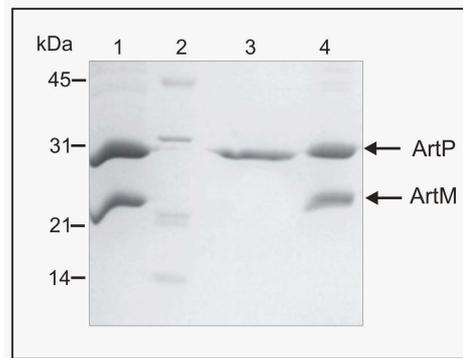


Abbildung 22 **Behandlung von ArtMP-Proteoliposomen mit 4 M NaI.** Die inkubierten Ansätze wurden ultrazentrifugiert und über ein 15 %iges SDS-Gel aufgetrennt. Spur 1 - Proteoliposomen vor NaI-Behandlung; Spur 2 - Standardproteine; Spur 3 und 4 - Ultrazentrifugationsüberstand und -pellet.

Als Ergebnis der verschiedenen Versuchsreihen ist zusammenfassend festzustellen, dass ArtP durch eine Behandlung mit GdnHCl vollständig vom Proteinkomplex getrennt und anschließend gereinigt werden konnte. Jedoch wurden die Membranprotein-Untereinheiten des Komplexes durch die Wirkung des GdnHCl geschädigt. Ein spezifisches Zusammenfügen der Untereinheiten zu einem funktionalen Transportkomplex war nicht nachweisbar. Eine Auftrennung des ABC-Transporters ArtMP analog zur Histidin-Permease aus *S. typhimurium* durch die Inkubation mit hochkonzentriertem Harnstoff war ebenfalls nicht möglich. Die Behandlung des Proteinkomplexes mit chaotropen Substanzen nach Parrett *et al.* (1989) führte nur zu einer teilweisen Abtrennung von ArtP, da ein Großteil der ABC-Proteine wahrscheinlich im Inneren der Proteoliposomen eingeschlossen war. Eine vollständige Auftrennung des ABC-Transporters in seine Untereinheiten aufgrund der Wirkung von Chemikalien war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Eine positive Erkenntnis dieser Versuche war jedoch, dass der Transportkomplex eine beeindruckend hohe Stabilität und Toleranz gegenüber hohen Temperaturen und Harnstoff-Konzentrationen besitzt.

3.3 Getrennte Expression und Präparation der Untereinheiten des ABC-Transporters ArtMP

Da der ABC-Transporter nicht durch Chemikalien destabilisiert und in seine Untereinheiten aufgetrennt werden konnte, sollten die Komponenten des Komplexes nun separat exprimiert und präpariert werden. Die getrennt hergestellten Proteine ArtM und ArtP sollten anschließend zu einem funktionalen Transportsystem assembliert werden.

3.3.1 Präparation des Membranproteins ArtM

ArtM wurde durch die Expression von den Plasmiden pVL5-M1 und pVL5-M2 (Tabelle 3 unter 2.1.3) mit einem N-terminalen oder C-terminalen His-Tag synthetisiert. Die Expression wurde in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3), Rosetta(DE3) und Rosetta(DE3)(pLysS) untersucht. Nur in BL21(DE3) wurde für das Konstrukt mit N-terminalem His-Tag eine signifikante Expression des *artM*-Gens nachgewiesen. Die besten Resultate wurden bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C und einer Expressionsdauer von 4 Stunden erhalten. Nach der Präparation der Cytoplasmamembran wurde ArtM mit 1,2 % DS solubilisiert und gereinigt. Aus einem Liter Kultur wurden 0,1 mg Membranprotein isoliert. Für die Assemblierung des ABC-Transporters und die nachfolgenden Festkörper-MAS-NMR-Untersuchungen ist eine ungefähr 100fach höhere Proteinmenge erforderlich. Die Synthese von ArtM in einem zellfreien Expressionssystem analog zu Klammt *et al.* (2004) wurde ebenfalls getestet, führte jedoch nicht zu einem positiven Ergebnis. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, das Membranprotein ArtM im für die NMR erforderlichen Umfang einzeln zu präparieren.

3.3.2 Präparation des ABC-Proteins ArtP

Zur Expression des *artP*-Gens wurden die Plasmide pVL4-P1 und pVL4-P2 (Tabelle 3 unter 2.1.3) verwendet, wodurch das synthetisierte ABC-Protein mit einem N-terminalen oder C-terminalen His-Tag fusioniert wurde. Die Expression von *artP* wurde in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3), Rosetta(DE3) und Rosetta(DE3)pLysS untersucht. Das beste Expressionsergebnis wurde in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3), kultiviert bei 37 °C, über eine Induktionsdauer von 4 Stunden erzielt. Die Expression

und Löslichkeit von ArtP mit N-terminalem His-Tag war deutlich höher als bei der Variante mit der C-terminalen His₆-Extension (Abbildung 23a). Aus diesem Grund wurde das Plasmid pVL4-P1 für die weiterführenden Versuche verwendet.

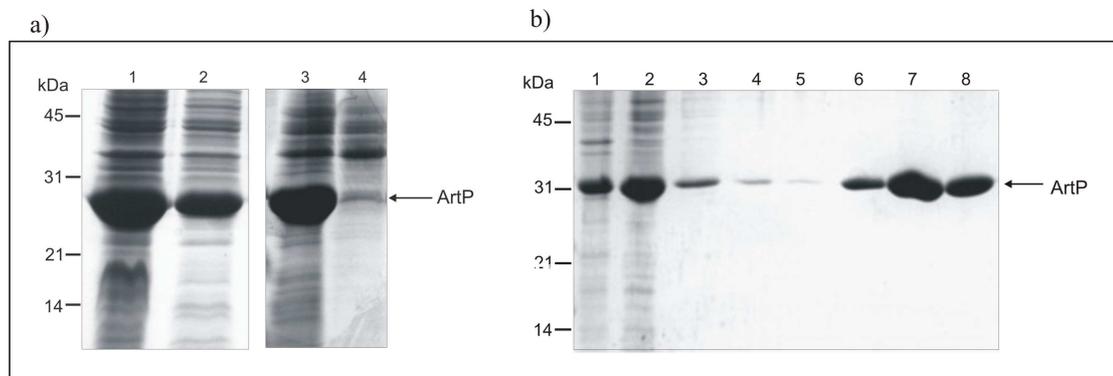


Abbildung 23 Expression von *artP* in BL21(DE3) und die anschließende Reinigung.
a) Expression. Spur 1 und 2 - von Plasmid pVL4-P1; Spur 3 und 4 - von Plasmid pVL4-P2. Spur 1 und 3 - Gesamtzellextrakt; Spur 2 und 4 - Zentrifugationsüberstand nach Zellaufschluss. **b) Reinigung von ArtP über TALON-Affinitätschromatographie.** Spur 1 - Gesamtzellextrakt; Spur 2 - Zentrifugationsüberstand nach Zellaufschluss; Spur 3 - Cytoplasmamembran; Spur 4 und 5 - Waschfraktionen mit Säulenpuffer ohne bzw. mit 10 mM Imidazol; Spur 6 bis 8 - Eluatfraktionen mit ArtP. Es wurden 10 µl der Fraktionen über 15 % SDS-PAGE aufgetrennt.

ArtP wurde über TALON-Affinitätschromatographie mit einer Ausbeute von 50 mg Protein pro Liter LB-Medium aus dem Cytosol der Zellen gereinigt (Abbildung 23b). Im weiteren Verlauf der Arbeit ergab sich eine alternative Methode zur Präparation von ArtP. Es stellte sich heraus, dass bei der Expression des ArtMP-Komplexes ein Teil des ArtP-Proteins gelöst im Cytosol vorlag, das sich separat isolieren ließ (Abbildung 24a und b). Die Ausbeute dieser Präparation betrug 10 mg pro Liter M9-Minimal-Medium. Der positive Aspekt dieser Experimente war, dass aus einer Kultivierung von JM109(pRF2)-Zellen sowohl der vollständige ABC-Transporter als auch das separate ArtP-Protein für die NMR-Spektroskopie hergestellt werden können. So entstehen zwei verschiedene Proteinproben, die gleichartig markiert werden können. In dieser Arbeit wurde ArtP, das für die Festkörper-MAS-NMR-spektroskopischen Messungen selektiv Isotopen-markiert hergestellt wurde, aus derselben JM109(pRF2)-Kultivierung isoliert wie auch das gleichartig markierte ArtMP. Für die Versuchsreihen im Rahmen der dreidimensionalen Kristallisierung von ArtP wurde das ABC-Protein

separat in BL21(DE3) durch das Plasmid pVL4-P1 exprimiert und anschließend gereinigt.

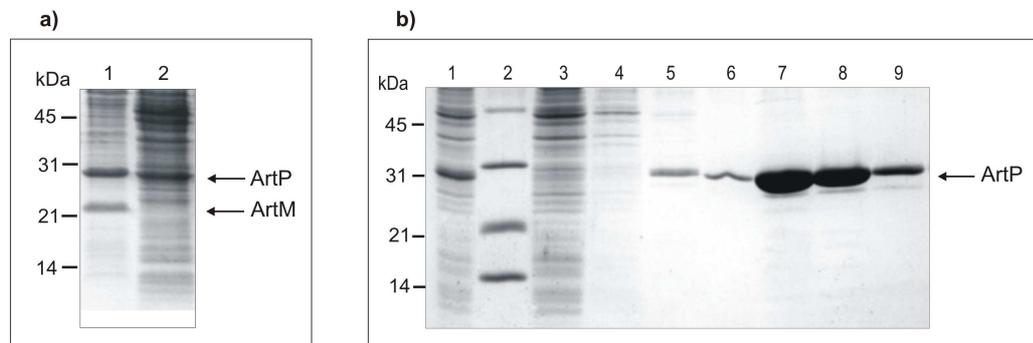


Abbildung 24 **Isolierung des ArtP-Proteins aus der ArtMP-Präparation.** a) **Proteinfraktionierung der Cytoplasmamembran und des Cytosols aus JM109(pRF2)-Zellen.** Spur 1 - Cytoplasmamembran, Spur 2 - Cytosolfraction. b) **Reinigung von ArtP aus ArtMP-Präparation.** Spur 1 - Cytosol nach dem Zellaufschluss; Spur 2 - Standardproteine; Spur 3 - Durchfluss der Reinigung; Spur 4 - Waschfraktion mit Säulenpuffer; Spur 5 bis 9 Eluatfraktionen mit ArtP. Es wurden jeweils 15 µl über 15 % SDS-Gel aufgetrennt.

3.4 Kristallisation von ArtMP und ArtP

Voraussetzung der strukturbioologischen Untersuchung von Proteinen und insbesondere von Membranproteinen mit der Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie ist deren definierte und homogene Anordnung, wie beispielsweise in zweidimensionalen (2D)- oder dreidimensionalen (3D)-Kristallen. Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Kristallisationsexperimente zur 2D-Kristallisation von ArtMP und zur 3D-Kristallisation von ArtP dargestellt.

3.4.1 Zweidimensionale Kristallisation des ABC-Transporters ArtMP

Für die zweidimensionale Kristallisation werden solubilisierte, gereinigte Membranproteine dicht in Lipidmembranen rekonstituiert. Dazu werden die Proteine in Detergenzlösung mit solubilisiertem Lipid versetzt und anschließend das Detergenz aus dem Ansatz entfernt, wodurch unter geeigneten Bedingungen kristalline Proteinbereiche in den Lipiden erzeugt werden (schematisch dargestellt in Abbildung 25). Dazu wurden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, in denen Puffer, Inkubationstemperaturen und -dauer, Lipid-zu-Protein-Verhältnisse, Detergenzien und Lipide systematisch

variiert wurden (Zusammenarbeit mit F. Casagrande, Arbeitsgruppe A. Engel, Biozentrum Basel; Schweiz; unter Verwendung der Lipid- und Detergenzbank dieses Labors). Die Ergebnisse der einzelnen Ansätze wurden anschließend mit der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie untersucht.

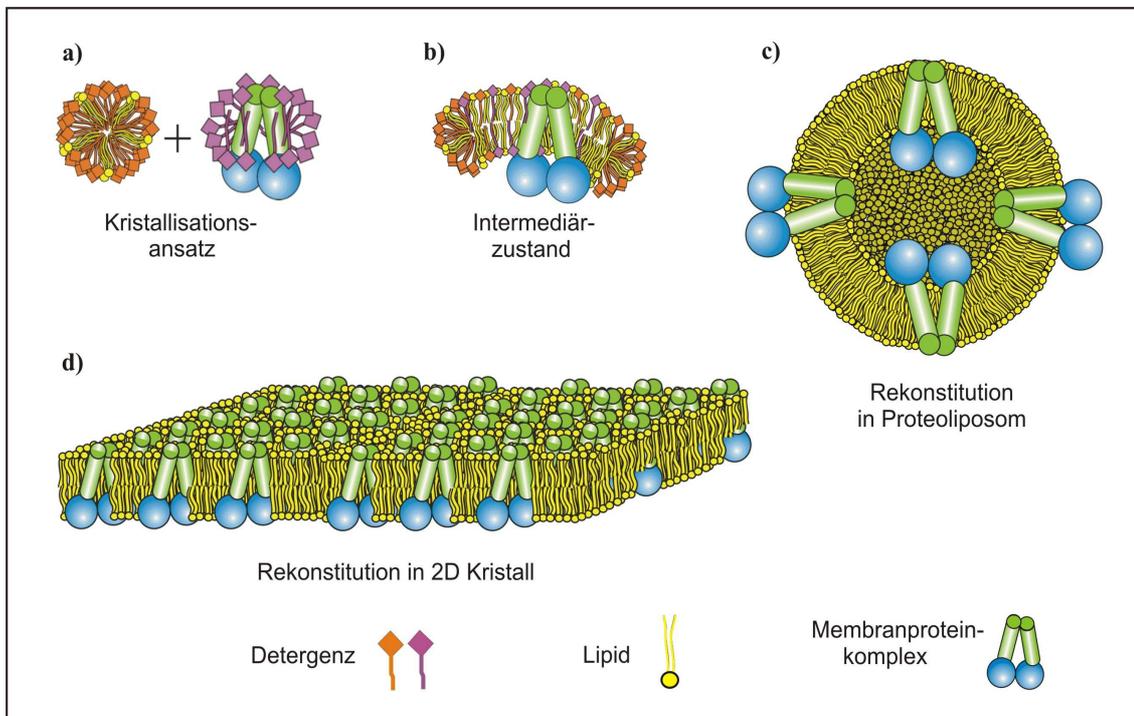


Abbildung 25 Schematische Darstellung der 2D-Kristallisation und Rekonstitution von Membranproteinen in Lipidmoleküle. Dieses Modell stellt neben dem Ablauf der 2D-Kristallisation und der Rekonstitution von Proteinen in Proteoliposomen auch die unterschiedlichen erhaltenen Ergebnisse dar. **a)** Lipid-Protein-Detergenz-Gemisch zu Beginn der Rekonstitution bzw. Kristallisation. **b)** Intermediärzustand bestehend aus Lipiden, Membranproteinen und Detergenzmolekülen. Nach der Entfernung des Detergenz aus dem Ansatz entstehen verschiedene Strukturen: **c)** Bei einem hohen Lipid-zu-Protein-Verhältnis werden die Membranproteine ungerichtet in Proteoliposomen rekonstituiert - besonders geeignet für funktionelle Messungen. **d)** Bei einem ausreichend niedrigem Lipid-zu-Protein-Verhältnis können 2D-Kristalle der Membranproteine entstehen.

Der Einbau der Membranproteinkomplexe in die Lipidmembranen erfolgte lediglich unter sehr wenigen Bedingungen in kristalliner, geordneter Weise. Die besten 2D-Kristalle des ABC-Transporters ArtMP, an deren Oberfläche die typischen gitternetzartigen Strukturen zu finden waren, wurden unter den in der Tabelle 8 aufgeführten Bedingungen erzeugt. Die Versuche zeigten, dass die Wahl der Lipide und

Tabelle 9 Bedingungen der 2D-Kristallisation von ArtMP im großen Maßstab mit und ohne ATP-Zugabe.

Parameter	ohne ATP	mit ATP
Eingesetzte Proteinmenge	18 mg	22 mg
Proteinkonzentration	2 mg/ml	2 mg/ml
Kristallisationspuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8 10 mM MgCl ₂ 300 mM NaCl 5 % Glycerol 0,01 % Azid	20 mM Tris/HCl, pH 8 300 mM NaCl 5 % Glycerol 10 mM ATP 0,1 mM EDTA 0,01 % Azid
Temperatur	14 Tage bei 20 °C	4 Wochen bei 20 °C
Lipid	extrahiert aus <i>G. stearothermophilus</i>	
LPR (w/w)	0,5	
Detergenzien - für Lipide	2 % OG	
- für ArtMP	0,4 % DM	

In dem Kristallisationsansatz ohne ATP lagern sich die Lipidmembranen, in denen ArtMP eingebaut war, zu vielschichtigen Membranstapeln zusammen (Abbildung 26a & b). Die Proteinkomplexe stehen rechtwinklig zu den Membranflächen, wobei die hydrophilen ATPase-Untereinheiten herausragen (Pfeil in Abbildung 26a & b). Ähnliche 2D-Kristalle wurden für eine Ca²⁺-ATPase beschrieben (Lacapère *et al.*, 1998). Die Stapelbildung der Membranen beruht vermutlich auf Interaktionen der herausragenden hydrophilen Untereinheiten ArtP der eingebauten ABC-Transportkomplexe (Lacapère *et al.*, 1998). Neben den stapelartigen Strukturen waren in dem Kristallisationsansatz nur vereinzelt Vesikel vorzufinden (Abbildung 26c). Die Größe dieser Lipidvesikel betrug im Durchschnitt 280 x 280 nm, die der Membranstapel über 580 nm (Abbildung 26b & c). An ihrer Oberfläche waren gitternetzartige Strukturen zu erkennen, die ein typisches Muster für eine kristalline Anordnung von Membranproteinen ist (Hasler *et al.*, Stokes & Lacapère, 1994; Lacapère *et al.*, 1998). Die Gitter bestehen aus in parallelen Reihen eingebauten Proteinkomplexen.

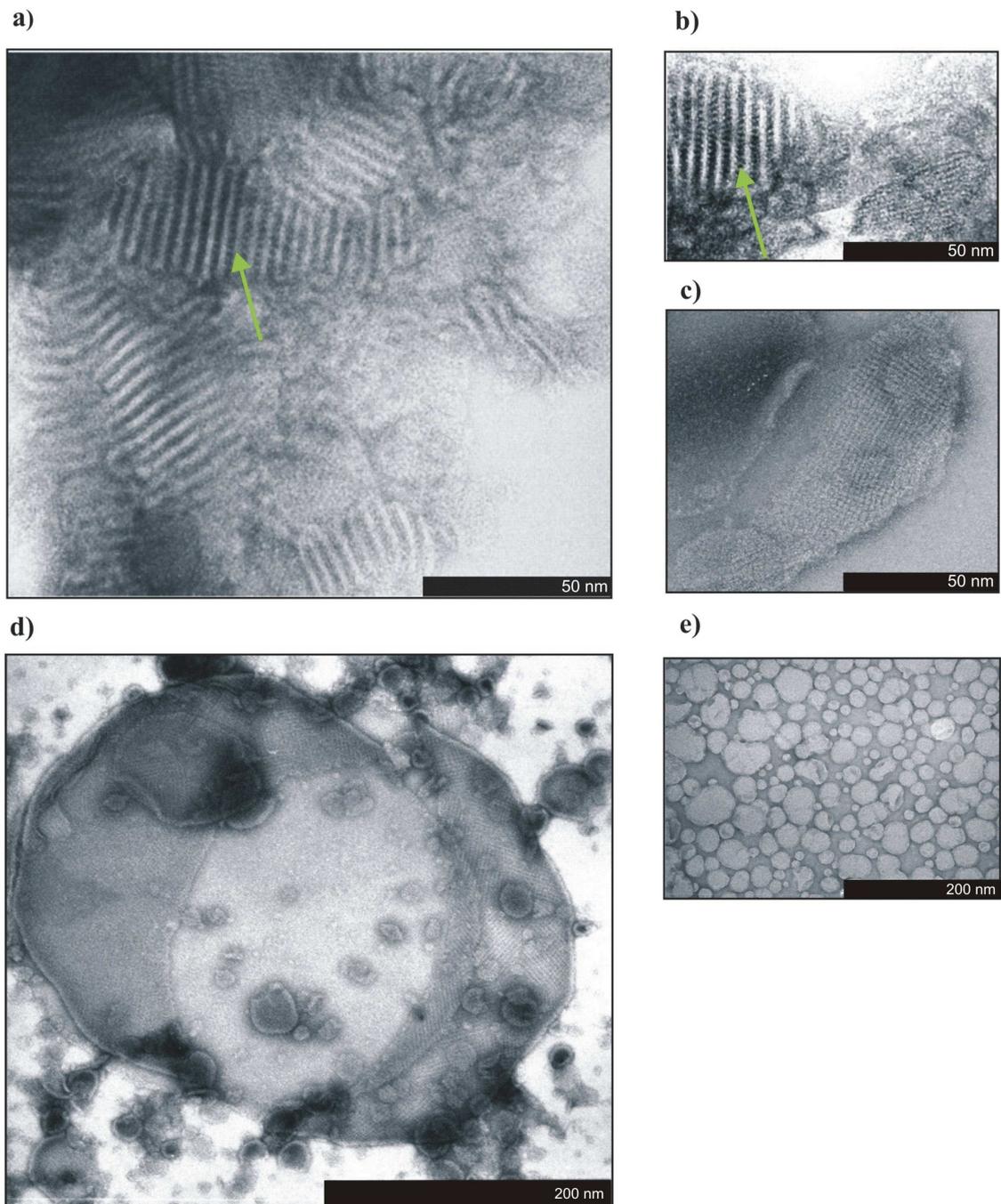


Abbildung 26 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von ArtMP-2D-Kristallen. Der ABC-Transporter wurde in extrahierte Lipide von *G. stearothersophilus* rekonstituiert und kristallisiert. **a - c)** ArtMP-2D-Kristalle erzeugt mit $MgCl_2$ /ohne ATP. **a & b)** 2D-Kristalle als vielschichtige, lamellenartige Membranstapel, die bis zu 650 nm groß waren. Zwischen den Membranen ragen die hydrophilen Untereinheiten des ABC-Transporters heraus, gekennzeichnet durch Pfeile. **b)** Nahaufnahme der multilamellaren Lipidschichten dicht gepackt mit ArtMP-Komplexen. **b & c)** Nahaufnahme der Gitternetz-Struktur. **d)** 2D-Kristalle von ArtMP erzeugt mit ATP/ohne $MgCl_2$ in Form von Vesikeln mit großen kristallinen Bereichen, die ca. 400 x 440 nm groß sind. **e)** Liposomen von *G. stearothersophilus* ohne ArtMP und ATP, ca. 10 – 50 nm groß.

