

**Topologiestudien an der Domäne MPM<sub>C</sub>  
der membranständigen Untereinheit B des  
K<sup>+</sup>-Aufnahmesystems KtrAB aus  
*Vibrio alginolyticus***

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) des Fachbereiches  
Biologie/Chemie an der Universität Osnabrück

vorgelegt von

**Marc Vor der Brüggen**

**Osnabrück, Mai 2007**

**Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.**

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929),  
amerikanischer Soziologe und Ökonom

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
I. Abkürzungsverzeichnis .....	5
II. Zusammenfassung .....	7
1 Einleitung.....	10
1.1 Kalium .....	10
1.2 KcsA-Kanal .....	11
1.3 Die Superfamilie der Kaliumtransportproteine.....	12
1.4 <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	13
1.5 Der Na <sup>+</sup> -abhängige K <sup>+</sup> -Transporter KtrAB aus <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	15
1.6 Die VaKtrA-Untereinheit.....	15
1.7 Die VaKtrB-Untereinheit.....	16
1.7.1 Die M <sub>2C</sub> -Helix .....	18
1.7.2 Die M <sub>2D</sub> -Helix .....	21
1.8 Aufgabenstellung .....	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide .....	23
2.2 Anzuchtverfahren .....	32
2.2.1 Komplementationstest .....	32
2.2.2 Entfernung von Kalium und Natrium aus <i>E. coli</i> Zellen .....	33
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.3.1 Plasmidisolierung.....	33
2.3.2 DNA-Modifikation .....	33
2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	34
2.3.4 DNA-Gelelektrophorese .....	34
2.3.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	34
2.3.6 Kompetente Zellen und Transformation .....	35
2.3.7 DNA-Sequenzanalyse.....	35
2.3.8