Zur Präparation von zweidimensionalen Kristallen, in denen sich ArtMP im Nukleotid-gebundenen Zustand befand, enthielt der Kristallisationsansatz 10 mM ATP und 0,1 mM EDTA anstelle von MgCl₂. Die so erzeugten 2D-Kristalle zeigten eine deutlich andere Form als die, die ohne ATP-Zugabe kristallisiert wurden. Im Gegensatz zu den Membranstapeln der ArtMP-Kristallisation ohne ATP entstanden nun große Vesikel, in die ArtMP großflächig und kristallin eingebaut vorlag (Abbildung 26d). Die unterschiedliche Struktur der 2D-Kristalle aus den verschiedenen Kristallisationsansätzen wurde auf die Anwesenheit von ATP zurückgeführt. In der Literatur ist beschrieben, dass die Anwesenheit von Nukleotiden im Kristallisationsansatz die Ausbildung von vielschichtigen Membranstapeln bei einer 2D-Kristallisation verhindert (Strokes & Lacapère, 1994; Lacapère *et al.*, 1998). Der Einfluss der unterschiedlichen Dialysedauer, die bei der Kristallisation ohne ATP zwei Wochen und mit ATP vier Wochen betrug, wird als gering eingeschätzt, da sich die unterschiedliche Form der ArtMP-2D-Kristalle bereits nach vier Tagen der Kristallisation ausgebildet hatten.

In den verschiedenen Versuchsreihen wurden geeignete Bedingungen zur zweidimensionalen Kristallisation von ArtMP im Nukleotid-gebundenen und -ungebundenen Zustand gefunden. Es wurden unterschiedliche Formen von ArtMP-2D-Kristallen erzeugt: vielschichtige Membranstapel ohne ATP und Lipidvesikel, an deren Oberfläche der Proteinkomplex großflächig kristallin eingebaut war, mit Nukleotid im Kristallisationsansatz. Die besten zweidimensionalen Kristalle von ArtMP, in Bezug auf Form, Ausprägung und Ausmaß der gitternetzartigen, kristallinen Anordnung der Proteinkomplexe, wurden in Gegenwart von ATP erzeugt.

3.4.2 Dreidimensionale Kristallisation von ArtP

Für die Untersuchung von ArtP mittels Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie wurde das lösliche ABC-Protein kristallisiert. Die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Katja Fälber und Dr. Yvette Roske (AG Prof. U. Heinemann, MDC-Berlin) durchgeführt. Für die Kristallisationsexperimente war ArtP von höchster Reinheit nötig, so dass zur Reinigung des Proteins nach der Metall-Affinitätschromatographie zusätzlich eine Gelfiltration durchgeführt wurde. Zur Kristallisation wurde ArtP auf einen für das ABC-Protein spezifischen Höchstwert von 28 mg/ml konzentriert. Die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen wurde mit Dampfdiffusionsexperimenten nach

der Methode des sitzenden Tropfens in 96er Mikrotiterplatten bei 16 °C durchgeführt. Unter mehreren Bedingungen bildete ArtP nadel- oder plättchenförmige Kristalle. Die größten dreidimensionalen Kristalle wurden in einer Reservoirolösung erzeugt, die entweder 25 % PEG 3350 oder 27 % PEG 3350; 0,1 M Bis-Tris, pH 6 und 2 % Glycerol enthielt. In Tabelle 10 sind die während der Versuchsreihe zur 3D-Kristallisation von ArtP optimierten Bedingungen aufgeführt.

Tabelle 10 Bedingungen zur dreidimensionalen Kristallisation von ArtP im kleinen Maßstab.

Parameter	Bedingungen
Reservoirolösung	25 % PEG 3350 oder 27 % PEG 3350 0,1 M Bis-Tris, pH 6 2 % Glycerol
Temperatur	7 Tage bei 20 °C anschließend 11 – 14 Tage bei 16 °C
Proteinkonzentration	28 mg/ml in 20 mM Tris/HCl, pH 8; 5 % Glycerol
Protein : Reservoir	1 : 1
Tropfenvolumen	1 µl

Die Bildung von Kristallen wurde erstmals nach 7 Tagen beobachtet und wurde nach weiteren 14 Tagen Wachstum beendet. Die während dieses Zeitraums entstandenen 3D-Kristalle von ArtP zeigt Abbildung 27.

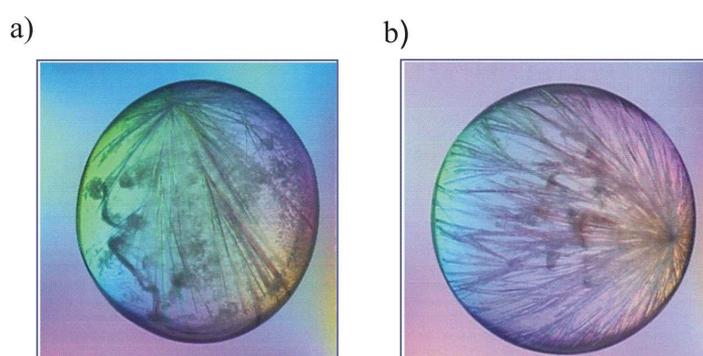


Abbildung 27 Dreidimensionale Kristalle von ArtP erzeugt mit a) 25 % PEG 3350, b) 27 % PEG 3350 im Kristallisationspuffer.

Für die Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie wurde die 3D-Kristallisation von ArtP im großen Maßstab wiederholt, in der jeweils 16 bzw. 30 mg des Proteins in einem Ansatz kristallisiert wurden. Analog zur 2D-Kristallisation von ArtMP wurde das ABC-

Protein ebenfalls im Nukleotid-gebundenen und -ungebundenen Zustand, erzeugt, indem die Kristallisation des ArtP-Proteins mit und ohne ATP-Zugabe erfolgte (Tabelle 11).

Tabelle 11 Kristallisationsbedingungen zur Erzeugung von ArtP-Kristallen im großen Maßstab, im Nukleotid-gebundenen und -ungebundenen Zustand.

Parameter	ohne ATP	mit ATP
Eingesetzte Proteinmenge	16 mg	30 mg
Proteinkonzentration	28 mg/ml in 20 mM Tris/HCl, pH 8; 5 % Glycerol	
Kristallisationspuffer	25 % PEG 3350 0,1 M Bis-Tris, pH 6 2 % Glycerol	25 % PEG 3350 0,1 M Bis-Tris, pH 6 2 % Glycerol 10 mM ATP 0,1 mM EDTA
Temperatur	7 Tage bei 20 °C anschließend 14 Tage bei 16 °C	
Protein : Reservoir	1 : 100	1 : 50
Tropfenvolumen	500 µl	2 x 600 µl

Die Form der erhaltenen ArtP-Kristalle beider Präparationen war nadel- und büschelartig, wie in den Ansätzen kleinen Maßstabs. Die aus der Kristallisation mit ATP erhaltenen Kristalle von ArtP zeigt Abbildung 28.

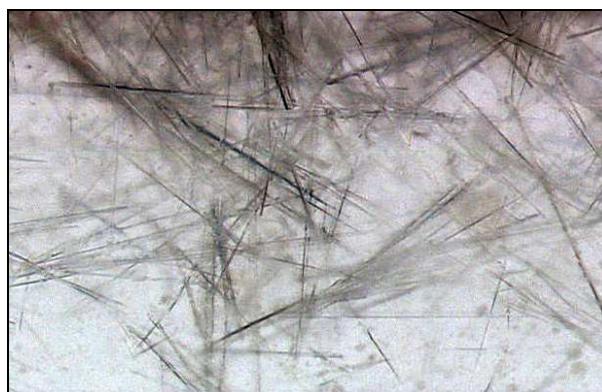


Abbildung 28 Kristalle von ArtP im Nukleotid-gebundenen Zustand, erzeugt in einem Kristallisationsansatz mit ATP.

Die Kristalle waren im Kristallisationspuffer bei 4 °C über mindestens 7 Tage stabil und haltbar. Ein NMR-Spektrum, das von diesen gelagerten ArtP-3D-Kristallen aufgenommen wurde, war gut aufgelöst. Allerdings waren die Kristalle nach der Überführung in den NMR-Rotor und der Entfernung des Puffers empfindlicher gegenüber Einwirkungen während der NMR-Messung, wie beispielsweise erhöhte Temperaturen im Spektrometer.

3.5 Festkörper-MAS-NMR an ArtMP und ArtP

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der MAS-NMR-Untersuchungen erläutert, die an den 2D-Kristallen des ABC-Transporters ArtMP und an den 3D-Kristallen des isolierten ArtP durchgeführt wurden. Der 2D-kristallisierte Komplex lag während der Festkörper-MAS-NMR-spektroskopischen Messungen rekonstituiert in seiner natürlichen Lipidumgebung vor. Die Aufnahme von MAS-NMR-Spektren der ArtP-3D-Kristalle diente nicht nur der strukturellen Untersuchung des separaten ABC-Proteins, sondern ermöglichte zusammen mit den Spektren von ArtMP auch, Erkenntnisse zu den Membranproteinen des Komplexes zu erhalten. Die NMR-Messungen an den ArtP-3D-Kristallen wiesen mögliche Unterschiede zwischen der Struktur des separaten Proteins in 3D-Kristallen und des ArtP, das im Komplex mit den Membranproteinen ArtM vorliegt, auf.

Beide NMR-Proben, das isolierte ArtP und der Transporter, lagen für die NMR-Messungen Nukleotid-gebunden und Nukleotid-ungebunden vor. Zur Untersuchung der unterschiedlichen Konformationen von ArtP und ArtMP mit der Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie wurden selektiv einzelne Aminosäuren Isotopen-markiert, die so als Monitore strukturelle Veränderungen in den Proteinen anzeigen. Im Folgenden ist die Strategie zur selektiven Markierung von ArtMP und ArtP mit den uniform ^{13}C -, ^{15}N -markierten Aminosäuren Prolin, Tyrosin und Threonin erläutert. Anschließend werden zuerst die Ergebnisse der NMR-Untersuchung an ArtP im ATP-freien und -gebundenen Zustand dargestellt, da in diesen NMR-Spektren die ersten Aminosäure-Paare sequenzspezifisch identifiziert wurden. Anschließend werden die Spektren des ABC-Transporters, ebenfalls Nukleotid-gebunden und -ungebunden, gezeigt und eingehend erläutert.

3.5.1 Markierungsstrategie für ArtMP und ArtP

Für die MAS-NMR-Experimente wurden in den Proteinen selektiv einzelne Aminosäuren ^{13}C -, ^{15}N -markiert. Da mit diesen NMR-Messungen die konformationellen Auswirkungen der Nukleotid-Bindung an ArtMP und ArtP untersucht werden sollte, wurden für die selektive Isotopen-Markierung solche Aminosäuren ausgewählt, die sich in der Sequenz von ArtP im Bereich der konservierten Motive befinden, welche die ATP-Bindestelle bilden oder auf andere Art für den Transportmechanismus von Bedeutung sind. In ArtMP und ArtP wurden die Aminosäuren Prolin, Tyrosin und Threonin mit ^{13}C -, ^{15}N -markiert, die so als Monitore zur Beobachtung möglicher konformationeller Änderungen innerhalb der untersuchten Proteine dienen. Zusätzlich ergaben sich unter diesen Aminosäuren Paarungen, die sich sequentiell zuordnen lassen. Da Prolin, Tyrosin und Threonin in der jeweiligen Proteinsequenz relativ selten vorkommen, war anzunehmen, dass die entsprechenden Signalsätze in den NMR-Spektren gut zu identifizieren sind.

In der Sequenz des ABC-Transporters ArtMP sind 20 Proline enthalten, 10 davon in ArtP. Von den insgesamt 14 Tyrosinen sind nur zwei in der Sequenz von ArtP lokalisiert. Ein Tyrosin, Tyr₁₃₃, befindet in der Sequenz von ArtP einer Region, die an der Nukleotid-Bindung beteiligt ist: zwischen dem Walker A- und Walker B-Motiv sowie nahe der hoch konservierten Signatursequenz (Fetsch & Davidson, 2002; Abbildung 29).

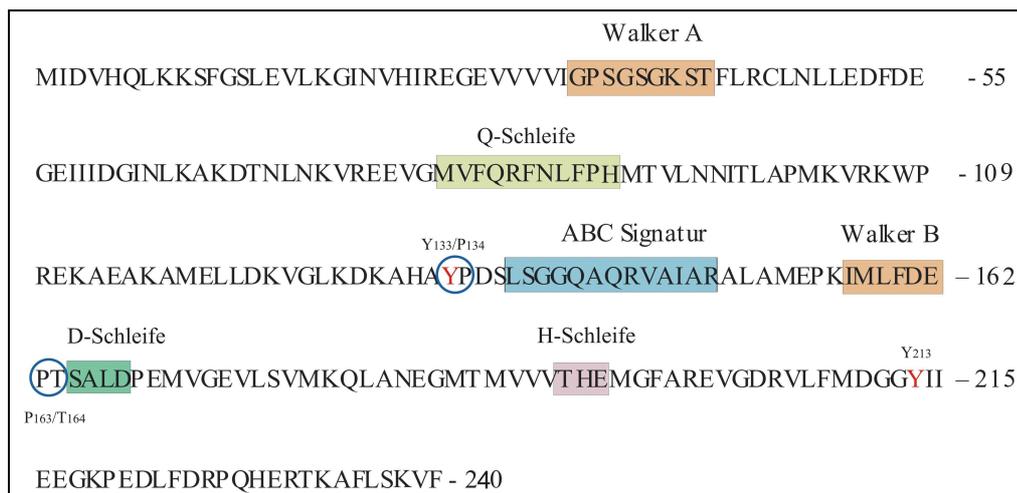


Abbildung 29 Sequenz von ArtP mit Kennzeichnung des Tyrosin-133/Prolin-134- und des Prolin-163/Threonin-164-Paares. Bedeutende konservierte Sequenzmotive wurden durch Rahmen hervorgehoben und benannt. Die Paarungen wurden mit einem blauen Kreis gekennzeichnet. Die beiden Tyrosinreste Tyr₁₃₃ und Tyr₂₁₃ sind rot hervorgehoben.

Tyrosin-133 bildet zusammen mit Prolin-134 eines der Isotopen-markierten Aminosäure-Paare in ArtP. Das zweite Tyrosin der ArtP-Sequenz, Tyr₂₁₃, befindet sich hinter der H-Schleife, die an Konformationsänderungen während der ATP-Hydrolyse beteiligt ist (Mourez *et al.*, 1997; Schneider & Hunke, 1998). In ArtM befinden sich zwei weitere Prolin-Tyrosin-Paare: laut der Strukturvorhersagen ein Paar auf der extrazellulären und eines auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Der Komplex ArtMP enthält 15 Threonine, sieben in ArtM und acht in ArtP. Threonin-164 bildet mit Prolin-163 ein weiteres ¹³C-, ¹⁵N-markiertes Aminosäure-Paar, das sich in der ArtP-Sequenz zwischen der Walker B-Region und der D-Schleife befindet (Abbildung 29).

3.5.2 MAS-NMR-Spektroskopie am ABC-Protein ArtP

- **ArtP-PY 3D-Kristalle – im Nukleotid-ungebundenen Zustand**

ArtP, markiert mit uniform ¹³C-, ¹⁵N-Prolin und -Tyrosin (ArtP-PY), wurde ohne Nukleotid-Zugabe dreidimensional kristallisiert (siehe 2.13.3). Von diesen 3D-Kristallen wurde eine ¹³C-¹³C-Korrelation aufgenommen, die auf *proton-driven spin diffusion* (PDS; Szeverenyi *et al.*, 1982) basierte (Abbildung 30). Das PDS-Spektrum der ArtP-Kristalle zeigt eine gute Auflösung der einzelnen Signale. Es sind deutlich die erwarteten Signalsätze der 10 Proline zu erkennen. Bei 55 ppm und 36 bzw. 40 ppm erscheinen die Signale der beiden einzigen Tyrosinreste, die in der Sequenz des ABC-Proteins vorkommen.

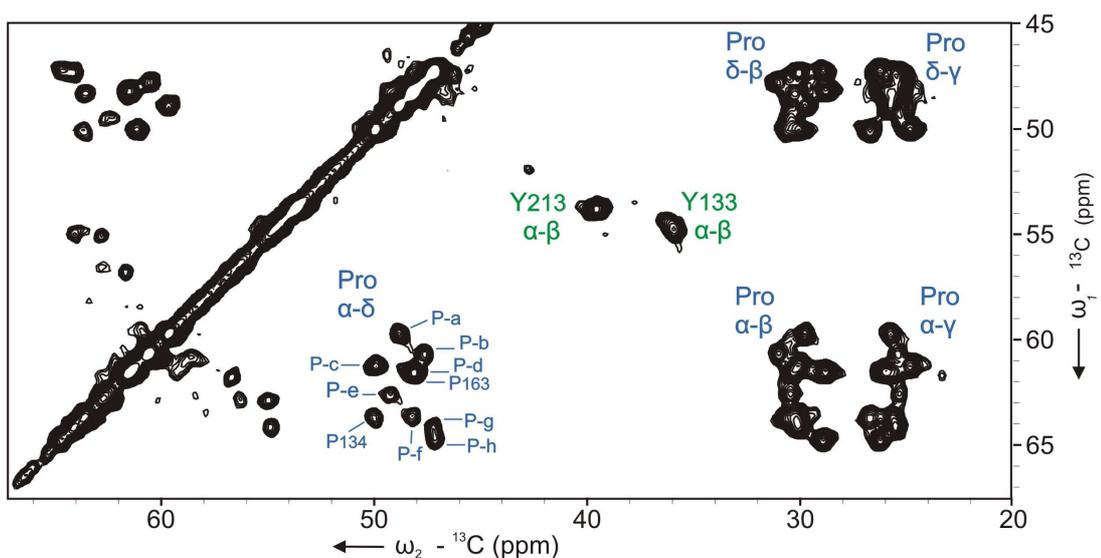


Abbildung 30 PDS-Spektrum von dreidimensionalen ArtP-PY-Kristallen ohne ATP bei 900 MHz, 285 K und einer Mischzeit von 20 ms. Die Bezeichnung der Prolinsignale ergibt sich aus der Tabelle 12.

Im PDS-D-Spektrum, das mit einer Mischzeit von 20 ms aufgenommen wurde, sind bei 55/65 ppm Kreuzsignale zu erkennen, die weder Prolin noch Tyrosin zugeordnet werden können. Aufgrund der chemischen Verschiebung ist davon auszugehen, dass es sich um Signale der Aminosäure Serin handelt. Das Auftreten dieser Signale ist durch eine teilweise Verstoffwechslung des markierten Prolins und Tyrosins zu erklären.

Von den ArtP-PY 3D-Kristallen wurde anschließend ein ^{13}C - ^{15}N *rotational echo double resonance* (REDOR)-Spektrum aufgenommen (Abbildung 31). Anhand dieser Messung wurde in Kombination mit dem 20 ms PDS-D-Spektrum das einzige Tyrosin/Prolin-Paar in der ArtP-Sequenz sequentiell dem Tyrosinrest-133 und dem Prolinrest-134 zugeordnet.

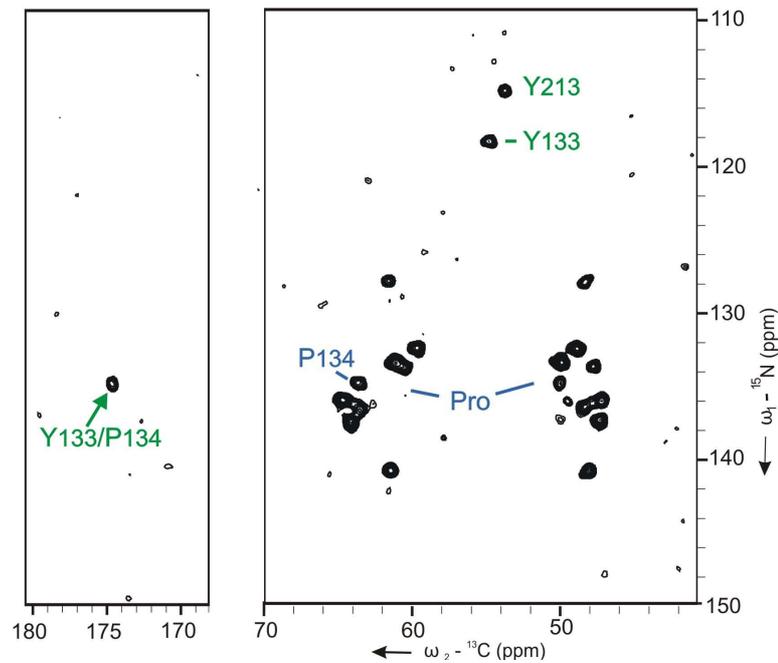


Abbildung 31 REDOR-Spektrum von dreidimensionalen ArtP-PY-Kristallen ohne ATP bei 900 MHz, 285 K.

- **ArtP-TYP 3D-Kristalle – im Nukleotid-gebundenen Zustand**

In der Präparation von ArtP im Nukleotid-gebundenen Zustand wurde zusätzlich zu Prolin und Tyrosin die Aminosäure Threonin uniform ^{13}C -, ^{15}N -markiert (ArtP-TYP) und in Gegenwart von ATP kristallisiert (siehe 3.5.1 und 2.13.3). Die von den ArtP-TYP-Kristallen aufgenommenen PDS-D-Spektren (PDS-D mit 20 ms Mischzeit in Abbildung 32) besaßen eine gute Signalauflösung. Im Spektrum sind die erwarteten

10 Prolinsignale deutlich zu erkennen. Auch die Signalmuster von sechs der acht Threoninreste sind zu finden. Es wurden wie im ArtP-PY-Spektrum zwei Kreuzsignale für die Tyrosine-133 und -213 erwartet. Interessanterweise sind in dem Spektrum von ArtP-TYP drei Tyrosin-Signalsätze zu erkennen. Das Kreuzsignal bei 55/42 ppm (ω_1/ω_2), das Tyrosin-213 (Y213) zugeordnet wurde, ist in dem ArtP-TYP-Spektrum aufgespalten. Austauschsignale nahe der Diagonale bei 54/52 ppm (ω_1/ω_2) und 54/54 ppm (ω_1/ω_2) zeigen, dass das zusätzliche Signal bei 52/40 ppm ebenfalls dem Tyrosin-213 zugeordnet werden kann (Y'213, Abbildung 32). Die Intensitäten der Tyrosin-Signale Y213 und Y'213 sind ähnlich. Zusammen mit den Austauschsignalen ergibt sich daraus, dass ArtP in den 3D-Kristallen der NMR-Probe zwischen zwei verschiedenen Zuständen wechselte. Die ähnliche Intensität der aufgespaltenen Kreuzsignale von Tyrosin-213 deutet darauf hin, dass beide Zustände der Proteine gleich häufig in den 3D-Kristallen vorlagen.

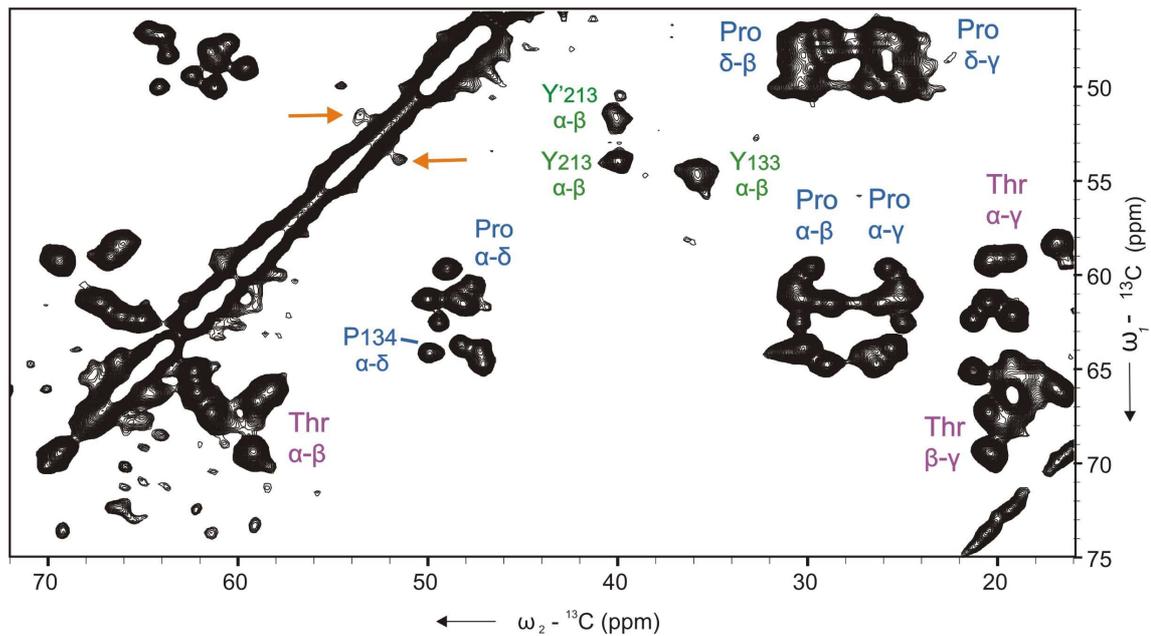


Abbildung 32 PDS-D-Spektrum von dreidimensionalen ArtP-TYP-Kristallen, im Nukleotid-gebundenen Zustand. Die sequentiell zugeordneten Tyrosinsignale Y213, Y'213 und Y133, sowie das Prolinsignal-134 sind gekennzeichnet. Die Austauschsignale nahe der Diagonalen sind durch Pfeile markiert. Das Spektrum wurde von ca. 18 mg ArtP-TYP Kristallen bei 900 MHz, Rotationsfrequenz 12 kHz, 275 K und einer Mischzeit von 20 ms aufgenommen.

Der Vergleich der Spektren von ArtP-PY ohne ATP und von ArtP-TYP mit ATP (Abbildung 33) zeigt, dass in dem Spektrum der 3D-Kristalle im Nukleotid-gebundenen Zustand die Signale von Tyrosin-213 (34/40 ppm) und -133 (55/36 ppm) in unterschiedlicher Richtung leicht verschoben sind, Y213 nach links und Y133 nach rechts. Neben den Tyrosinsignalen ist der Prolinrest-134 ebenfalls deutlich verschoben. Die Signalveränderungen, zusammen mit dem Auftreten der Austauschsignale und des aufgespaltenen Tyrosin-213-Signals bilden die unterschiedlichen Konformationen des ABC-Proteins im ATP-freien (ArtP-PY) und Nukleotid-gebundenen Zustand (ArtP-TYP) ab. Ob in beiden Proben verschiedene Kristallkontakte vorlagen, worauf die Konformationsunterschiede ebenfalls zurück zuführen sein könnten, ist aufgrund dieser NMR-Daten nicht zu klären.

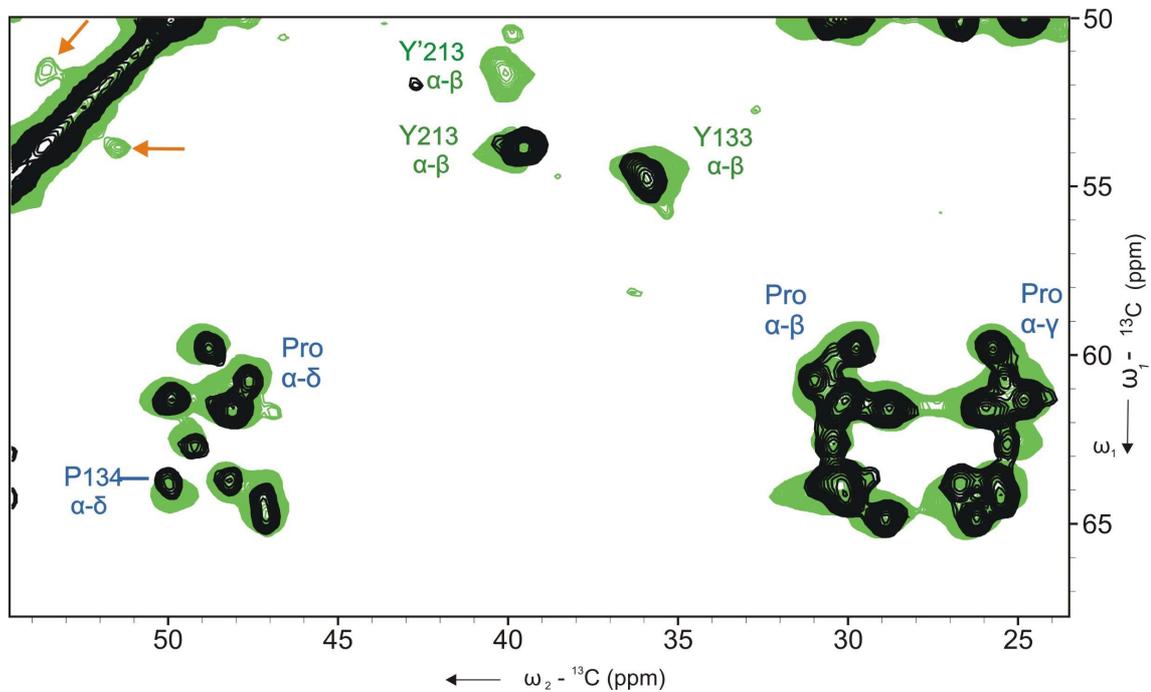


Abbildung 33 PDS-D-Spektren von ArtP-PY ohne ATP (schwarz) und ArtP-TYP mit ATP (grün). Die Spektren wurden bei 900 MHz, einer Rotationsfrequenz von 12 kHz und einer Mischzeit von 20 ms aufgenommen. Die Austauschsignale nahe der Diagonalen sind durch orange-farbige Pfeile gekennzeichnet.

In Tabelle 12 sind die chemischen Verschiebungen der Prolin-, Tyrosin- und Threoninsignale von ArtP-PY ohne ATP und ArtP-TYP mit ATP aufgelistet. Die Werte der C α - bzw. C β -chemischen Verschiebung des zugeordneten Prolins-134, des Tyrosin-213 und -133 sowie eines nicht sequentiell zugeordneten Prolins haben sich geändert, wahrscheinlich aufgrund der Nukleotid-Bindung.

Tabelle 12 Chemische Verschiebung von Prolin, Tyrosin und Threonin in den Kristallen ArtP-PY und ArtP-TYP sind in ppm angegeben. Die Beschriftung der Signale der Prolin- und Threoninreste erfolgte mit a bis h bzw. e aufgrund der fehlenden sequentiellen Zuordnung der Aminosäuren. Veränderungen der chemischen Verschiebung von mehr als 0,4 ppm sind fett gekennzeichnet.

Amino-säurereste	ArtP mit ATP kristallisiert						ArtP ohne ATP kristallisiert					
	Chemische Verschiebung in ppm						Chemische Verschiebung in ppm					
	N	CO	C α	C β	C γ	C δ	N	CO	C α	C β	C γ	C δ
Y133	118,5	175,2	54,6	35,8			118,3	174,8	54,8	36,0		
Y213	114,0	174,3	54,0	40,0			114,4	174,4	53,8	39,6		
Y'213			51,7	40,1								
P134	135,0	175,1	64,2	30,8	26,8	49,9	134,8	174,8	63,7	30,6	26,8	50,1
P163	127,7	176,6	61,4	30,5	25,9	48,5	127,8	176,8	61,5	30,3	26,0	48,3
P-a		174,6	59,7	29,8	25,8	48,9	132,4	174,9	59,7	29,8	25,8	48,9
P-b		176,2	60,6	30,6	25,2	47,7	133,7	176,0	60,6	31,0	25,4	47,7
P-c		173,9	61,3	30,3	25,0	50,0	133,4	173,9	61,2	30,1	24,9	49,9
P-d	140,4	176,1	61,5	28,8		48,0	140,7	176,1	61,5	28,8	25,7	48,1
P-e			62,5	30,4	25,0	49,4	136,1	174,5	62,6	30,4	25,3	49,4
P-f		177,0	63,8			48,3	136,5	176,9	63,6	30,3	25,6	48,3
P-g		174,5	64,0			47,3	137,3	174,4	64,2	30,1	25,5	47,3
P-h		176,9	64,8	29,0	26,3	47,1	136,0	176,8	64,7	29,0	26,2	47,2
T164		173,7	59,0	66,8	19,2							
T-a	119,0	168,9	58,3	66,1	16,9							
T-b		175,9	59,2	69,4	20,4							
T-c	107,2	173,3	61,4	67,3	20,5							
T-d		172,6	62,1	66,2	19,2							
T-e		175,0	62,3	65,1	21,3							

Abbildung 34 zeigt ein PDS-D-Spektrum der ArtP-TYP-Probe, das mit einer Mischzeit von 400 ms aufgenommen wurde. Die α - $C\beta$ -Signale des Tyrosins sind im Vergleich zum Spektrum mit 20 ms Mischzeit schwächer und im Gegensatz zu den Prolin- und Threoninsignalen deutlich relaxiert. Diese schnelle Relaxation wird durch die aromatische Seitenkette der Tyrosinreste verursacht. Die Austauschsignale an der Diagonalen fehlen. Hingegen wurde zusammen mit der Auswertung des REDOR-Spektrums (nicht gezeigt) ein Prolin/Threonin-Paar sequentiell dem Aminosäure-Paar Prolin-163/Threonin-164 zugeordnet, deren Kreuzsignale neben den des bereits identifizierten Aminosäure-Paars Tyrosin-133/Prolin-134 deutlich hervortraten (Abbildung 34).

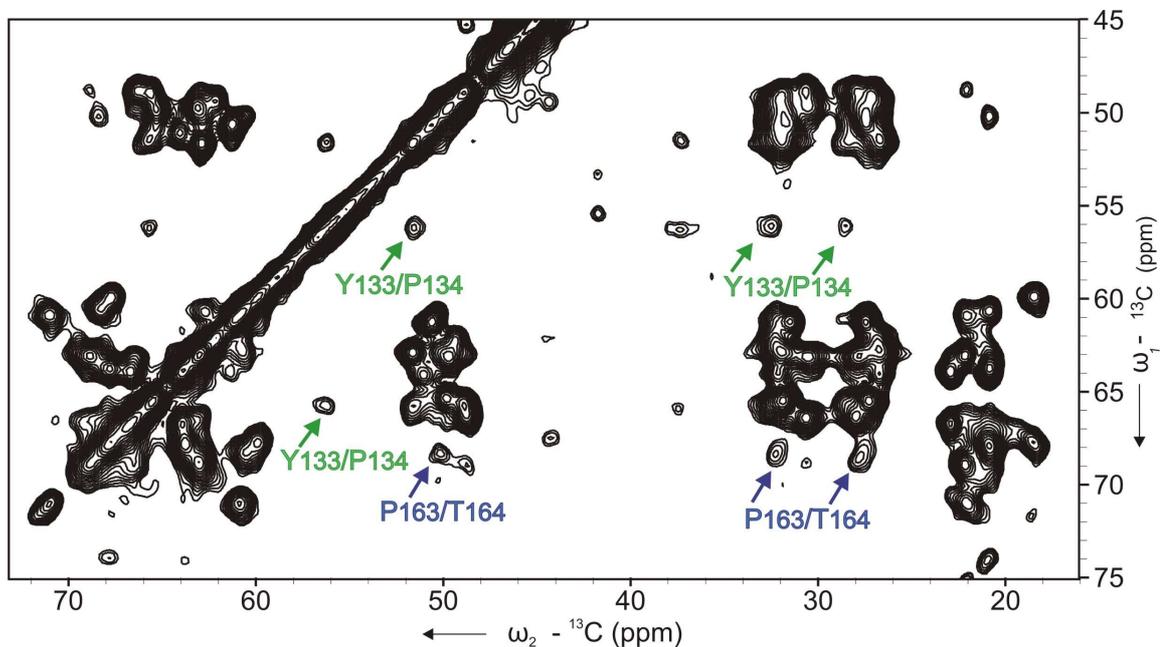


Abbildung 34 PDS-D-Spektrum von ArtP-TYP aufgenommen mit 400 ms Mischzeit. Das Spektrum wurde bei 900 MHz, einer Rotationsfrequenz 12 kHz und 275 K aufgenommen. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden lediglich die Kreuzsignale der identifizierten Aminosäure-Paare - Prolin-163/Threonin-164-Paar in blau und das bereits in dem ArtP-PY Spektrum zugeordnete Tyrosin-133/Prolin-134-Paar in grün gekennzeichnet.

Die NMR-Messungen an 3D-Kristallen von ArtP-PY ohne ATP und ArtP-TYP mit ATP lieferten hochaufgelöste Festkörper-NMR-Spektren, die die sequentielle Zuordnung zweier Aminosäurepaare ermöglichten und Veränderungen zeigten, die auf Konformationsänderungen im Protein durch die Bindung des Nukleotids ADP oder ATP hindeuten.

3.5.3 MAS-NMR-Untersuchungen an dem ABC-Transporter ArtMP

- **ArtMP-PY – in 2D Kristallen ohne ATP**

Der ABC-Transporter ArtMP wurde analog zu ArtP in zwei verschiedenen Formen präpariert: a) selektiv markiert mit ^{13}C -, ^{15}N -Prolin und -Tyrosin, kristallisiert ohne ATP-Zugabe (ArtMP-PY) und b) zusätzlich zu ^{13}C -, ^{15}N -Prolin und -Tyrosin markiert mit ^{13}C -, ^{15}N -Threonin in Gegenwart von ATP (ArtMP-TYP).

Bedingt durch die größere Anzahl an markierten Aminosäuren im Komplex verglichen mit ArtP erhöht sich die Zahl von Kreuzsignalen im Spektrum. Dies führt zu einem stärkeren Überlagern der Signale im PDS-D-Spektrum von ArtMP-PY (Abbildung 35). Die spektrale Auflösung in dem ArtMP-PY-Spektrum ist im Vergleich zu den Spektren von ArtMP-TYP und ArtP geringer. Das bereits zuvor in den ArtP-Spektren zugeordnete $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ -Signal des Tyrosin-213 wurde durch Spektrenüberlagerung ebenfalls in dem ArtMP-PY-Spektrum identifiziert.

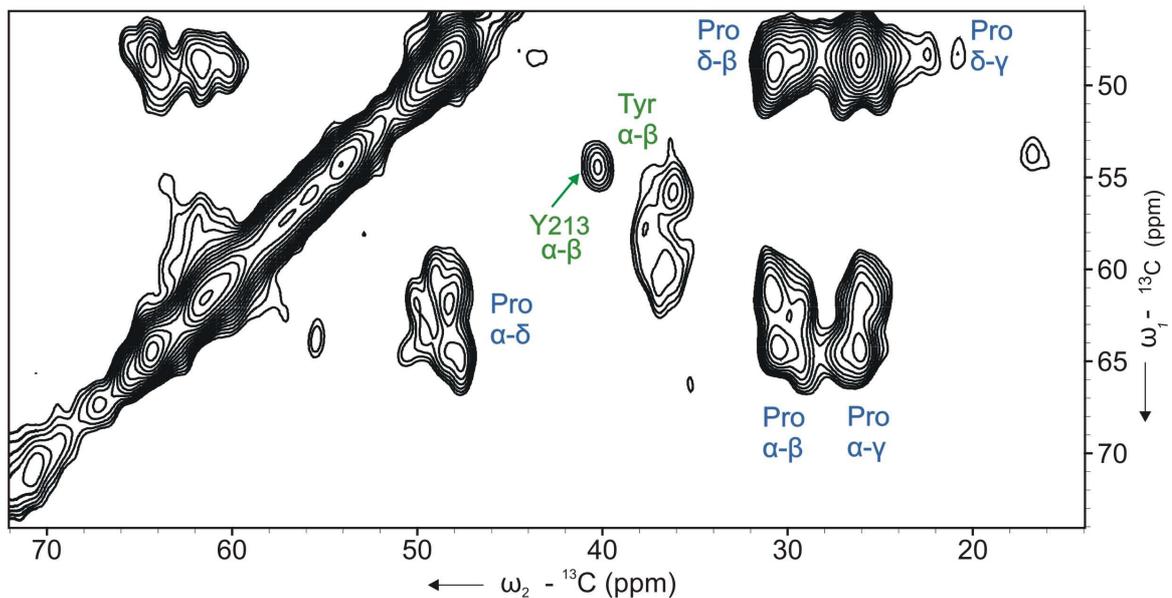


Abbildung 35 PDS-D-Spektrum des ABC-Transporters ArtMP-PY, zweidimensional kristallisiert ohne ATP. Das zugeordnete Tyrosin-213-Signal ist gekennzeichnet. Das Spektrum wurde bei 600 MHz, 285 K, einer Rotationsfrequenz von 10 kHz und mit einer Mischzeit von 20 ms aufgenommen.

- **ArtMP-TYP - mit ATP zweidimensional kristallisiert**

Von den 2D-Kristallen ArtMP-TYP (ca. 15 mg), kristallisiert unter Zugabe von ATP, wurde ein PDS-D-Spektrum aufgenommen (Abbildung 36). Die Signale der selektiv markierten Aminosäuren sind im Spektrum deutlich erkennbar und gut aufgelöst. Im Vergleich zum Spektrum von ArtMP-PY präpariert ohne ATP ist die Signalauflösung im ArtMP-TYP-Spektrum besser. Dieser Unterschied ist möglicherweise auf die unterschiedliche Struktur der 2D-Kristalle des Komplexes mit und ohne ATP zurückzuführen. Die Qualität der ArtMP-TYP-Spektren war mit den Spektren der ArtP-Probe vergleichbar. In den Spektren des ArtMP-TYP-Komplexes fällt auf, dass im Gegensatz zu den ArtP-TYP-Spektren weder eine Aufspaltung des Tyrosin-213-Signals noch Austauschsignale an der Diagonalen zu erkennen sind, obwohl beide NMR-Proben mit der gleichen Konzentration an ATP und EDTA kristallisiert wurden.

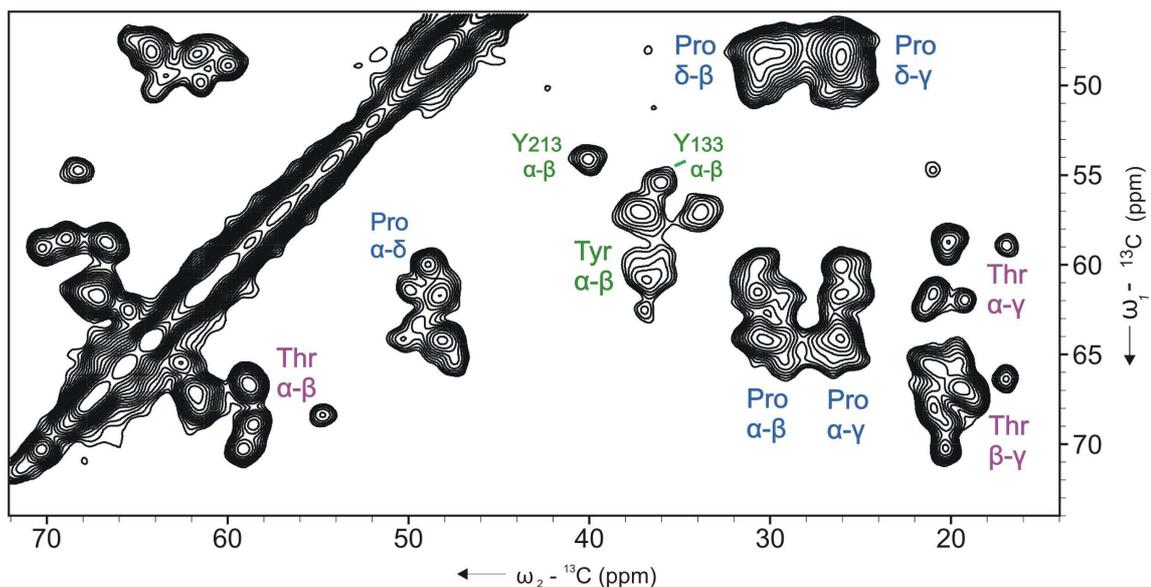


Abbildung 36 PDS-D-Spektrum von zweidimensionalen ArtMP-TYP-Kristallen, die unter ATP-Zugabe erzeugt wurden. Aufgenommen bei 600 MHz, einer Rotationsfrequenz von 12 kHz, 285 K und 20 ms Mischzeit.

In dem ArtMP-TYP-Spektrum (Abbildung 37 - schwarz) befinden sich die zum ABC-Protein gehörenden Tyrosinsignale in der Höhe von 54 ppm/39,5 ppm und 55 ppm/36 ppm (ω_1/ω_2), leicht verschoben zu den Signalen der Tyrosine im ArtP-TYP-Spektrum (Abbildung 37 - grün). Besonders die Lage des $C\alpha$ - $C\beta$ -Signals vom Tyrosin-133 ist im ArtMP-TYP-Spektrum im Vergleich zum Spektrum von ArtP-TYP deutlich verändert, ebenso wie einige der Prolinsignale. Demzufolge befinden sich einige

Bereiche des ArtP, das als NBD im Komplex vorkommt, vermutlich in einer anderen Konformation als im separat isolierten und 3D-kristallisierten ArtP. Da sich die übrigen Signale der markierten Aminosäuren in den verglichenen Spektren von ArtP-TYP und ArtMP-TYP stark ähneln, waren diese wahrscheinlich von den strukturellen Veränderungen nicht betroffen und die Konformationsänderungen auf bestimmte Regionen des ABC-Proteins eingegrenzt.

Durch den Vergleich der Spektren des ganzen ABC-Transporters mit den ArtP-Spektren konnten die Tyrosin-Kreuzsignale eindeutig den einzelnen Untereinheiten des ABC-Transporters zugeordnet werden (in Abbildung 37 durch Rahmen gekennzeichnet). Auf diese Art wurden an den integralen Membranproteinen des Proteinkomplexes indirekt MAS-NMR-Signale zugeordnet.

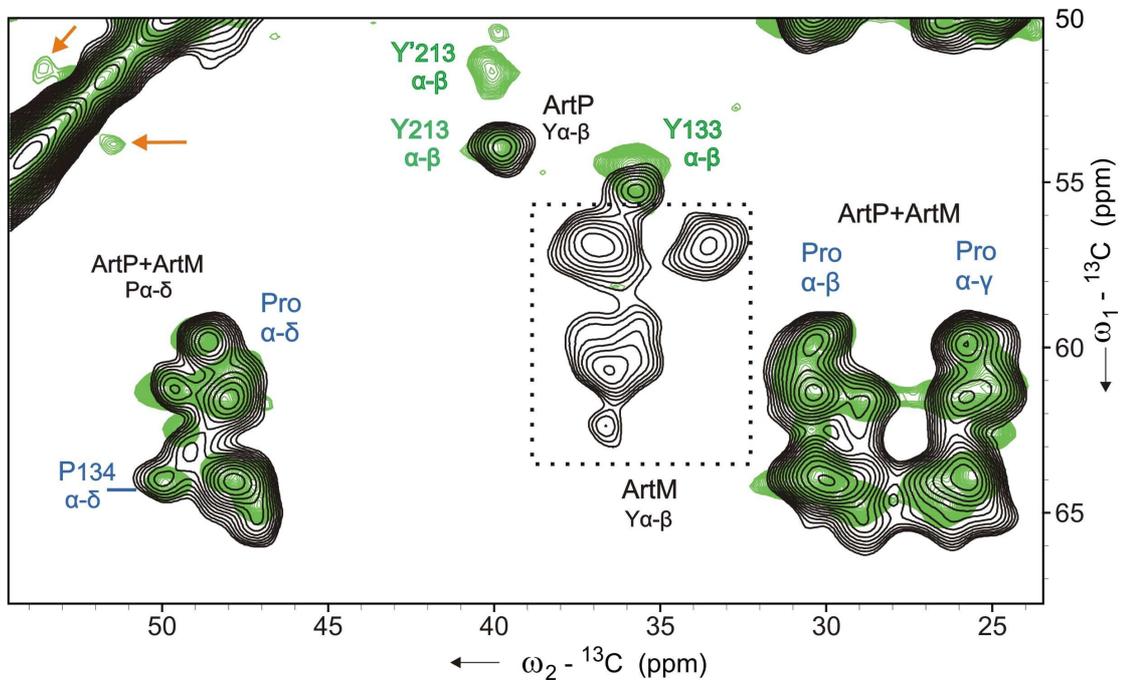


Abbildung 37 PDS-D-Spektren von ArtP-TYP (grün) und ArtMP-TYP (schwarz), beide Proben mit ATP kristallisiert. Die jeweiligen Kreuzsignale sowie die Austauschsignale im ArtP-TYP Spektrum sind bezeichnet bzw. mit Pfeilen gekennzeichnet. Mit dem gepunkteten Rahmen wurden die Tyrosinsignale der Membranproteine des ABC-Transporters gekennzeichnet.

3.5.4 Zusammenfassung der MAS-NMR-Messungen an ArtP und ArtMP

Von den selektiv ^{13}C -, ^{15}N -markierten ArtMP-2D-Kristallen und ArtP-3D-Kristallen wurden gut aufgelöste Festkörper-MAS-NMR-Spektren aufgenommen, die eine sequentielle Zuordnung einzelner Signalsätze ermöglichten. Die selektive Markierung einzelner Aminosäuren im ABC-Transporter und in ArtP war erfolgreich. Die NMR-Spektren, die von den verschiedenen 2D-Kristallen des Komplexes aufgenommen wurden, waren von unterschiedlicher Qualität. Die Auflösung in den Spektren der 2D-Kristalle, die aus großflächig einschichtigen Lipidvesikeln bestanden, war besser als die in den Spektren der ArtMP-PY-Kristalle, die aus lamellenartigen Membranstapeln bestanden. Zwei Aminosäure-Paare wurden in der Sequenz von ArtP zugeordnet: Tyrosin-133/Prolin-134 und Prolin-163/Threonin-164. ArtP lag in der NMR-Probe mit ATP in zwei verschiedenen Zuständen vor. Dies wurde durch die Austauschsignale und die Aufspaltung der Tyrosinsignale im Spektrum gezeigt.

3.6 Lösungs-NMR-Untersuchungen am Substrat-Bindeprotein ArtJ

Das Substrat-Bindeprotein ArtJ, das zum ABC-Transporter ArtMP aus *G. stearothermophilus* gehört, wurde in Lösung NMR-spektroskopisch analysiert. Es sollte der Einfluss verschiedener Substanzen und des ABC-Transporters auf das Bindeprotein untersucht werden. Mit einer Größe von 29,6 kDa befindet sich ArtJ noch im Empfindlichkeitsbereich dieser NMR-Methode. Vom ^{13}C -, ^{15}N -markierten Bindeprotein wurde eine Reihe von Triple-Resonanzspektren aufgenommen, deren Qualität jedoch nicht für eine sequentielle Zuordnung der ArtJ-Resonanzsignale ausreichte. An dem ^{15}N -markierten ArtJ wurden NMR-Experimente zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Protein und Substrat sowie zu den Membranproteinen des ABC-Transportkomplexes und des Einflusses der Nukleotid-Bindung an ArtMP durchgeführt.

3.6.1 NMR-Messung an ^{15}N -ArtJ ohne weitere Zusätze

Das erste Spektrum der Lösungs-NMR-Messreihe vom Bindeprotein wurde ohne Zusatz weiterer Komponenten aufgenommen (Abbildung 38). Die Resonanzen sind gut aufgelöst und zeigen für ein gefaltetes Protein typische chemische Verschiebungen. Es wurden 298 $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ Kreuzsignale erwartet, die sich aus den

Signalen der Amidbindungen und zusätzlich aus den Signalen der Seitenketten von Tryptophan, Histidin, Asparagin und Glutamin zusammensetzten. In dem 2D- ^1H - ^{15}N -Spektrum sind 241 Resonanz-Signale zu erkennen. Die Ursache dafür kann in einer Überlagerung der Signale, aber auch in der Mobilität des Proteins liegen.

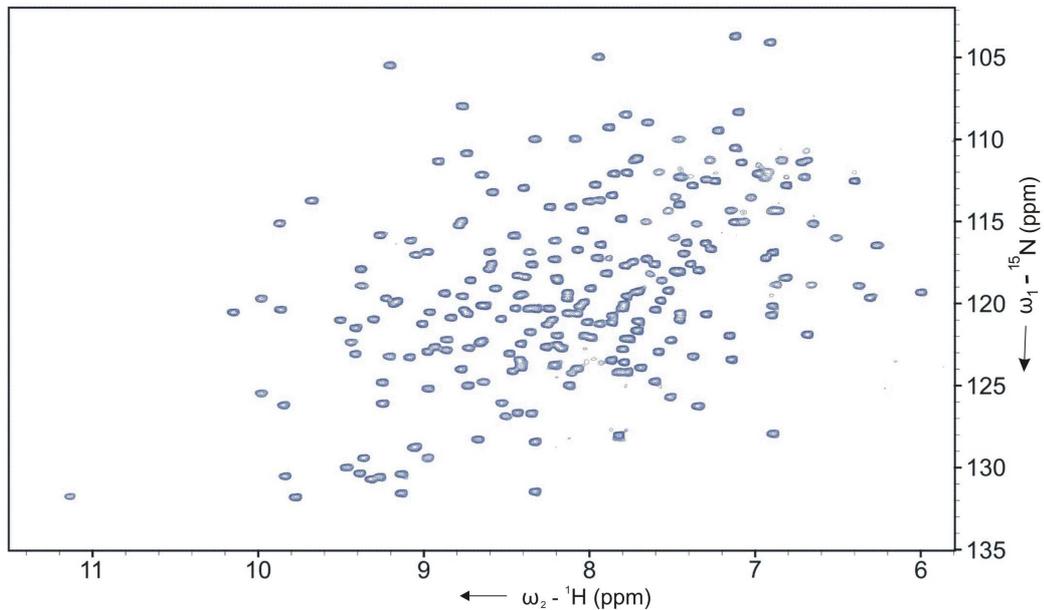


Abbildung 38 ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von ArtJ, aufgenommen an einem 900 MHz-Spektrometer bei 300 K.

3.6.2 NMR-Messung an ^{15}N -ArtJ nach Substrat-Zugabe

In einem ersten NMR-Experiment wurde zu der ArtJ-Probe Arginin hinzugefügt, dem gegenüber das Bindeprotein eine hohe Affinität besitzt. Erwartungsgemäß sollte ArtJ das zugegebene Arginin komplexieren, was mit Änderungen der Konformation des Proteins und somit der Signale im HSQC-Spektrum verbunden wäre. Jedoch bewirkte die Zugabe des Substrats keine Signaländerungen im Spektrum der ersten Präparation von ArtJ. Das erhaltene Spektrum war identisch zu dem, das ohne weitere Zusätze aufgenommen wurde (Abbildung 38). Eine Erklärung dafür ist, dass ArtJ bereits nach seiner Präparation aus *E. coli* im Substrat-beladenen Zustand vorlag. Zur Entfernung des möglicherweise gebundenen Liganden wurde ArtJ de- und renaturiert (Dipl.-Biol. V. Eckey, AG E. Schneider, Humboldt-Universität Berlin). Von diesem zurückgefalteten Protein wurden ebenfalls HSQC-Spektren mit und ohne Arginin-

Zugabe aufgenommen (Abbildung 39). Das Spektrum der rückgefalteten ArtJ-Probe mit zugegebenem Arginin ähnelt stark dem des unbehandelten Bindeproteins (Abbildung 38). Das Spektrum vom denaturierten ArtJ ohne Substrat-Zugabe hingegen zeigt deutliche Unterschiede. Die Verschiebung der Signale wird in der Überlagerung der HSQC-Spektren deutlich, die von dem rückgefalteten ArtJ mit (schwarz) und ohne (rot) Arginin-Zugabe aufgenommen wurden (Abbildung 39). Dem zu Folge hat das unbehandelte Bindeprotein bereits bei der Präparation seinen Liganden gebunden, der nur durch eine Denaturierung des Proteins entfernt werden kann.

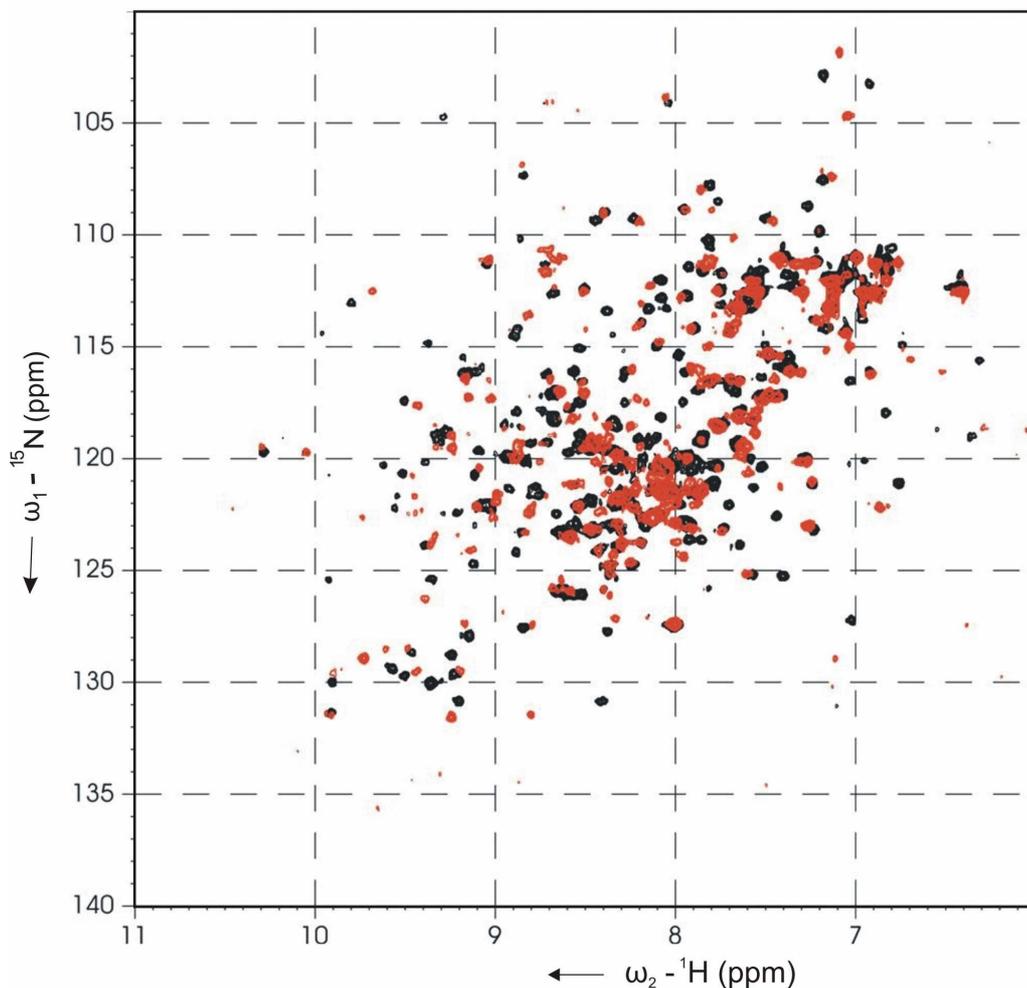


Abbildung 39 Überlagerung von ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des rückgefalteten Bindeproteins **ArtJ**, mit (schwarz) und ohne (rot) Arginin-Zugabe. Die Spektren wurden an einem 750 MHz Spektrometer bei 300 K aufgenommen.

3.6.3 NMR-Messung an der ^{15}N -ArtJ/Arginin-Probe nach Zugabe von ArtMP

Bei diesem NMR-Experiment wurde der ABC-Transporter ArtMP zu dem ArtJ/Arginin-Ansatz gegeben und ein HSQC-Spektrum aufgenommen. In der Abbildung 40 ist das erhaltene Spektrum vergleichend mit dem des Substrat-beladenen Bindeproteins ohne ArtMP gezeigt, um die Signalveränderungen hervorzuheben. Die Intensität der Resonanz-Signale von ArtJ werden nach der Zugabe des Transporters schwächer, einige Signale verschwinden vollständig (beispielhaft gekennzeichnet in Abbildung 40). Besonders im Bereich des Spektrums, der die Signale der Seitenketten von ArtJ bei 110 ppm - 120 ppm und 6,4 ppm - 7,6 ppm zeigt, waren mehrere Resonanz-Signale nicht mehr vorzufinden.

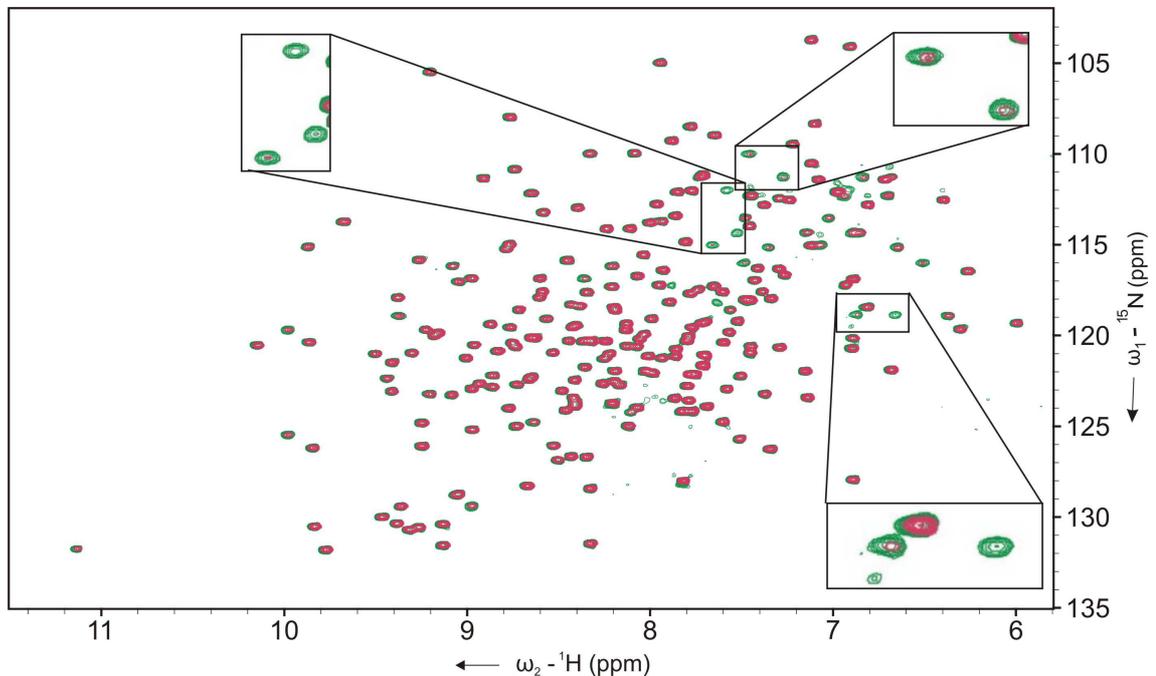


Abbildung 40 Vergleich der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von ArtJ/Arginin aufgenommen mit (rot) und ohne (grün) ArtMP. Beispielhaft sind einige der Signale, deren Intensität abgenommen hat, vergrößert gezeigt. Die Spektren wurden bei 900 MHz und 300 K aufgenommen.

Möglicherweise hat die Zugabe des Proteinkomplexes Auswirkungen auf den pH-Wert in der NMR-Probe, wodurch das Verschwinden einiger ArtJ-Signale verursacht wurde. Ein anderer Grund für die Signalveränderungen könnte eine verringerte Mobilität des Bindeproteins aufgrund von Wechselwirkungen mit dem großen ABC-Komplex sein. Die Signaländerungen im Spektrum bilden dann einen dynamischen Prozess ab: ein Teil von ArtJ ist an den Proteinkomplex gebunden, der

andere Teil liegt frei vor. Zwischen diesen Formen findet ein Austausch statt, der zu einer Verbreiterung der Linien und demzufolge zu einer Abnahme der Signalintensität im 2D-Spektrum führte.

3.6.4 NMR-Messung an ^{15}N -ArtJ unter Zugabe von Arginin, ArtMP und ATP/ MgCl_2

In einem dritten NMR-Experiment wurde zum ArtJ/Arginin/ArtMP-Ansatz ATP/ MgCl_2 gegeben und ein HSQC-Spektrum aufgenommen. Die Resonanzsignale in diesem Spektrum waren im Vergleich zu den Signalen der vorherigen Spektren deutlich verschoben (Abbildung 41). Einige Signalveränderungen sind vergrößert gezeigt. Die Intensität der Signale, deren Position sich durch die Zugabe von ATP/ MgCl_2 verschoben, änderte sich nicht. In dem Spektrum, das nach der ATP/ MgCl_2 -Zugabe aufgenommen wurde, erschienen Signale teilweise wieder, die in dem ArtJ/Arg/ArtMP-Spektrum ohne ATP-Zugabe nur schwach vorhanden waren oder ganz fehlten.

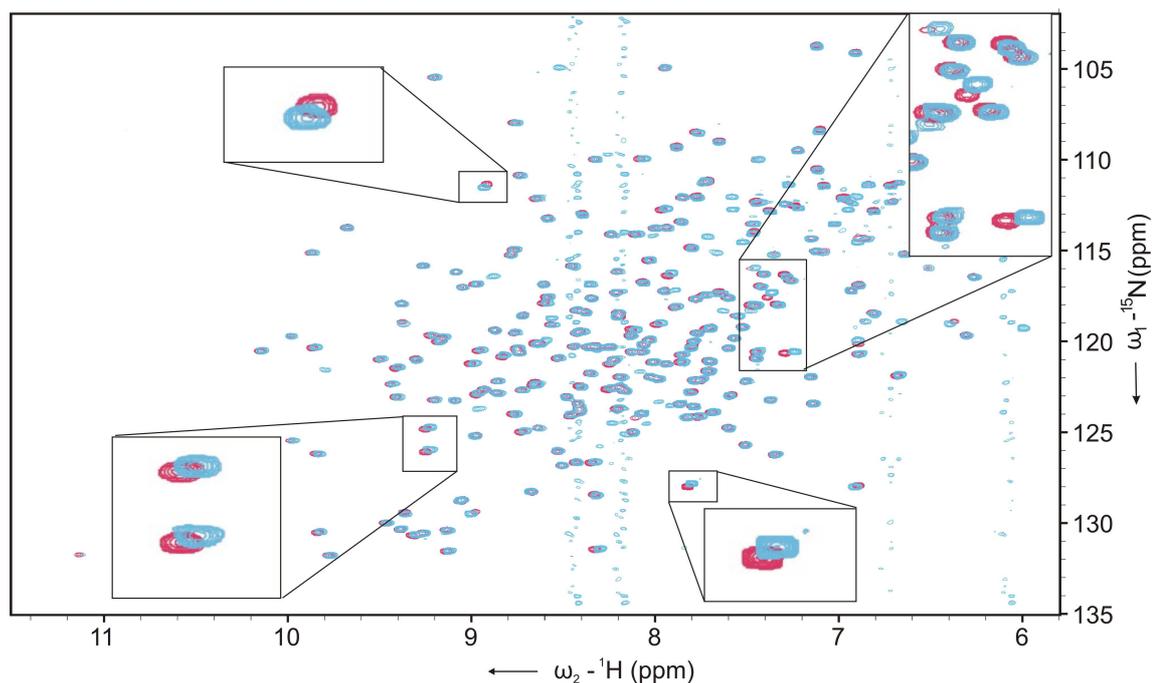


Abbildung 41 Überlagerte Darstellung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von ArtJ, die von Ansätzen mit ArtJ/Arginin/ArtMP ohne ATP (rot) und mit ATP (blau) im Rahmen der NMR-Messreihe aufgenommen wurden. Zur Verdeutlichung der durch die ATP-Zugabe verschobenen ArtJ-Signale sind beispielhaft einige Signalveränderungen vergrößert dargestellt. In dem Spektrum von ArtJ/Arginin/ArtMP mit ATP (blau) treten Signale wieder auf, die in dem HSQC ohne ATP fehlten oder nur schwach waren. Beide Spektren wurden bei 900 MHz und 300 K aufgenommen.

3.6.5 Zusammenfassung der NMR-Messungen an ArtJ

Die im Rahmen dieser NMR-Messreihe an dem Substrat-Bindeprotein ArtJ aufgenommenen HSQC-Spektren wiesen eine gute Signalauflösung auf. Wie die NMR-Experimente zeigten, liegt das Protein nach seiner Präparation aus *E. coli* zunächst in einem Substrat-beladenen Zustand vor. Die Zugabe des ABC-Transporters zu dem Bindeprotein führte zu einer Änderung der Signalintensitäten im ArtJ-Spektrum, die möglicherweise Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen dem Bindeprotein und den Membranproteinen von ArtMP anzeigten. Die Zugabe von ATP/MgCl₂ zu dem ArtJ/Arginin/ArtMP-Ansatz führte zu einer Verschiebung von ArtJ-Signalen. So wurde der Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von ATP, möglicherweise über eine Bindung und Hydrolyse am ABC-Transporter, und konformationellen Änderungen im Bindeprotein NMR-spektroskopisch dargestellt.

4 Diskussion

Funktionelle und strukturelle Charakterisierung des ABC-Transporters ArtMP-J

ABC-Transporter treten in allen drei Reichen des Lebens auf und sind an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt. Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für viele zelluläre Vorgänge wurde in dieser Dissertation das bakterielle Importsystem ArtMP-J des thermophilen Organismus *G. stearothermophilus* als Vertreter der ABC-Transporter-Proteinfamilie funktionell untersucht und erste strukturelle Studien mit der NMR-Spektroskopie durchgeführt. Der ABC-Transporter ArtMP, eingebettet in seine natürliche Lipidumgebung, sowie 3D-Kristalle des isolierten ABC-Proteins ArtP wurden mittels Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie untersucht. Diese Methode wird zunehmend zur strukturellen Untersuchung von Proteinen eingesetzt und besitzt das Potential zur Erforschung größerer integraler Membranproteine (Basting *et al.*, 2006). Das Substrat-Bindeprotein ArtJ, das zum Transportsystem gehört, wurde andererseits mit Lösungs-NMR strukturell untersucht, um zur Aufklärung der molekularen Wechselwirkungen zwischen Protein und den Membran-Untereinheiten des Transporters sowie zu seinem Substrat und zur Signalübertragung innerhalb des Transportsystems beizutragen.

4.1 Präparation und biochemische Untersuchung des ABC-Transporters ArtMP

Die Kenntnis der speziellen charakteristischen Eigenschaften von Proteinen ist eine Voraussetzung und auch Grundlage jeder strukturellen Untersuchung. Daher wurde der ABC-Transporter ArtMP-J und seine Untereinheiten biochemisch analysiert. Dazu wurde unter Verwendung verschiedener Methoden und Techniken nach den am besten geeigneten Präparationsbedingungen gesucht und seine Aktivität, sein oligomerer Zustand sowie seine Stabilität studiert. Die Charakterisierung von ArtMP begann mit der Suche nach Expressions- und Reinigungsbedingungen, die effizient und reproduzierbar waren, um die für die NMR-Spektroskopie benötigte Menge des Proteinkomplexes herzustellen. Zugleich sollte die Präparation aber auch

gewährleisten, dass ArtMP in seiner Funktionalität unbeeinträchtigt bleibt. Da die Stabilität der Proteine während der vergleichsweise langen NMR-Messung ein wichtiges Kriterium darstellt, wurde sowohl die Toleranz von ArtMP gegenüber verschiedenen Detergenzien untersucht, als auch NMR-spektroskopische und biochemische Funktionalitätsbestimmungen durchgeführt. Im letzten Abschnitt werden die Ergebnisse einer versuchten Auftrennung des ArtMP-Komplexes in seine Untereinheiten und einer anschließenden Reassemblierung zu einem funktionalen ABC-Transporter diskutiert, die die Grundlage für eine spezielle selektive Markierung von ArtMP für NMR-Untersuchungen bilden sollten.

4.1.1 Präparation des ABC-Transporters ArtMP

Die Präparation von Membranproteinkomplexen wie ABC-Transporter stellt aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Proteine noch immer eine Herausforderung dar. Besonders die Herstellung der für die NMR-Spektroskopie benötigten Menge an Proteinkomplex ist ein kritischer Punkt. Die optimalen Bedingungen zur Expression, Isolation und der anschließenden Rekonstitution müssen für jedes einzelne Membranprotein bzw. -komplex empirisch bestimmt werden.

Zunächst wurden die Kultivierungs- und Expressionsbedingungen für JM109(pRF2), in dem der Proteinkomplex synthetisiert wurde, auf die Anforderung der Festkörper-MAS-NMR angepasst. Zu diesen gehört die Markierung der zu untersuchenden Proteine mit den Isotopen ^{13}C , ^{15}N , die für ArtMP im M9-Minimal-Medium erfolgte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit geeigneten Anzuchtbedingungen eine für Membranproteinkomplexe sehr gute Expression und Ausbeute an ArtMP sowohl aus einer Kultivierung in LB- als auch in M9-Minimal-Medium erreicht. Die anschließende Solubilisierung und Reinigung des ABC-Transporters erfolgte effektiv, reproduzierbar und in einer für die Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie ausreichenden Proteinmenge von 8 mg ArtMP pro Liter LB-Medium und 5 mg ArtMP pro Liter M9-Minimal-Medium. Vor der Optimierung der Bedingungen betrug die Ausbeute aus einem Liter LB-Medium lediglich 4 mg ArtMP. Anhand von ATPase-Aktivitätsbestimmungen an dem ABC-Transporter wurde darauf geschlossen, dass der Proteinkomplex intakt gefaltet und funktional präpariert wurde. Versuche zur Toleranz von ArtMP gegenüber unterschiedlichen Arten und Konzentrationen von Detergenzien zeigten, dass DDM und DM optimal zur Solubilisierung des ABC-Transporters geeignet sind. Diese Detergenzien wirkten sich vorteilhaft auf die Stabilität des

Proteinkomplexes und auf die Qualität der später von ArtMP erzeugten 2D-Kristalle aus. Diese milden Detergenzien werden häufig zur Präparation von großen und empfindlichen Proteinkomplexen verwendet (Rèmigy *et al.*, 1999). Die Blau-Native-PAGE bestätigte die Stöchiometrie des Komplexes bestehend aus je zwei Homodimeren ArtM und ArtP.

Für einen Teil der Studien wurde ArtMP in Lipide aus *G. stearothermophilus* rekonstituiert, die der natürlichen Lipidumgebung des Komplexes entsprachen. Für die Rekonstitution wurden drei verschiedene Methoden getestet: a) die Dialyse, b) die Verdünnung des Ansatzes und c) die Verwendung von Detergenz-absorbierenden *BioBeads*. Jede dieser Rekonstitutionsverfahren führte zu einem effektiven Einbau von ArtMP in die Lipide. Die Nutzung von *BioBeads* zeigte jedoch einen deutlichen zeitlichen Vorteil gegenüber den anderen beiden Methoden, da die Entfernung bzw. Verringerung des Detergenz aus dem Ansatz innerhalb weniger Stunden erreicht wurde. Aus diesem Grund wurde dieses Verfahren zur Rekonstitution von ArtMP für die weiterführenden biochemischen Untersuchungen verwendet.

4.1.2 Untersuchungen zur ATPase-Aktivität von ArtMP

ATPase-Aktivitätsmessungen dienen zu Studien der Funktion von ArtMP, aber auch dazu, den Einfluss verschiedener Faktoren, wie beispielsweise die Zugabe eines Inhibitors, auf die Aktivität des Komplexes zu untersuchen. Bei den ATPase-Aktivitätsbestimmungen wird die Menge an P_i ermittelt, die bei der Hydrolyse von ATP an den NBDs des Transporters frei wird. Da bei den ABC-Transportern die ATP-Hydrolyse mit der Substrattranslokation gekoppelt ist, zeigen die gemessenen Werte die Funktionalität des Transportsystems. Die Versuche wurden sowohl an in Detergenz solubilisiertem als auch an rekonstituiertem ArtMP durchgeführt. Für die ATPase-Aktivitätsmessungen wurden zu dem Proteinkomplex jeweils das zugehörige Substrat-Bindeprotein ArtJ sowie ATP/MgCl₂ zugegeben und so die Funktion des ArtMP-Komplexes festgestellt. Der Aktivitätswert des in Detergenz solubilisierten ArtMP blieb während mehrerer Messungen gleich bei $1,2 \mu\text{mol } P_i \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Proteinkomplex. Wohingegen die ermittelte ATPase-Aktivität des rekonstituierten Komplexes mit Werten zwischen $0,7$ und $1,3 \mu\text{mol } P_i \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Proteinkomplex erheblich schwankte. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die unterschiedliche Orientierung der Proteinkomplexe in den Proteoliposomen darstellen, bei der die hydrophilen ATPase-Untereinheiten entweder auf der Innen- oder auf der Außenseite der Lipidmembran

lokalisiert sein können. Im Inneren der Proteoliposomen ist sowohl ATP als auch das Substrat nur limitiert vorhanden. So könnten die Schwankungen der gemessenen ATPase-Aktivitäten des rekonstituierten Transporters mit der unterschiedlichen Menge an ATP und Substrat zusammenhängen, die bei der jeweiligen Rekonstitution im Inneren der Proteoliposomen eingeschlossen wurde.

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die Abwesenheit des Bindeproteins oder des Substrats auf die Aktivität des Komplexes auswirkt. Bei fehlendem Substrat-Bindeprotein wurde keine ATPase-Aktivität an ArtMP festgestellt. Hingegen wurde in dem ArtMP/ArtJ-Ansatz, dem kein Substrat hinzu gegeben wurde, eine ATPase-Aktivität gemessen, die sich mit $0,4 - 0,6 \mu\text{mol P}_i \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Proteinkomplex im unteren Bereich der Aktivität des rekonstituierten ArtMP mit Arginin-Zugabe befanden. Nachfolgende NMR-Messungen an dem gereinigten Bindeprotein bestätigten, dass in dem Protein bereits vor der Arginin-Zugabe Substrat gebunden war, vermutlich seit seiner Präparation aus den *E. coli*-Zellen. Dieses gebundene Substrat initiierte die ATPase- und Transportaktivität von ArtMP-J.

Die Stabilität der mit NMR-Spektroskopie zu untersuchenden Proteine ist ein kritischer Punkt, da sich die Proteinproben über die oftmals lange Dauer der NMR-Messungen nicht verändern oder degenerieren sollen. Hier scheint die Herkunft des ABC-Transporters aus einem Thermophilen von Vorteil zu sein, denn Proteine thermophiler Organismen sind oft stabiler als die mesophiler Organismen. Die Stabilität des Transporters wurde unter diesem Aspekt über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. Die wiederholten Aktivitätsbestimmungen zeigten, dass ArtMP in diesem Zeitraum stabil und mit nahezu gleich bleibender Aktivität in DM-Detergenzlösung vorlag.

Die ATPase-Aktivität von ABC-Transportern kann durch die Wirkung von Phosphatanaloga wie Orthovanadat gehemmt werden. Der hier verwendete Inhibitor Vanadat blockiert die NBDs während der ATP-Hydrolyse in einem Zustand, in dem das ADP-Molekül in der Bindungstasche verbleibt und das Phosphat bereits dissoziiert ist. Eine Neubindung von ATP an den NBDs wird so unterbunden. Der gehemmte Transporter befindet sich in einem Intermediärzustand des Translokationszyklus, in dem ein ATP-Molekül hydrolysiert wurde und so der Substrattransport begonnen hat. Strukturelle Studien mit NMR-Spektroskopie an einem solch inhibierten Transportsystem bieten die Möglichkeit, den konformationellen Zustand des Komplexes zu Beginn des Transportzyklus zu untersuchen und so Erkenntnisse über den

molekularen Mechanismus der Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse und Substrattransport zu gewinnen. Mit diesem Ziel wurde ArtMP mit Vanadat behandelt und die Inhibierung der Aktivität des Transporters sowohl biochemisch als auch NMR-spektroskopisch untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen an ArtMP in Detergenz und rekonstituiert in Proteoliposomen zeigten eine deutliche Hemmung der ATPase-Aktivität. In den Proteoliposomen wurde die Aktivität nicht vollständig inhibiert, möglicherweise kann das Vanadat die Membran nicht durchqueren und so die ins Vesikelinnere gerichteten NBDs des Transportkomplexes nicht blockieren. Die Versuche zur Inhibierung der ArtMP-Aktivität bilden die Grundlage für zukünftige Probenpräparationen des ABC-Transporters für NMR-Untersuchungen, bei der sich das Transportsystem in einem Intermediärzustand des Translokationsvorgangs befindet.

4.1.3 Auftrennung und Reassemblierung der Untereinheiten des ArtMP-Komplexes

Zur Herstellung eines speziell markierten ABC-Transporters, der aus einer Isotopen-markierten und einer unmarkierten Untereinheit besteht, für die NMR-Spektroskopie wurde die Anleitung zur De- und Reassemblierung der Histidin-Permease HisQMP₂ aus *S. typhimurium* (Liu & Ames, 1998) verwendet. Es gelang allerdings nicht, den ABC-Transporter ArtMP aus *G. stearothermophilus* in seine Untereinheiten aufzutrennen und wieder zu assemblieren. Entweder blieb die Inkubation der Cytoplasmamembranen der JM109(pRF2)-Zellen mit Harnstoff ohne Wirkung auf die Proteine des Komplexes oder führte wie beim Einsatz von GdnHCl zur Denaturierung der Membranproteine. Auch die Behandlung von Proteoliposomen, die ArtMP enthielten, mit den chaotropen Chemikalien NaI, NaBr oder NaSCN führte nicht zu dem angestrebten Ziel der Auftrennung des Proteinkomplexes, sondern löste ArtP nur unvollständig aus den rekonstituierten Komplexen. Möglicherweise lag ein Teil der NBDs eingeschlossen im Inneren der Proteoliposomen vor und konnte aus diesem Grund nicht aus dem Ansatz entfernt werden.

Ein positives Ergebnis der Auftrennversuche des Proteinkomplexes ist die Feststellung, dass ArtMP eine bemerkenswerte Toleranz und Stabilität gegenüber hohen Temperaturen und Chemikalien besitzt. Der rekonstituierte Transporter wies bei einer Temperatur von 70 °C noch eine Aktivität von 0,25 $\mu\text{mol P}_i \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Proteinkomplex auf, das einem Drittel der ATPase-Aktivität bei optimalen

Bedingungen entspricht. Auch eine Inkubation bei 80 °C und eine Behandlung mit chaotropen Substanzen, wie NaBr und NaSCN führten nicht zu einer Destabilisierung des Transportkomplexes. Die hohe Toleranz von ArtMP beruht wahrscheinlich auf der Herkunft des Transporters aus einem Thermophilen, da diese Proteine häufig eine höhere Stabilität besitzen als die mesophiler Organismen (Das & Gerstein, 2000).

4.1.4 Separate Herstellung der Untereinheiten des ABC-Transporters ArtMP

Nachfolgend wurde versucht, die einzelnen Untereinheiten des Komplexes ArtMP separat zu exprimieren und zu isolieren, um diese dann zur Reassemblierung eines vollständigen und funktionsfähigen ABC-Transporters zu verwenden. Dazu wurden *artM* und *artP* subkloniert und die Proteine jeweils mit einer N-terminalen Histidinsequenz in *E. coli* synthetisiert. Das Membranprotein ArtM wurde aus der Cytoplasmamembran solubilisiert und mit Metall-Affinitätschromatographie gereinigt. Da jedoch die Expression von *artM* schon gering war, fiel dem entsprechend die Ausbeute an gereinigtem ArtM mit 0,1 mg aus einem Liter LB-Medium sehr niedrig aus. Die präparierte Menge des Membranproteins ArtM war für weiterführende Reassemblierungsversuche und die späteren NMR-Messungen nicht ausreichend. Die parallel durchgeführten Versuche zur Herstellung des ABC-Proteins ArtP waren hingegen erfolgreicher. Das separat exprimierte ArtP wurde effizient über TALON-Affinitätschromatographie aus dem Cytosol der Zellen gereinigt. Es wurde aber auch festgestellt, dass ArtP auch aus der cytosolischen Fraktion der Zellen zu gewinnen war, die zur Synthese der gesamten Komplexes ArtMP verwendet wurden. Nun stellte sich die Frage, warum ein Teil der ArtP-Proteine gelöst im Cytoplasma der JM109(pRF2)-Zellen vorlag. Ein schlichtes Ablösen der ABC-Proteine von den Membranproteinen des Komplexes erscheint aufgrund der großen Stabilität von ArtMP unwahrscheinlich. Eher könnte das ungleiche Verhältnis von synthetisiertem ArtM und ArtP in der Zelle auf der polycistronischen Transkription des *artM/artP*-Operons beruhen. Es ist nicht untypisch, dass Gene eines Operons ungleichmäßig oft transkribiert und somit die Proteine in einem ungleichen Verhältnis synthetisiert werden (Mäder *et al.*, 2004). Eine gleichzeitige Synthese des ArtP im Cytosol und des Komplexes in der Cytoplasmamembran der JM109(pRF2)-Zellen ermöglicht die Herstellung von zwei verschiedenen Proteinproben für die NMR-Spektroskopie, die gleichartig Isotopenmarkiert und identischen Bedingungen während der Expression ausgesetzt waren.

Da das Membranprotein ArtM für eine Reassemblierung des Transporters nicht in ausreichendem Umfang hergestellt werden konnte, war es nötig, eine andere Strategie zur selektiven Markierung von ArtMP und ArtP für die NMR-Spektroskopie zu finden, um so Signalüberlagerungen in den NMR-Spektren zu vermeiden oder zu verringern. Die Markierungsmethode, die schließlich erfolgreich an dem ABC-Transporter ArtMP und ArtP angewendet wurde, war die selektive ^{13}C -, ^{15}N -Markierung einzelner, ausgewählter Aminosäuren in den Proteinen.

4.2 Kristallisation des ABC-Transporters ArtMP und des isolierten ArtP aus *G. stearothermophilus*

Zur strukturellen Untersuchung des ABC-Transporters ArtMP mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie wurde der Membranproteinkomplex in natürliche Lipide rekonstituiert, so dass er möglichst homogen und geordnet vorliegt. Die Anwendung der Festkörper-NMR-Spektroskopie für strukturelle Studien an löslichen Proteinen erfordert wie die Röntgenstrukturanalyse dreidimensionale Proteinkristalle, die jedoch nicht sehr groß und hochgeordnet sein müssen. Bereits von Nanokristallen können auswertbare NMR-Spektren erhalten werden, aus denen Erkenntnisse zu strukturellen Eigenschaften des untersuchten Proteins gewonnen werden können.

In dieser Arbeit wurde der ABC-Transporter ArtMP in die extrahierten Lipide seines Originalstammes *G. stearothermophilus* rekonstituiert und sowohl mit als auch ohne ATP/EDTA-Zugabe zweidimensional kristallisiert, um so verschiedene Zustände des Komplexes für die strukturellen Untersuchungen zu erzeugen. Als Ergebnis dieser Kristallisationen mit und ohne Nukleotid entstanden zwei unterschiedliche Formen von ArtMP-2D-Kristallen. Das isolierte ABC-Protein ArtP wurde für die Festkörper-MAS-NMR-Untersuchungen analog zu ArtMP ebenfalls in verschiedenen Zuständen mit und ohne ATP/EDTA dreidimensional kristallisiert.

4.2.1 2D-Kristallisation von ArtMP

Die zweidimensionale Kristallisation von Membranproteinen erfordert eine geeignete Wahl bzw. Variation von Kristallisationsbedingungen, die einen geordneten und regelmäßigen Einbau der Proteine in die Lipidmembranen ermöglichen.

Membranproteine liegen nach ihrer Reinigung gelöst in Detergenzmizellen vor. Für ihre Rekonstitution in Lipide mit einer anschließenden 2D-Kristallisation muss das Detergenz vollständig aus dem Protein-Lipid-Detergenz-Ansatz entfernt oder ausverdünnt werden. Dazu können mehrere Methoden verwendet werden: die Zugabe von *BioBeads*, die das Detergenz sehr schnell absorbieren (Rigaud *et al.*, 1995), die Dialyse des Detergenz (Hasler *et al.*, 1998) oder die Verdünnung des Detergenz unter die kritische mizellare Konzentration (*critical micelle concentration* - CMC; Rémy *et al.*, 2003). Da jede dieser Methoden Einschränkungen besitzt, muss die Wahl des Verfahrens den Bedürfnissen und Eigenschaften des zu kristallisierenden Proteins und den nachfolgend geplanten Untersuchungen angepasst werden.

Die Dialyse ist die erfolgreichste Methode, um zweidimensionale Kristalle von Membranproteinen zu erzeugen (Hasler *et al.*, 1998; Werten *et al.*, 2002; Rigaud, 2002), und wurde auch für die Kristallisation des ABC-Transporters ArtMP verwendet. Bei dieser Methode wird das Detergenz langsam aus dem Kristallisationsansatz entfernt, wodurch möglicherweise die Ausbildung von zweidimensionalen ArtMP-Kristallen positiv beeinflusst wurde. Für dieses Kristallisationsverfahren musste entweder der ABC-Transporter und/oder die Lipide in einem Detergenz mit einer hohen CMC vorliegen, da dieser Wert die Menge an Detergenz bestimmt, die während der Dialyse aus dem Kristallisationsansatz entfernt wird. Aus diesem Grund wurden die Lipide aus *G. stearothermophilus* für die 2D-Kristallisation mit 1 % OG versetzt, einem Detergenz mit einer hohen CMC von 18 mM (siehe Übersicht Tabelle 4), das relativ schnell aus dem Kristallisationsansatz entfernt werden kann. Der ABC-Transporter hingegen lag solubilisiert in DM vor, das mit einer CMC von 1,8 mM nur langsam aus dem Ansatz dialysiert wird. Möglicherweise fördert dieses langsame Entfernen den kristallinen Einbau der Proteinkomplexe in den Lipidmembranen.

Für die 2D-Kristallisation von ArtMP wurden in mehreren Versuchsreihen verschiedene Bedingungen wie beispielsweise die Pufferzusammensetzung, die Wahl der Lipide und das Verhältnis, in dem diese zum Proteinkomplex eingesetzt wurden, systematisch variiert. So wurden geeignete Parameter gefunden, unter denen sich zweidimensionale ArtMP-Kristalle bildeten, an deren Oberfläche die für kristallin angeordnete Proteine typische gitternetzartige Struktur zu erkennen war. Ein entscheidender Faktor für die 2D-Kristallisation von ArtMP war die Wahl der Lipide, in die der Proteinkomplex rekonstituiert wurde. Die qualitativ besten 2D-Kristalle von ArtMP wurden erhalten, wenn zur Rekonstitution des ABC-Transporters die Lipide

seines Originalstammes *G. stearothermophilus* verwendet wurden. Diese Lipide wurden als Extrakt aus den Zellen von *G. stearothermophilus* gewonnen (Folch *et al.*, 1957). In diesem Lipidextrakt ist neben den Hauptbestandteilen Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylglycerol ein hoher Anteil an Glukocardiolipinen enthalten (Schäffer *et al.*, 2002; Card, 1973), die sonst nur in coccoiden Organismen, wie z.B. der Gruppe B Streptokokken, zu finden sind und die zum ersten Mal in einem thermophilen Organismus nachgewiesen wurden (Schäffer *et al.*, 2002). Diesen Cardiolipinen wird eine große Bedeutung bei der Stabilisierung der Lipidmembran gegenüber den Einflüssen der hohen Temperaturen innerhalb des Lebensraumes von *G. stearothermophilus* zugesprochen (Jurado *et al.*, 1991). Möglicherweise hat die besondere Zusammensetzung des Lipidextraktes die Ausbildung von ArtMP-2D-Kristallen positiv beeinflusst. Ein Lipid-zu-Protein-Verhältnis von 1:2 erwies sich für die 2D-Kristallisation von ArtMP als vorteilhaft. Dieses niedrige Verhältnis war auch für die anschließende NMR-Untersuchung der 2D-Kristalle gut geeignet. In der Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie ist das Volumen der zu untersuchenden Proteinprobe durch das Fassungsvermögen der jeweilig verwendeten NMR-Rotoren limitiert. Ein 4 mm MAS-NMR-Rotor mit Spacern fasst 50 µl einer Probe, die eine Proteinkonzentration von mindestens 3 mM aufweisen sollte, um innerhalb eines vernünftigen Messzeitraums NMR-Spektren mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis zu liefern. Auf den ABC-Transporter übertragen bedeutet das, dass mindestens 8 mg ArtMP-2D-Kristalle im Rotor eingesetzt werden müssen. Die Wahl eines möglichst niedrigen Lipid-zu-Protein-Verhältnis im Kristallisationsansatz ist wichtig, damit das Messvolumen des Rotors nicht durch überflüssige Lipidmoleküle eingenommen wird.

4.2.2 2D-Kristallisation von ArtMP mit oder ohne ATP-Zugabe – Ausbildung unterschiedlicher Kristallformen

Beide Ansätze zur 2D-Kristallisation von ArtMP waren in ihrer Puffer-Grundzusammensetzung gleich. Zur Herstellung der Nukleotid-freien ArtMP-2D-Kristalle enthielt der Ansatz zusätzlich 10 mM MgCl₂, da ArtMP in der Versuchsreihe zur systematischen Variation der Pufferbedingungen nur in Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen kristalline Strukturen ausgebildete. Für die Herstellung von 2D-Kristallen, in denen der Komplex im Nukleotid-gebundenen Zustand vorliegen sollte, wurde dem Kristallisationspuffer anstelle des MgCl₂ – 10 mM ATP/0,1 mM EDTA hinzugefügt.

Auf die Zugabe des MgCl_2 wurde verzichtet, um so zusammen mit dem EDTA die Hydrolyse des zugegebenen ATP zu verhindern. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorherigen Kristallisationsversuche wurde die Ausbildung kristalliner Strukturen durch das Fehlen des MgCl_2 nicht negativ beeinflusst.

Obwohl die Kristallisationsansätze für ArtMP, Nukleotid-gebunden und -ungebunden, bis auf die Variationen in der Pufferzusammensetzung und in der Gesamtdauer der Dialyse gleich waren, wurden deutlich unterschiedliche 2D-Kristalle erzeugt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Komplexes im Nukleotid-freien Zustand zeigten, dass ArtMP in den Lipidmembranen kristallin geordnet vorlag, deutlich zu erkennen an der charakteristischen Gitternetzstruktur an deren Oberfläche (siehe Abbildung 26; Hasler *et al.*, 1998; Lacapère *et al.*, 1998). Allerdings bestand nur ein geringer Teil der 2D-Kristalle aus einzelnen Lipidschichten. Der Großteil der einschichtigen 2D-Kristalle des ABC-Transporters lagerte sich zu Membranstapeln mit einer Größe von mindestens 580 nm zusammen. Zwischen den einzelnen Lipidschichten sind deutlich die hydrophilen Untereinheiten des Proteinkomplexes zu erkennen, die beidseitig aus den Membranen herausragen. Diese zeigen die dichte Anordnung und die rechtwinklige Ausrichtung des ABC-Transporters in den einzelnen Lipidmembranen der multilamellaren Kristallstrukturen.

Hingegen wiesen die 2D-Kristalle des Komplexes, die sich in dem Ansatz mit ATP und ohne MgCl_2 ausbildeten, eine deutlich andere Gestalt auf. Die mit ATP entstandenen Kristalle besaßen die Form von großen Vesikeln, in die der Komplex bidirektional und großflächig in kristalliner Anordnung rekonstituiert wurde. Die Gitternetzstrukturen an der Oberfläche der Lipidmembranen, die aus waagechten und senkrechten Reihen der eingebauten ArtMP-Komplexe bestanden, waren weiträumiger und deutlich definierter als in den Kristallen der Nukleotid-freien Präparation. Außerdem bildeten diese 2D-Kristalle keine multilamellaren Stapel von Lipidschichten aus.

Die unterschiedlichen Kristallstrukturen des ABC-Transporters waren vermutlich nicht auf die verschiedenen Kristallisationszeiträume zurückzuführen, da elektronenmikroskopische Aufnahmen der Ansätze nach vier Tagen Dialyse zeigten, dass sich sowohl die Membranstapel als auch die Vesikel bereits zu Beginn der Kristallisation ausgebildet hatten. Aller Wahrscheinlichkeit nach bewirkt das ATP/EDTA bzw. MgCl_2 in den Kristallisationsansätzen die Ausbildung der unterschiedlichen Kristallformen. Während der vorausgegangenen Suche nach

geeigneten Kristallisationsbedingungen war die Anwesenheit eines Gegenions, in diesen Versuchen Mg^{2+} -Ionen, ausschlaggebend für die Ausbildung von zweidimensionalen ArtMP-Kristallen. Mehrere Autoren (Lacapère *et al.*, 1998; Hasler *et al.*, 1998) führen die Möglichkeit an, dass die Zugabe von Gegenionen zum Kristallisationspuffer die kristalline Anordnung von Membranproteinen in den Lipidmembranen positiv beeinflusst. Allerdings kamen die Autoren ebenfalls zu dem Schluss, dass sich die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen nicht verändernd auf die Form der Kristalle auswirkt und dementsprechend das Zusammenlagern der 2D-Kristalle nicht verhindert. Die Ausbildung von vielschichtigen Strukturen in 2D-Kristallen von Membranproteinen wurde ebenfalls für die Ca^{2+} -ATPase aus dem sarkoplasmatischen Retikulum der Muskelzellen beschrieben, die wie ABC-Transporter zur Klasse der aktiven Transportsysteme gehört (Lacapère *et al.*; 1998). Ähnlich wie die ABC-Transportkomplexe sind Ca^{2+} -ATPasen aus transmembranen und Nukleotid-bindenden Domänen aufgebaut. Die Ca^{2+} -ATPase war das Objekt zahlreicher Untersuchungen zur 2D-Kristallisation und zum Einfluss verschiedener Faktoren auf Struktur und Qualität der erzeugten 2D-Kristalle (Stokes & Green, 1990; Stokes & Lacapère, 1994; Young *et al.*, 1997; Stokes *et al.*, 2006). Sowohl in dem Artikel über die Ausbildung zwei verschiedener Formen von 2D-Kristallen der Ca^{2+} -ATPase (Lacapère *et al.*, 1998) als auch in einem Übersichtsartikel von Hasler *et al.* (1998) kommen die Autoren zu dem Schluss, dass die Zusammenlagerung von 2D-Kristallen zu multilamellaren Membranstapeln auf der Interaktion der hydrophilen Untereinheiten beruht, die aus den einzelnen Lipidschichten herausstehen. Auch aus den 2D-Kristallen des ABC-Transporters ArtMP ragen die hydrophilen ArtP-Proteine heraus und erzeugen vermutlich über Protein-Protein-Wechselwirkungen die multilamellaren Strukturen. Hingegen wird durch die Zugabe von ATP zum Kristallisationsansatz die Ausbildung von multilamellaren Strukturen gehemmt, auch in Anwesenheit von Detergenz. Stokes & Lacapère *et al.* (1994) und Lacapère *et al.* (1998) zeigten, dass der Zusatz von ATP bzw. ADP während der zweidimensionalen Kristallisation der Ca^{2+} -ATPase zu einer Ausbildung von qualitativ besseren 2D-Kristallen führte als in Abwesenheit der Nukleotide. Die mit ATP erhaltenen 2D-Kristalle bestehen aus ein- bis zweischichtigen Lipidmembranen, in denen die Membranproteine definiert und geordnet rekonstituiert vorliegen. Die Autoren vermuten, dass in der Regel eine Veränderung der Kristallform und eine verbesserte Qualität von 2D-Kristallen auf Konformationsänderungen in dem Membranproteinkomplex beruht, die durch das im Kristallisationsansatz anwesende

Nukleotid und dessen Wechselwirkungen mit den Proteinen hervorgerufen werden. Aufgrund dieser konformationellen Änderungen werden die Interaktionen zwischen den aus den 2D-Kristallen herausragenden Untereinheiten der eingebauten Proteinkomplexe verhindert und auf diese Art die Formation von multilamellaren Kristallstrukturen unterbunden.

Es spricht vieles dafür, dass die Ausbildung der unterschiedlichen Form und Qualität der zweidimensionalen ArtMP-Kristalle ihre Ursache aller Wahrscheinlichkeit nach in der An- und Abwesenheit von ATP im Kristallisationspuffer hat. Durch die Zugabe von ATP wurde das Zusammenlagern der einzelnen 2D-Kristalle zu vielschichtigen Membranstapeln verhindert und die Bildung von ArtMP-2D-Kristallen in Form von Vesikeln positiv beeinflusst.

4.2.3 3D-Kristallisation des isolierten ArtP

Die strukturelle Untersuchung des isolierten ABC-Proteins mittels Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie erforderte die Herstellung mehrerer mg an ArtP-3D-Kristallen, da nur mit dieser Menge auswertbare NMR-Spektren erhalten werden können. Für die NMR-Spektroskopie wird eine Proteinkonzentration von 2-5 mM benötigt. Unter Verwendung eines 4 mm NMR-Rotors mit einem Fassungsvermögen von 50 µl mussten dem entsprechend mindestens 4 mg ArtP-3D-Kristalle erzeugt werden. Zu diesem Zweck wurde *artP* subkloniert und das Protein mit einem C-terminalen His-Tag in *E. coli* synthetisiert. Mit Hilfe der Metall-Affinitätschromatographie und einer anschließenden Gelfiltration wurde ArtP aus dem Cytosol der Zellen gereinigt. Mit der Aufnahme eines 1D-Lösungs-NMR-Spektrums wurde die Faltung des isolierten Proteins kontrolliert und bestätigt.

In Kooperation mit Dr. Y. Roske der AG Heinemann (MDC, Berlin) wurden Versuchsreihen zur Kristallisation von ArtP durchgeführt, in denen die Zusammensetzung der Kristallisationspuffer systematisch variiert wurde. Das ABC-Protein kristallisierte unter einer Reihe von Bedingungen, aus denen eine Kombination für die 3D-Kristallisation im großen Maßstab ausgewählt wurde. Analog zu der 2D-Kristallisation des gesamten Komplexes wurde ArtP mit und ohne Zugabe von ATP/EDTA kristallisiert, um das Protein in einem Nukleotid-gebundenen und -ungebundenen Zustand herzustellen. Die dabei erzeugten 3D-Kristalle von ArtP waren von ähnlicher nadel- und büschelartiger Form. Die anschließenden NMR-Messungen an diesen 3D-Kristallen ergaben NMR-Spektren mit einer sehr guten Signalauflösung.

Allerdings zeigten die NMR-Untersuchungen auch, dass die ArtP-Kristalle nach ihrer Überführung in den NMR-Rotor empfindlich waren gegenüber Lagerungszeiten von über einer Woche und Einwirkungen während der NMR-Messung, wie beispielsweise erhöhte Temperaturen im Spektrometer-Innenen.

4.3 Festkörper-MAS-NMR-Messungen an ArtP und ArtMP - im Nukleotid-gebundenen und -ungebundenen Zustand

Die bisher vorliegenden Kristallstrukturen vollständiger ABC-Transporter zeigen die Systeme im Ruhezustand oder als eine Momentaufnahme während des Transportzyklus. Erstrebenswert ist es hingegen, an einem einzigen ABC-Transportsystem die verschiedenen konformationellen Zustände, die der Transporter während einer Substrattranslokation durchläuft, darzustellen und zu untersuchen. Anhand dieser Daten wird ein molekulares Verständnis der Kopplung von ATP-Bindung und -Hydrolyse mit dem Substrattransport möglich. Mit diesem Hintergrund wurde der ABC-Transporter ArtMP und das ArtP-Protein als Probe für Festkörper-MAS-NMR-Untersuchungen jeweils Nukleotid-ungebunden und -gebunden hergestellt. Diese MAS-NMR-Messungen ermöglichten einen ersten Einblick in die strukturellen Zusammenhänge des ABC-Transporters ArtMP und des isolierten ArtP. Von besonderem Interesse bei den NMR-spektroskopischen Untersuchungen war es, Erkenntnisse zur Auswirkung der ATP-Bindung auf die Konformation des gesamten Komplexes und des separaten ArtP zu erhalten. Der ABC-Transporter ArtMP und das separat isolierte ArtP wurden für die Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie selektiv mit zwei bzw. drei ^{13}C -, ^{15}N -markierten Aminosäuren versehen, die als Monitore konformationelle Veränderungen in den Proteinen anzeigen sollten.

4.3.1 MAS-NMR-Messungen an ArtP-3D-Kristallen im Nukleotid-ungebundenen und -gebundenen Zustand

Das Protein ArtP wurde als NMR-Probe im Nukleotid-ungebundenen Zustand, ArtP-PY, und in Nukleotid-gebundener Form, ArtP-TYP, hergestellt und NMR-spektroskopisch untersucht. Die Spektren von ArtP-PY und ArtP-TYP waren gut aufgelöst und unterscheiden sich nur wenig voneinander. Die erwarteten Signalsätze der

markierten Aminosäuren waren deutlich zu erkennen. In den Spektren beider NMR-Proben waren an unterschiedlichen Positionen Signale vorzufinden, die weder Prolin, Tyrosin noch Threonin zugeordnet werden konnten. Dieses Auftreten von unerwarteten Signalen beruht auf der teilweisen Verstoffwechslung der zugegebenen, markierten Aminosäuren in den Zellen. Da in den Spektren diese Signale keine der relevanten Kreuzsignale überlagerten, trat kein Datenverlust ein.

Mit Kombinationen von PDS- und REDOR-Messungen an ArtP-PY und ArtP-TYP wurden zwei Aminosäure-Paare sequentiell zugeordnet - Tyrosin-133/Prolin-134 und Prolin-163/Threonin-164. Das zweite Paar liegt in der ArtP-Sequenz direkt vor der D-Schleife, einem hoch konservierten Bereich, der für Interaktionen innerhalb des NBD-Dimers verantwortlich gemacht wird (Abbildung 29; Hanekop *et al.*, 2005). Das Tyrosin-133/Prolin-134-Paar befindet sich in der Sequenz von ArtP in der Nukleotid-Bindestelle zwischen dem Walker A- und Walker B-Motiv direkt vor der ABC-Signatursequenz. Über die Zuordnung des Tyrosins-133 ergab sich die Identifizierung des zweiten Tyrosins Y213, das sich am C-terminalen Ende von ArtP befindet. In der Sequenz liegt das Tyrosin-213 weit hinter der an der ATP-Bindung beteiligten H-Schleife. Diese identifizierten Aminosäuren dienen als Monitore zur Visualisierung konformationeller Veränderung innerhalb der Proteine.

Ein bemerkenswerter Unterschied zwischen den Spektren des Nukleotid-freien und des Nukleotid-gebundenen ArtP ist die Aufspaltung eines der Tyrosinsignale zu zwei Signalen ähnlicher Intensität sowie das Auftreten von Austauschsignalen nahe der Diagonalen im Spektrum des mit ATP kristallisierten ArtP-TYP. Das nicht aufgespaltene Tyrosinsignal wurde Tyrosin-133 zugeordnet, das in dem ArtP-PY-Spektrum ohne ATP durch sequentielle Kontakte bestimmt worden war. Dass die beiden anderen Signale zu einer Aminosäure, zu Tyrosin-213, gehören, wurde durch die Austauschsignale an der Diagonalen bestätigt. Beides, die Signalaufspaltung und das Auftreten von Austauschsignalen zeigt an, dass sich das ArtP-Protein in den 3D-Kristallen der NMR-Probe gleichzeitig in zwei verschiedenen Zuständen befand oder zwischen beiden wechselte, wobei deren Verhältnis zueinander in etwa gleichmäßig verteilt war. Zudem sind die zugeordneten Signale von Prolin-134, Tyrosin-133 und Tyrosin-213 in dem ArtP-TYP Spektrum im Vergleich zu den Signalen im ArtP-PY-Spektrum deutlich verschoben. Die veränderten Signale in den Spektren von ArtP-PY und ArtP-TYP, hier besonders das Aufspalten des Tyrosin-213-Signals, wurde durch die ATP-Zugabe während der 3D-Kristallisation von ArtP-TYP hervorgerufen. Das

Signal des Tyrosin-133, das direkt in der ATP-Bindestelle zwischen dem Walker A- und Walker B-Motiv lokalisiert ist, wurde durch die Nukleotid-Bindung im Vergleich zu Tyrosin-213 lediglich gering beeinflusst (chemische Verschiebung $C\alpha = -0,2$ ppm und $C\beta = -0,2$ ppm). Auf den Tyrosin-213-Rest hingegen, der sich in der Sequenz von ArtP weit entfernt von der Nukleotid-Bindestelle befindet, zeigte ATP und dessen mögliche Bindung eine starke Wirkung (chemische Verschiebung Y213 $C\alpha = 0,2$ ppm und $C\beta = 0,4$ ppm; Y'213 $C\alpha = -2,1$ ppm und $C\beta = 0,5$ ppm). In der Kristallstruktur von ArtP (Proteindatenbank Zugangscode 2OLJ) befindet sich Tyrosin-213 sowohl in räumlicher Nähe zur Nukleotid-Bindestelle als auch an der Oberfläche des Proteins und ragt in einen Hohlraum innerhalb des ArtP-Kristallverbundes. Möglicherweise ist das Tyrosin-213 aufgrund seiner Position in der Struktur von ArtP an Wechselwirkungen zu einem zweiten Nukleotid eines benachbarten Proteins im Kristallverbund beteiligt oder wird durch diese beeinflusst. Eine andere Möglichkeit ist eine zweite niederaffine Bindestelle an der Oberfläche des Proteins, die aus entropischen Gründen aufgrund des Auftretens eines Hohlraumes zwischen verschiedenen Molekülen des Kristallverbandes, eine höhere Bindung zeigt.

Die Fragen, ob in ArtP nun ATP, ADP oder beides gebunden war, und ob die ATP-Bindung in einer Dimerisierung der monomeren ArtP-Proteine resultierte, bleiben im Rahmen dieser Arbeit offen. In nachfolgenden Studien wird mit der Herstellung von verschiedenen konformationellen Zuständen von ArtP fortgefahren (Dipl.-Biol. B. Kunert). So wurde bereits durch die Kristallisation von ArtP-TYP unter Zugabe von AMP-PCP, einem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogikum, ein ATP-gebundener Zustand des Proteins erzeugt und mittels MAS-NMR untersucht. In den Spektren dieser NMR-Messungen war das Signal des Tyrosin-213 weder aufgespalten noch fanden sich Austauschsignale. Hingegen war das Tyrosinsignal Y133 als Folge der AMP-PCP-Bindung verschoben. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass es sich bei dem Nukleotid, das im ArtP-TYP dieser Arbeit gebunden war, möglicherweise eher um ADP als um ATP handelt.

4.3.2 MAS-NMR-Messungen an 2D-Kristallen des ABC-Transporters ArtMP - im Nukleotid-freien und -gebundenen Zustand

Analog zu ArtP wurde der ABC-Transporter selektiv mit ^{13}C -, ^{15}N -Prolin, -Tyrosin und -Threonin markiert und im Nukleotid-freien sowie -gebundenen Zustand

zweidimensional kristallisiert. Dabei entstanden die Proben ArtMP-PY, ohne ATP, und ArtMP-TYP, mit ATP. Die Signale in den NMR-Spektren, die von den Proteinkomplexen aufgenommen wurden, waren gut aufgelöst. Bei dem Vergleich der NMR-Spektren fällt jedoch auf, dass in den ArtMP-TYP-Spektren die Signalauflösung deutlich höher war als in den ArtMP-PY-Spektren. Die unterschiedliche Qualität der Spektren wird weitgehend auf die unterschiedliche Struktur der 2D-Kristalle zurückgeführt. In den 2D-Kristallen von ArtMP-PY, die ohne zugegebenes Nukleotid erzeugt wurden, lagerten sich die Lipidschichten nach der Rekonstitution des ABC-Transporters zu großen lamellaren Strukturen zusammen. Das Zusammenlagern der ArtMP-PY-2D-Kristalle zu großflächigen Membranstapeln ist ein möglicher Grund für die schlechtere spektrale Auflösung. Von vesikelartigen 2D-Kristallen hingegen, die von ArtMP-TYP unter Zugabe von ATP erzeugt und in die der Transporter großflächiger kristallin eingebaut wurde, wurden NMR-Spektren besserer Qualität erhalten. Die Form der 2D-Kristalle und das Flächenausmaß der kristallinen Anordnung der Komplexe in den Lipidschichten, scheint einen direkten Einfluss auf Qualität und Signalauflösung der NMR-Spektren zu haben.

4.3.3 Kombination der PDS-D-NMR-Spektren von ArtMP und ArtP

In den ArtMP-Spektren waren durch den Vergleich mit den Spektren des ArtP-Proteins die Signale von Y133 und Y213 leicht zu identifizieren. Die Zuordnung des Tyrosin-133 wurde mittels einer Kombination des ArtMP-TYP-Spektrums mit dem von ArtP-TYP abgesichert. Die restlichen Tyrosinsignale im ArtMP-TYP-Spektrum wurden, nach dem Ausschluss der beiden Signale Y133 und Y213 von ArtP, den Membranprotein-Untereinheiten des Komplexes zugeordnet. Durch die Kombination der ArtMP- mit den ArtP-Spektren und dem Ausschluss von Signalen wurde eine MAS-NMR-spektroskopische Untersuchung beider Untereinheiten des ABC-Transporters ArtMP erleichtert.

Bei einer vergleichenden Betrachtung der Spektren von ArtMP-TYP und ArtP-TYP fallen deutliche Unterschiede besonders im Bereich der identifizierten Tyrosinsignale Y213 und Y133 auf, obwohl beide NMR-Proben in Gegenwart von ATP kristallisiert wurden und im Nukleotid-gebundenen Zustand vorlagen. In dem ArtMP-TYP Spektrum ist das Signal des Tyrosin-213 nicht aufgespalten und es finden sich keine Austauschsignale an der Diagonalen. Hingegen ist das Signal des Tyrosin-133 verschoben. Für die unterschiedliche Verschiebung der Tyrosinsignale in den ArtP-

TYP- und ArtMP-TYP-Spektren sind mehrere Erklärungen möglich. So kann das Fehlen der Signal-Aufspaltung und der Austauschsignale auf die unterschiedliche Kristallform, in der der Komplex und das ArtP-Protein während der NMR-Messung vorlagen, zurückzuführen sein. Das isolierte ArtP liegt in den 3D-Kristallen in einem reinen Protein-Kristallverbund vor, indem sich möglicherweise ein Hohlraum ausbildet, wie es für die Umgebung des Tyrosin-213 beobachtet wurde. Der Proteinkomplex hingegen liegt als 2D-Kristall in Lipidmembranen vor, in denen die ABC-Untereinheiten nicht dreidimensional gepackt sind und anderen entropischen Bedingungen ausgesetzt sind als im dreidimensionalen Kristallverbund. Außerdem unterliegen die ABC-Protein-Untereinheiten zusätzlichen Einflüssen wie beispielsweise die Wechselwirkungen zu den Membranproteinen ArtM des Komplexes. Damit ist ein weiterer möglicher Grund für die unterschiedlichen Y213- und Y133-Signale in den ArtMP-TYP- und ArtP-TYP-Spektren, dass das ABC-Protein als separat isoliertes ArtP in den 3D-Kristallen eine andere Konformation aufweist als die, die im Komplex mit den Membranproteinen vorliegt. Da im Rahmen dieser NMR-Messungen nicht mehr geklärt werden konnte, welches Nukleotid die ArtP-Proteine, separat und im Proteinkomplex, gebunden hatten, könnten die beobachteten Unterschiede in den ArtMP-TYP- und ArtP-TYP-Spektren möglicherweise auch auf die verschiedene Art des gebundenen Nukleotids zurückzuführen sein, da aufgrund einer partiellen Hydrolyse sowohl ATP als auch ADP vorliegen können.

4.3.4 Zusammenfassung der NMR-Messungen an ArtP und ArtMP

Mit Hilfe der aufgenommenen Spektren von ArtP-PY und ArtP-TYP wurden zwei Aminosäure-Paare und zwei Tyrosinreste sequentiell zugeordnet. Anhand der NMR-Messungen wurde festgestellt, dass ArtP in den 3D-Kristallen, erzeugt mit ATP, gleichzeitig in zwei verschiedenen Zuständen vorlag. Durch die ATP-Bindung oder diesbezügliche Wechselwirkungen wurde nicht das Tyrosin-133 in der Nukleotid-Bindestelle beeinflusst, sondern der Tyrosinrest in ArtP, der sequentiell weit entfernt von der Nukleotid-Bindestelle lokalisiert ist. Anhand der Kristallstruktur des ArtP-Proteins wurde eine räumliche Nähe des Tyrosin-213 zur ATP-Bindestelle festgestellt.

Die NMR-Spektren des ArtMP-Komplexes verdeutlichten einen Zusammenhang zwischen der Qualität der 2D-Kristalle und der spektralen Auflösung. Durch die Kombination der ArtMP-Spektren mit denen des ArtP-Proteins wurde eine Zuordnung

der Tyrosinsignale zu den Membranprotein-Untereinheiten des Transportkomplexes möglich.

4.4 NMR-spektroskopische Untersuchungen an ArtJ

Das Substrat-Bindeprotein ArtJ des ABC-Transporters ArtMP aus *G. stearothermophilus* wurde im gelösten Zustand NMR-spektroskopisch untersucht. Lösungs-NMR-Spektroskopie kann genutzt werden, um konformationelle Veränderungen als Folge von dynamischen Prozessen und Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu studieren. Die im Rahmen dieser Arbeit an dem ^{15}N -markierten Substrat-Bindeprotein durchgeführten NMR-Messungen dienten dazu, die konformationellen Auswirkungen einer Substratbindung und der Interaktion zwischen ArtJ und den Membranproteinen des ABC-Transporters zu untersuchen und zu veranschaulichen.

Die Resonanzsignale in den vom ^{15}N -markierten ArtJ aufgenommenen 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren waren gut aufgelöst. Im Rahmen einer NMR-Messreihe wurde zu der ArtJ-Probe nacheinander das Substrat Arginin, der ABC-Transportkomplex ArtMP und ATP/MgCl₂ zugegeben und jeweils ein HSQC-Spektrum aufgenommen. Über einen Vergleich der Änderung der chemischen Verschiebung in den erhaltenen Spektren wurde der Einfluss der zugegebenen Substanzen und Proteine auf die Konformation des Bindeproteins untersucht. Eine Verschiebung der Signale im Spektrum zeigte strukturelle Veränderungen innerhalb von ArtJ an, die durch Substrat-Protein- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen hervorgerufen wurden.

De- und Renaturierungsexperimente an ArtJ in Kombination mit Lösungs-NMR-Spektroskopie ergaben, dass das Bindeprotein bereits im Substrat-beladenen Zustand präpariert wurde. Möglicherweise wird durch die Komplexierung des Substrats die Stabilität des Proteins erhöht. Da das ArtJ, das für die NMR-Messreihe genutzt wurde, also bereits Substrat-beladen war, blieb eine zusätzliche Arginin-Zugabe ohne Auswirkungen auf die Konformation des Proteins.

Nach der Zugabe des in Detergenz gelösten ABC-Transporters ArtMP zu dem Substrat-beladenen Bindeprotein war eine deutliche Abnahme der Signalintensitäten im Spektrum festzustellen. Diese Veränderung der Signale kann verschiedene Gründe haben. Zum einen können durch den Zusatz des Komplexes Bedingungen wie der pH-Wert oder die Temperatur in der NMR-Probe verändert worden sein, woraufhin sich die

Intensität der Signale änderte. Zum anderen könnten die Signaländerungen auch auf Wechselwirkungen zwischen dem Substrat-Bindeprotein und dem Proteinkomplex zurückzuführen sein. Ein Teil der ArtJ-Proteine kontaktiert dabei die Membranproteine des ABC-Transporters, ein Teil bleibt frei gelöst. Zwischen der gebundenen und der freien Form findet ein Austausch statt, der auf eine schwache Assoziation hinweist. Dieser Austausch führt zu einer Verbreiterung der Linien und somit zu einer Abnahme der Signalintensitäten im 2D-NMR-Spektrum. Der lediglich schwache Kontakt zwischen Bindeprotein und den Membranproteinen des Komplexes beruht möglicherweise darauf, dass sich der ABC-Transporter ohne ATP im Ruhezustand befindet und nicht bereit für den Substrattransport ist. Mit Hilfe dieser NMR-Messung wäre es somit möglich, die kurzen Wechselwirkungen zwischen dem Substrat-beladenen Bindeprotein ArtJ und den Membranprotein-Untereinheiten des ABC-Transporters ArtMP anhand von Signalveränderungen im NMR-Spektrum zu verfolgen.

In der letzten NMR-Messung wurde der Transporter und damit der Translokationsvorgang durch die Zugabe von ATP/MgCl₂ energetisiert und die Auswirkungen auf die Konformation von ArtJ analysiert. Die Zugabe von ATP/MgCl₂ zu dem Substrat-beladenen Bindeprotein und dem ABC-Transporter im Ruhezustand bewirkte deutliche Signalverschiebungen im HSQC-Spektrum. Diese wurden vermutlich durch die ATP-Bindung und -Hydrolyse an den NBDs des Komplexes hervorgerufen. Zwischen den Untereinheiten des Transporters und dem Substrat-Bindeprotein fand sehr wahrscheinlich eine Signalübertragung statt. Dabei wurde das Ereignis der Nukleotid-Bindung an den NBDs über verschiedene Konformationsänderungen innerhalb des Komplexes an das Bindeprotein weitergeleitet. Anhand der Kristallstruktur des Maltose-Transporters mit gebundenem Maltose-Bindeprotein (MBP) (Abbildung 8; Oldham *et al.*, 2007) kann der Ablauf dieser Signalübertragung und die im NMR-Spektrum von ArtJ beobachteten konformationellen Veränderungen veranschaulicht und erklärt werden. Die Struktur zeigt das ABC-Transportsystem MBP-MalFGK₂ in einem Intermediärzustand des Translokationsvorgangs. Die NBDs haben ATP gebunden und bilden ein geschlossenes Dimer. Diese Dimerisierung führt zu Konformationsänderungen in den TMDs, wodurch deren Bindestellen für das Substrat zugänglich werden. Das Bindeprotein kontaktiert die Membranprotein-Untereinheiten des Transportkomplexes, resultierend in Konformationsänderungen im Protein, die zu einem Öffnen der Domänen des Bindeproteins und damit zur Entlassung des Substrats führt. Demzufolge spiegeln die

Signalverschiebungen im HSQC-Spektrum von ^{15}N -ArtJ, die nach der Zugabe von ATP zu dem ArtMP/Arginin/ArtJ auftraten, möglicherweise die Konformationsänderungen des Bindeproteins wider, die durch den Kontakt mit den TMDs des ABC-Transporters nach ATP-Zugabe hervorgerufen wurden.

Die NMR-spektroskopischen Messungen am Bindeprotein ArtJ ermöglichten die Untersuchung und Visualisierung von Wechselwirkungen zwischen dem Bindeprotein und den Membranproteinen von ArtMP sowie der Signalübertragung zwischen den Untereinheiten des ABC-Transportsystems. Mit einer sequentiellen Zuordnung der einzelnen Aminosäuren können zukünftig Reste und Bereiche im Protein bestimmt werden, die an diesen Wechselwirkungen beteiligt sind.

Zusammenfassung

ATP-binding cassette (ABC)-Transporter sind ubiquitäre Membranproteine, die die Hydrolyse von ATP mit der Translokation verschiedenster Substrate über biologische Membranen koppeln. Sie sind an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Ein Verständnis des komplexen Translokationsvorgangs setzt Kenntnisse zur Funktion und Struktur dieser ABC-Transportsysteme voraus. In der vorliegenden Dissertation wurden erste strukturelle Untersuchungen mit der NMR-Spektroskopie an dem ABC-Transportsystem ArtMP-J aus *G. stearothermophilus* mit dem Ziel durchgeführt, die Grundlage für weiterführende NMR-Strukturstudien zu schaffen, welche langfristig zur Aufklärung der molekularen Mechanismen dieser Transporter beitragen sollen.

Das prokaryotische ABC-Transportsystem ArtMP-J ist verantwortlich für den Import von basischen Aminosäuren in die Zelle. Dieser Transporter wurde als Modellsystem für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen ausgewählt, da er einen symmetrischen Komplex aus je zwei homodimeren Transmembran-Domänen ArtM und Nukleotid-Bindedomänen ArtP bildet. Zu dem Transportsystem gehört das extrazelluläre Substrat-Bindeprotein ArtJ.

Der ABC-Transporter ArtMP und das isolierte ArtP-Protein aus *G. stearothermophilus* wurden mittels Festkörper-MAS-NMR strukturell untersucht. ArtMP und ArtP wurden für diese ersten strukturellen Studien jeweils im Nukleotid-gebundenen und -freien Zustand hergestellt. Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden in den Proteinen selektiv Prolin, Tyrosin und Threonin mit ^{13}C -, ^{15}N -markiert. Daraus ergaben sich sequentielle Paare markierter Aminosäuren, die zugeordnet werden konnten und als Monitore innerhalb der Proteine dienten. Diese Monitore ermöglichten einen Einblick in die Konformationsänderungen, die durch die Nukleotid-Bindung in ArtMP und ArtP hervorgerufen werden.

Als Vorbereitung für die NMR-Messungen wurde die Präparation und Rekonstitution von ArtMP an die Anforderungen der Festkörper-MAS-NMR angepasst und optimiert. Für die NMR-spektroskopischen Studien befand sich der Transportkomplex in seiner natürlichen Lipidumgebung, indem ArtMP in extrahierte Lipide von *G. stearothermophilus* rekonstituiert wurde. Dabei sollte der Proteinkomplex für die Strukturuntersuchungen mit der Festkörper-MAS-NMR in den Lipidmembranen dicht und kristallin angeordnet vorliegen. Der Vorteil der Verwendung von 2D-

Kristallen liegt in der hohen Proteinkonzentration, die so in der NMR-Probe erreicht wird und dem daraus resultierenden guten Signal-Rausch-Verhältnis im Spektrum. Durch eine systematische Variation verschiedener Kristallisationsparameter wurden geeignete Bedingungen zur Ausbildung von ArtMP-2D-Kristallen mit und ohne ATP-Zugabe gefunden. Die zweidimensionale Kristallisation des Komplexes mit und ohne Nukleotid im Ansatz ergab zwei unterschiedliche Formen von ArtMP-2D-Kristallen. In Abwesenheit von ATP lagerten sich die Lipidschichten, in denen ArtMP eingebaut vorlag, zu vielschichtigen Membranstapeln zusammen, wohingegen sich mit ATP Lipidvesikel mit großen kristallinen Bereichen ausbildeten. Beide 2D-Kristallformen zeigten gut aufgelöste Spektren.

Parallel zu den Untersuchungen am ArtMP-Komplex wurde das lösliche ABC-Protein ArtP separat präpariert und erfolgreich dreidimensional kristallisiert. Die anschließend aufgenommenen NMR-Spektren der 3D-Kristalle wiesen eine gute Signalauflösung auf und zeigten den Erfolg der selektiven ^{13}C -, ^{15}N -Markierung ausgewählter Aminosäuren des Proteins. Durch eine Kombination der *proton-driven-spin-diffusion* (PDS)-Spektren mit *rotational-echo-double-resonance* (REDOR)-Experimenten an ArtP wurden zwei Aminosäure-Paare sequentiell zugeordnet: Tyrosin-133/Prolin-134 und Prolin-134/Threonin-164 und zusätzlich dazu das Tyrosin-213. Über den Vergleich der ArtMP- mit den ArtP-Spektren wurden die erhaltenen Zuordnungen übertragen und die Signale, die zu den TMDs gehören, identifiziert. In den Spektren von ArtP im Nukleotid-gebundenen Zustand war außerdem eine Aufspaltung des Signals von Tyrosin-213 sowie Austauschsignale nahe der Diagonalen zu beobachten.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ersten NMR-spektroskopischen Untersuchungen an dem ABC-Transportsystem ArtMP-J und seinen Komponenten schloss strukturelle Studien am zugehörigen Substrat-Bindeprotein ArtJ ein. Mit Hilfe der Lösungs-NMR-Spektroskopie wurden Wechselwirkungen des Proteins mit den Membranuntereinheiten des Komplexes und seinem Substrat untersucht. Die NMR-spektroskopischen Messungen an ArtJ ermöglichten außerdem, die Signalübertragung zwischen den Untereinheiten bzw. Komponenten des ABC-Transportsystems zu betrachten. Hierzu wurden die Änderungen der ^1H - und ^{15}N -chemischen Verschiebungen des löslichen Bindeproteins beobachtet, die durch die Zugabe verschiedener Komponenten des Transportkomplexes hervorgerufen wurden. In Abwesenheit von ATP ist lediglich eine schwache Interaktion von ArtJ zu den TMDs

des Komplexes festzustellen. Die Zugabe von ATP zu dem Transportsystem ArtMP-J mit Substrat resultierte in deutlichen Verschiebungsänderungen im Bindeprotein, die im NMR-Spektrum zu beobachten waren. Das verdeutlicht die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten des ABC-Transporters ArtMP und dem Bindeprotein ArtJ. Zukünftig sollte es über eine sequentielle Zuordnung der einzelnen Aminosäuren möglich sein, die an den Interaktionen beteiligten Reste und Bereiche im Protein zu bestimmen.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand darin, ein Modellsystem der ABC-Transporter-Familie für die NMR-Spektroskopie zu etablieren, um so die Grundlage für weiterführende strukturelle Studien zu schaffen und zur Aufklärung des komplexen Translokationsvorgangs dieser Systeme beizutragen.

Summary

ATP-binding cassette (ABC) transporters are ubiquitous membrane proteins that couple the energy of ATP hydrolysis to the translocation of diverse substrates across biological membranes. They are involved in many physiological and pathophysiological processes. The understanding of the complex translocation mechanism requires the knowledge of both the function and the structure of the ABC-transport systems. This thesis describes first structural studies by NMR spectroscopy of the ABC-import system ArtMP-J from the thermophilic organism *G. stearothermophilus* in order to gain structural insights into the molecular mechanisms and interactions of ABC transporters.

The prokaryotic ABC transport system ArtMP-J from *G. stearothermophilus* is involved in the import of basic amino acids. The symmetric complex ArtMP consists of two homodimeric transmembrane domains ArtM and two homodimeric nucleotide binding domains ArtP. The symmetry and the small size make this transporter an ideal model system for structural analyses by NMR-spectroscopy. Additionally the transport system contains the periplasmic binding protein ArtJ, which is responsible for substrate specificity.

ArtMP and isolated ArtP from *G. stearothermophilus* were structurally analysed by solid-state magic-angle-spinning (MAS) NMR. In recent years solid-state MAS NMR-spectroscopy has emerged as a method for structural studies of large proteins and membrane proteins. Solid-state NMR experiments on membrane proteins require reconstitution of purified and isotopically labelled proteins in a membrane environment at high density or three-dimensional crystals of soluble proteins. For these structural NMR-studies both ArtMP and ArtP were prepared in nucleotide-bound or unbound state and selectively isotopically ^{13}C -, ^{15}N -labelled with the amino acids proline, tyrosine and threonine. Therefore a few sequential pairs of labelled amino acids occurred, which were used to monitor structural changes in the proteins and could be assigned.

Therefore, initially, conditions for the preparation of ArtMP and ArtP were determined and optimized. In order to characterize the protein complex in more detail, the ATPase-activity and the stability under several experimental conditions were studied. ArtMP was reconstituted in its native environment using lipids extracted from the host strain *G. stearothermophilus*. A two-dimensional (2D) crystallization screen was performed. The 2D crystallization with and without ATP resulted in two different shapes of ArtMP 2D crystals when studied by electron microscopy: in the absence of

the nucleotide large multilayered structures were formed whereas with ATP the 2D crystals had the shape of vesicles with large regions of lattice-like patches. The solid-state NMR-measurements of these ArtMP-crystals generated spectra with good resolution whereas best spectra were obtained for the nucleotide-bound ArtMP.

Additionally, the isolated ArtP domain was prepared and three-dimensionally (3D) crystallized for solid-state MAS NMR-experiments. The recorded NMR spectra of the ArtP 3D crystals were of high quality with good resolution. Taking advantage of the reduced number of labelled residues two pairs of amino acids were sequence-specifically assigned: Y133/P134 and P163/T164. Furthermore Y213 could also be assigned. In the spectra of ArtP in the nucleotide-bound state an interesting chemical shift change was observed for the C α -C β signal of Y213: the presence of ATP, which was not hydrolyzed during crystallization, lead to chemical shift changes, the doubling of signals and the occurrence of exchange peaks at the diagonal.

Structural studies were also performed on the substrate-binding protein, ArtJ, using solution-state NMR. The aim of these NMR measurements was to gain insight into the dynamics and interactions of ArtJ with the transported substrate and the membrane domain of the ABC transporter. The NMR spectrum recorded without ATP showed the substrate binding protein to be in weak association with the transmembrane domains of the transporter. However, the addition of ATP induced large conformational changes in the binding protein, as indicated by significant chemical shift changes. This is thought to be the result of interactions between the components of the transport system. In the future a sequential assignment of the protein enables the determination of amino acids and regions in the protein, which are involved in the protein-protein or protein-ligand contacts.

The aim of this thesis was to establish a model system of the ABC-transporter-family for NMR-investigations. The results of this work enable further structural studies of ABC transporters by NMR to get insights into the molecular mechanism and the complex transport cycle.

Literaturverzeichnis

Abraham, A. (1961). The principles of nuclear magnetism. *Oxford University Press*, London.

Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Clement IV, J. P., Boyd III, A. E., Gonzales, G., Herrera, H., Nguy, K., Bryan, J. and Nelson, D. A. (1995) Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**: 423 – 426.

Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N.F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K.-L., Lewis, R.A., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M., and Lupski, J.R. (1997) A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (*ABCR*) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nature genetics* **15**: 236 – 240.

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

Ames, G.F.-L., Nikaido, K., Wang, I.X., Liu, P.-Q., Liu, C.E. and Hu, C. (2001). Purification and characterization of the membrane-bound complex of an ABC transporter, the histidin permease. *J. Bioen. Biom.* **33**: 79-92.

Andronesi, O.C. Becker, S., Seidel, K., Heise, H., Young, H.S. and Baldus, M. (2005). Determination of membrane protein structure and dynamics by magic-angle-spinning solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 12965-12974.

Appleyard, A.N., Herbert, R.B., Henderson, P.J., Watts, A. and Spooner P.J. (2000). Selective NMR observation of inhibitor and sugar binding to the galactose-H(+) symport protein GalP, of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1509: 55-64.

Azarian, S. M. and Travis, G. H. (1997) The photoreceptor rim protein is an ABC-Transporter encoded by the gene for recessive Stargardt's disease (*ABCR*). *FEBS-Lett.* **409**: 247 - 252

Basting, D., Lehner, I., Lorch, M. and Glaubitz, C. (2006). Investigating transport proteins by solid state NMR. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **372**: 451-464.

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

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.

Borths, E. L., Locher, K. P., Lee, A. T. and Rees, D. C. (2002). The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**: 16642-16647.

Brookes, P.S., Pinner, A., Ramachandran, A., Coward, L., Barnes, S., Kim, H. and Darley-USmar, V.M. (2002). High throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: A tool for functional proteomics of mitochondria and signalling complexes. *Proteomics* **2**: 969-977.

Buswell, J.A. and Twomey, D.G. (1975). Utilization of phenol and cresols by *Bacillus stearothermophilus*, strain PH24. *J. Gen Microbiol* **87**: 377-379.

Canet, D. (1991). NMR-Konzepte und Methoden, *Springer Berlin*.

Card, G. L. (1973). Metabolism of phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and cardiolipin of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **114**: 1125-1137.

- 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.
- Cavanagh, W.J., Fairbrother, A.G., Palmer, III and Skelton, N.J. (1996).** Protein NMR spectroscopy: Principles and Practice. *Academic Press Inc.*, San Diego.
- Chang, G., Roth, C. B., Reyes, C. L., Pornillos, O., Chen, Y. J. and Chen, A. P. (2006).** Retraction. *Science* **314**: 1875-77.
- 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.
- Clarke, T. E., Ku, S.Y., Dougan, D. R., Vogel, H. J. and Tari, L. W. (2000).** The structure of the ferric siderophore binding protein FhuD complexed with gallichrome. *Nat Struct Biol* **7**: 287-291.
- Collins, F. S. (1992).** Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* **256**: 774 – 779.
- Cornelius F. (1991).** Functional reconstitution of the sodium pump. Kinetics of exchange reactions performed by reconstituted Na/K-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. **1071**: 19–66.
- Das, R. and Gerstein, M. (2000).** The stability of thermophilic proteins: a study based on comprehensive genome comparison. *Funct. Integr. Genomics* **1**: 76-88.
- Dassa, E. and Hofnung, M. (1985)** Sequence of the gene *malG* in *E.coli* K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. *EMBO J.* **4**: 2287 – 2293.
- Davidson, A. L., Laghaecian, 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. (2002).** Mechanism of coupling of transport to hydrolysis in bacterial ATP-binding cassette transporters. *J Bacteriol* **184**: 1225-1233.
- Dawson, R. J. P. and 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 letters* **581**: 935-938.
- Dean, D. A., Hor, L.-L., Shuman, H. A. and Nikaido, H. (1992)** Interaction between maltose-binding protein and the membrane associated maltose transporter complex in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**: 2033 – 2040.
- Diederichs, K., Diez, J., Greller, G., Müller, C., Breed, J., Schnell, C., Vornheim, C., Boos and W., Welte, W. (2000)** Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC-Transporter of the archeon *Thermococcus litoralis*. *EMBO J.* **19**: 5951 – 5961.
- Diehl, P., Fluck, E., Günther, H., Kosfeld, R. and Seelig, J. (1994).** NMR-basic Principles and Progress. Volume 31: Solid-State NMR II, Inorganic Matter, *Springer Berlin*.
- Dolder, M., Engel, A. and Zulauf, M. (1996).** The micelle to vesicle transition of lipids and detergents in the presence of a membrane protein: towards a rationale for 2D crystallization. *FEBS Lett.* **382**: 203-208.
- Drenth, J., (1999).** Principles of protein X-ray crystallography (2nd edition). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Elferink, M.G.L., Albers, S.-V., Konings, W.N. and Driessen, A.J.M. (2001).** Sugar transport in *Sulfolobus solfataricus* is mediated by two families of binding protein-dependent ABC-transporters. *Mol. Microbiol.* **39**: 1494-1503.
-

- Engelhardt, G. and Michel, D. (1987).** High Resolution Solid-State NMR of Silicates and Zeolites. Wiley, New York.
- Ernst, R.R. and Anderson, W.A. (1966).** Sensitivity Enhancement in Magnetic Resonance. *Rev. Sci. Instrum.* **37**: 99-102.
- Ernst, R.R., Bodenhausen, G. and Wokaun, A. (1987).** Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two Dimensions. Clarendon Press, Oxford.
- Ernst, R.R. (1992).** Nobel lecture. Nuclear magnetic resonance Fourier transform spectroscopy. *Biosci Rep* **12**: 143-187.
- Fetch, E. E. and Davidson, A. L. (2002).** Vanadate-catalysed photocleavage of the signature motif of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 9685-9690.
- Fleischer, R. (2003).** Optimierung der Reinigung und Rekonstitution eines potentiellen ABC-Transporters (YqiXYZ) für Asparagin und Aspartat aus *Geobacillus stearothermophilus* (DSM13240). Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- 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.
- 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.
- Gilson, E., Alloing, G., Schmidt, T., Claverys, J.-P., Dudler, R. and Hofnung, M. (1988)** Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in Gram-positive bacteria and in Mycoplasma. *EMBO J.* **7**: 3971 - 3974
- Glaubitz, C., Groger, A., Gottschalk, K., Spooner, P., Watts, A., Schuldiner, S. and Kessler, H. (2000).** ³¹P-CP-MAS-NMR studies on TPP⁺ bound to the ion-coupled multidrug transport protein EmrE. *FEBS Lett.* **480**: 127-131.
- Goto, N. K. and Kay, L. E. (2000).** New developments in isotope labelling strategies for protein solution NMR spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 585-592.
- Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1993)** Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 385 – 427
- Gullion, T. & Schaefer, J. (1989).** Rotational-Echo Double-Resonance NMR. *J. Magn. Reson.* **81**, 196-200.
- Hanekop, N., Zaitseva, J., Jenewein, S., Holland, I. B. and Schmitt, L. (2005).** Molecular insights into the mechanism of the ATP-hydrolysis by the NBD of the ABC-transporter HlyB. *FEBS Letters*, **580**: 1036-1041.
- Hanrahan, J.W., Gentsch, M. and Riordan, J.R. (2003).** The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ABCC7). In Holland, I.B., Cole, S.P., Kuchler, K. and Higgins, C.F. (eds.), *ABC proteins from bacteria and man*. Academic Press, Amsterdam.
- Harwood, C. R. and Cutting, S. M. (1990).** Molecular biological methods for *Bacillus*. John Wiley & sons. Ltd.
- Hasler, L., Heymann, J.B., Engel, A., Kistler, J. and Walz, T. (1998).** 2D crystallization of membrane proteins: Rationals and Examples. *J. Struct. Biol.* **121**: 162-171.
- Hiller, M., Krabben, L., Vinothkumar, K. R., Castellani, F., v. 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.
-

- 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 microorganism to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **81**: 67 - 113
- Higgins, C. F. and Linton, K. J. (2004).** The ATPswitch model for ABC-Transporters. *Nature* **11** (10): 918-926.
- Hirano, T. (2006).** At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 311-322.
- Hobson, A. C., Weatherwax, R. and Ames, G. F.-L. (1984).** ATP-binding sites in the membrane components of the histidin permease, a periplasmic transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 7333-7337.
- 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.
- 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.
- Hopfner, K. P., Karcher, A., Shin, D. S., Craig, L., Arthur, L. M., Carney, J. P. and Tainer, J. A. (2000).** Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* **101**: 789-800.
- Hosie, A.H.F. and Poole, P. S. (2001).** Bacterial ABC-Transporters of amino acids. *Res. Microbiol.* **152**: 259-270.
- Hunke, S., Dröse, S. and Schneider, E. (1995).** Vanadat and bafilomycin A1 are potent inhibitors of the ATPase activity of the reconstituted bacterial ATP-binding cassette transporter for maltose (MalFGK₂). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**: 589-594.
- Hunke, S., Mourez, M., Jèhanno, M., Dassa, E. and Schneider, E. (2000b).** ATP modulates subunit-subunit interactions in an ATP-binding cassette transporter (MalFGK₂) determined by site-directed chemical crosslinking. *J. Biol. Chem.* **275**: 15526-15534.
- 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*, DOI: 10.1126/ science.1145950.
- 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
- Inagaki, N., Gono, T., Clement, J.P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S. and Bryan, J. (1995).** Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**: 1166-1170.
- Jaroniec, C.P., Tounge, B.A., Rienstra, C.M., Herzfeld J. and Griffin R.G. (2000).** Recoupling of Heteronuclear Dipolar Interactions with Rotational-Echo Double-Resonance at High Magic-Angle Spinning Frequencies. *J. Magn. Reson.*, **146**: 132-139.
- 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. *PNAS* **101**: 711-716.
-

- Jones, P.M. and George, A.M. (2004). The ABC-Transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci* **61**: 682-699.
- Jurado, A.S., Pinheiro, T.J. and Madeira, V.M. (1991). Physical studies on membrane lipids of *Bacillus stearotherophilus* temperature and calcium effects. *Arch. Biochem. Biophys.* **289**: 167-179.
- Karpowich, N. K., Huang, H. H., Smith, P. C. and Hunt, J. F. (2003). Crystal structures of the BtuF periplasmic-binding protein for vitamin B12 suggest a functionally important reduction in protein mobility upon ligand binding. *J Biol Chem*, **278**: 8429-8434.
- Kessler, H., Gehrke, M. and Griesinger, C. (1988). Angewandte Chemie. *Angew. Chem.* **100**: 507-554.
- Klammt, C., Lohr, F., Schafer, B., Haase, W., Dotsch, V., Ruterjans, H., Glaubitz, C. and Bernhard, F. (2004). High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **271**: 568-580.
- Krämer, R. (1994) Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. *Biochem. Biophys. Acta* **1185**: 1 – 34
- Lacapère, J.J., Stokes, D.L., Olofsson, A. and Rigaud, J.L. (1998). Two-dimensional Crystallization of Ca-ATPase by Detergent Removal. *Biophys. J.*, **75**: 1319-1329
- 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.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (1998). Prinzipien der Biochemie. *Spektrum Akad. Verlag*.
- Lewitt, M.H. (2001). Spin Dynamics – Basics of Nuclear Magnetic Resonance. *Wiley*, Chichester.
- Linton, K. J. (2007). Structure and function of ABC-Transporters. *Physiology* **22**: 122-130.
- Linton, K. J. and Higgins, C. F. (1998). The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol.* **28**: 5-13.
- Linton, K. J. and Higgins, C. F. (2006). Structure and function of ABC-Transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* **453**: 555-567.
- Liu, C. E., Liu, P.-Q. and Ames, G. F.-L. (1997). Characterization of the adenosine triphosphatase activity of the periplasmic histidine permease, a traffic ATPase (ABC-Transporter). *J. Bio. Chem.* **35**: 21883-21891.
- Liu, P-Q and Ames, F.-L. (1998). *In vitro* disassembly and reassembly of an ABC transporter, the histidin permease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 3495-3500.
- Locher, K. P., Lee, T.L., Rees, D.C., (2002). The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC-Transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**: 1091-1098.
- Locher, K. P. and Borths, E. (2004). ABC-Transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF. *FEBS letters* **564**: 264-268.
- Lorch, M., Fahem, S., Kaiser, C., Weber I., Mason, A. J., Bowie, J. U., Glaubitz, C. (2005a). 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.
- Lorch, M., Lehner, I., Siarheyeva, A., Basting, D., Pflieger, N., Manolikas, T. and Glaubitz, C. (2005b). NMR and fluorescence spectroscopy approaches to secondary and primary active multidrug efflux pumps. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 873-877.
-

- Mäder, U., Henning, S., Hecker, M. and Homuth, G. (2004).** Transcriptional organization and posttranscriptional regulation of the *Bacillus subtilis* branched-chain amino acid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **186**: 2240-2252.
- Macara, I. G. (1980).** Vanadium- an element in search of a role. *TIBS Rev.*; 92-94.
- Marley, J., Lu, M. and Bracken, C. (2001).** A method for efficient isotopic labelling of recombinant proteins. *J. Biomol. NMR.* **20**:71-75
- Mason, A. J., Sjarheyeva, A., Haase, W., Lorch, M., van Veen, H. and Glaubitz, C. (2004).** Amino acid type selective isotope labelling of the multidrug ABC-Transporter LmrA for solid-state NMR studies. *FEBS Lett.* **568**: 117-121.
- Matsuo, M., Ueda, K., Ryder, T. and Ashcroft, F. (2003).** The sulfonylurea receptor: an ABCC transporter that acts as an ion channel regulator. In Holland, I.B., Cole, S.P., Kuchler, K. and Higgins, C.F. (eds.), *ABC proteins from bacteria to man*. Academia Press, Amsterdam.
- Miller, J. H. (1992).** 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.*
- Miroux, B. & Walker, J. E. (1996).** Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**: 289-298.
- Moody, J.E., Millen L., Binns, D., Hunt, J.F. and Thomas, P.J. (2002).** Cooperative ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem* **277**: 21111-4.
- Mosser, J., Douar, A.-M., Sarde, C.-O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A. M., Mandel, J. L. and Aubourg, P. (1993)** Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC-Transporters. *Nature* **361**: 726 - 730
- 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
- Nikaido, H. and Vaara, M. (1985)** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**: 1 - 32
- Nikaido, H., (1994).** Porins and specific diffusions channels in bacteria outer membranes. *J. Biol. Chem.*, **269**: 3905-3908.
- 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
- 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 uzenensis* sp. Nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermoatenuatus*, *Bacillus thermoaleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermoatenuatus*, *Geobacillus thermoaleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Environ. Microbiol.* **51**: 433-446.
- Oldham, M.L., Khare, D., Quioco, F.A., Davidson, A.L. and Chen, J. (2007).** Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature* **450**: 515-521.
- Parrett, K. G., Mehari, T., Warren, P. G. and Golbeck, J. H. (1989).** Purification and properties of the intact p-700 and Fx-containing Photosystem I core protein. *Biochim. Biophys. Acta* **973**: 324-332.
-

- Patching, S. G., Brough, A. R., Herbert, R. B., Rajakarier, J. A., Henderson, P. J. and Middleton, D. A. (2004a). Substrate affinities for membrane transport Proteins determined by ^{13}C cross-polarization magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 3072-3080.
- Perego, M., Higgins, C. F., Pearce, S. R., Gallagher, M. P. and Hoch, J. A. (1991) The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* **5**: 173 – 185.
- 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.
- Procko, E., Ferrin-O'Connell, I., Ng, S.L. and Gaudet, R. (2006). Distinct structural and functional properties of the ATPase sites in an asymmetric ABC-Transporter. *Mol Cell* **24**: 51-62.
- Purcell, E.M., Torrey, H.C., Pound, C.V. (1946). *Phys. Rev.* **69**: 37-38.
- Quioco, F. A. and Ledvina, P. S. (1996) Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.* **20**: 17 – 25.
- Quioco, F. A., Spurlino, J. C. and Rodseth, L. E. (1997) Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor. *Structure* **5**: 997 – 1015.
- Rémigy, H.-W., Caujolle-Bert, D., Suda, K., Schenk, A., Chami, M. and Engel, A. (2003). Membrane protein reconstitution and crystallization by controlled dilution. *FEBS Letters* **555**: 160-169. `
- Rémigy, H.-W., Stahlberg, H., Fotiadis, D., Müller, S.A., Wolpensinger, B., Engel, A. Hauska, G., Tsiotis, G. (1999). The reaction complex from the green sulfur bacterium *Chlorobium teptidum*: a structural analysis by scanning transmission electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **290**: 851-858.
- Rienstra, C.M., Tucker-Kellogg, L., Jaroniec, C.P., Hohwy, M., Reif, B., McMahon, M.T., Tidor, B., Lozano-Pérez, T. and Griffin, R.G. (2002). De novo determination of peptide structure with solid-state magic-angle spinning NMR spectroscopy. *PNAS* **99**: 10260-10265.
- Rigaud, J.-L., Pitard, B. and Levy, D. (1995). Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1231**: 223-246.
- Rigaut, J.-L. (2002). Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2D crystals. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**: 753-766.
- Riggs, M. G. and MacLachan, A. (1986) A simplified screening procedure for large number of plasmid mini-preparation. *BioTechniques* **4**: 310 – 313.
- Saier, M.H. Jr. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. 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.*
- Saurin, W., Köster, W. and Dassa, E. (1994) Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Mol. Microbiol.* **12**: 993 - 1004
- Schabert F. A., Henn, C. and Engel, A. (1995). Native *Escherichia coli* OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy. *Science*, **268**: 92-94.
- Schäffer, C., Wugedisch, T., Kählig, H., Scheberle, 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 Glucocardiolipins from *Geobacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a. *J. Bacteriol.* **184**: 6709-6713.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**; 223-231
- Schägger, H., Cramer, W.A. and von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membran-Protein Complexes by 2-Dimensional Native Elektrophoresis. *Analytical Biochemistry* **217**: 220-230.
- Schmees, G., Stein, A., hunke, S., Landmesser, H. and Schneider, E (1999). Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein MalK. *Eur. J. Biochem.* **266**: 420-430.
- Schmitt, L., Benabdelhak, H., Blight, M. A., Holland, I. B. and Stubbs, M. T. (2003). Crystal structure of the ABC-domain of the ABC-transporter HlyB: identification of a variable region within the helical domain of ABC-domains. *J. Mol. Biol.*, **330**: 333-342.
- 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. (2003) in: ABC-Proteins: from bacteria to man, Holland, E. B., Cole, S., Kuchler, K. and Higgins, C. eds., pp. 157-185. Academic Press.
- Seidel, K., Etzkorn, M., Heise, H., Becker, S. and Baldus, M. (2005). High-resolution solid-state NMR studies on uniformly [¹³C, ¹⁵N] labelled ubiquitin. *Chembiochem* **6**: 1638-1647.
- Sharff, A. J., Rodseth, L. E., Spurlino, J. C. and Quioco, F. A. (1992). Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry*, **31**: 10657-10663.
- 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.
- Spooner, P.J.R., Watts, A. and Henderson, P.J.F. (1993). Magic-angle spinning NMR-studies on the galactose-H⁺ symport protein of *Escherichia coli*. *Biophys J* **64**:A51-A51.
- Spooner, P.J.R., Rutherford, N.G., Watts, A. and Henderson, P.J.F. (1994a). NMR observation of substrate in the binding site of an active sugar-H⁺ symport protein in native membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 3877-3881.
- Spooner, P.J.R., O'Reilly, W.J., Homans, S.W. Rutherford, N.G., Henderson, P.J.F. and Watts, A. (1998). Weak substrate binding to transport proteins studied by NMR. *Biophys J* **75**: 2794-2800.
- Stenech, J., Roe, B.A. and Snyder, T.L. (1968). Studies of the DNA from mesophilic and thermophilic bacteria. *Biochem. Biophys. Acta.* **161**: 442-454.
- Stokes, D.L. & Green, N.M. (1990). Three-dimensional crystals of CaATPase from sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* **57**: 1-14.
- Stokes, D.L. & Lacapère, J.-J. (1994). Conformation of Ca²⁺-ATPase in two crystal forms. *J Biol Chem* **269**: 11606-11613.
- Stokes, D.L., Pomfret, A.J., Rice, W.J., Glaves, J.P. and Young, H.S. (2006). Interactions Between Ca²⁺-ATPase and the Pentameric Form of Phospholamban in Two-Dimensional Crystals. *Biophys. J.* **90**:4213-4223.
- Studier, F.W. & Moffat, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
-

- 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.
- van der Heide, T. and Poolman, B. (2000).** Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**: 7102-7106.
- van Veen, H.W., Margolles, A. et al. (2000).** The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *Embo J.* **19** : 2503-14.
- 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
- Walter, C. (1992).** Molekularbiologische Untersuchungen zur Funktion der ATP-bindenden Untereinheiten MalK des Maltose-Transportsystems aus *Salmonella typhimurium*. Dissertation, Universität Osnabrück
- Walz, T., Smith, B. L., Agre, P. and Engel, A. (1994a).** The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin CHIP. *EMBO J.*, **13**: 2985-2993.
- Werten, P. J. L., Rémigy, H.-W., de Groot, B. L., Fotiadis, D., Philippsen, A., Stahlberg, H., Grubmüller, H. and Engel, A. (2002).** Progress in the analysis of membrane protein structure and function. *FEBS letters* **529**: 65-72.
- 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-Proteins from bacteria to man*. Academic Press, Amsterdam.
- Wüthrich, K. (1966).** NMR of Proteins and Nucleic Acids. Wiley, New York.
- Wüthrich, K. (1986).** NMR of Proteins and Nucleic Acids. Wiley, New York.
- Wüthrich, K. (2003).** Nobel lecture. NMR studies of structure and function of biological macromolecules. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 3340-3363.
- Yamaguchi, S., Tuzi, S., Bowie, J.U. and Saito, H. (2004).** Secondary structure and backbone dynamics of *Escherichia coli* diacylglycerol kinase, as revealed by site-directed solid-state C-13 NMR. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1698**: 97-105.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and hosts strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103 – 119
- Young, H.S., J.-L. Rigaud, J.-J. Lacapère, L.G. Reddy, D.L. Stokes. 1997.** How to make tubular crystals by reconstitution of detergent-solubilized Ca²⁺-ATPase. *Biophys. J.* **72**: 2545-2558.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I. B. and Schmitt, L. (2005a).** H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC-Transporter HlyB. *EMBO J.* **24**: 1901-1910.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Oswald, C., Jumpertz, T., Holland, I. B. and Schmitt, L. (2005b).** A molecular understanding of the catalytic cycle of the nucleotide-binding domain of the ABC-Transporter HlyB. *Biochem Soc Trans.* **33**: 990-995.
- Zhang, Z., Feige, N.J., Chang, A.B., Anderson, I.J., Brodianski, V.M., Vitreschak, A.G., Gelfand, M.S. and Saier, M.H., Jr (2003).** A transporter of *Escherichia coli* specific for L- and D-methionine is a prototype for a new family within the ABC superfamily. *Arch. Microbiol.* **180**: 88-100.
-

Zech, S. G., Wand, A. J. and McDermott, A. E. (2005). Protein structure determination by high-resolution solid-state NMR spectroscopy: application to microcrystalline ubiquitin. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 8616-8626.

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Acc. no	Zugangscode (<i>accession number</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CMC	kritische Mizellen Konzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
CTFR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
ddH ₂ O	aqua bidest
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-Maltosid
DM	<i>n</i> -Decyl- β -D-Maltosid
DMPC	Dimyristoyl Phosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxy-Ribonukleinsäure
DOPC	Dioleoyl Phosphatidylcholin
DTM	<i>n</i> -decyl- β -thio-maltopyranoside
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
IMAC	Metall-Affinitätschromatographie (<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl-Thiogalactosid
Kan ^r	Kanamycin-Resistenz
kb	kilo Basen DNA
kDa	kilo Dalton
LDAO	lauryl-N,N-dimethylamin oxid
LPR	Lipid-protein-ratio
LSP	low speed pellet
MAS	Rotation im "magischen" Winkel (<i>magic-angle spinning</i>)
MBP	Maltose-Bindeprotein
NBD	Nukleotid-Bindende Domäne
NG	<i>n</i> -Nonyl- β -D-glukosid
OD	Optische Dichte
OG	<i>n</i> -Octyl- β -D-Glucopyranosid
OTG	Octyl- β ,D-thioglucopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDSO	<i>proton-driven-spin-diffusion</i>
PEP	Phosphoenylpyruvat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
REDOR	Rotational Echo Double Resonance
RNase	Ribonuclease
rpm	<i>rounds per minute</i>
SBP	Substrat-Bindeprotein
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid Elektrophorese
SLS	Natriumlaurylsarkosin (<i>sodium lauryl sarcosine</i>)
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissions Elektronen Mikroskopie
Temed	Tetramethylethyldiamin
Tet ^r	Tetracyclin-Resistenz
TMD	Transmembran Domäne
Tris	Tris(-hydroxymethyl-)aminomethan
UDM	<i>n</i> -Undecyl- β -D-maltopyranosid

Veröffentlichungen

Lange, V., Becker, J., Casagrande, F., Engel, A. and Oschkinat, H.

“Initial assignments of MAS NMR signals of a bacterial ABC transport system and effects of nucleotide binding.”

Manuskript in Vorbereitung.

Postervorträge

Lange, V., Krabben L. und Oschkinat, H. (2004). Preparation and characterization of an ABC transport system for structure determination by solid-state NMR.

Protein summer school, Spetses, Griechenland

Lange, V., Krabben L. und Oschkinat, H. (2004). Preparation and characterization of an ABC transport system for structural analyses by solid-state NMR.

6th MDC/FMP Graduate Student Retreat, Eggersdorf, Deutschland

Lange, V., Krabben L. und Oschkinat, H. (2005). Preparation of an ABC transport system for structural analyses by solid-state NMR.

7th MDC/FMP Graduate Student Retreat “Signal Transduction in Disease”, Strausberg, Deutschland

Lange, V., Krabben L. und Oschkinat, H. (2006). Preparation and 2D crystallization of an ABC transport system for structural analyses by solid-state NMR.

FEBS Special Meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases”, Innsbruck, Österreich

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,

.....
(Vivien Lange)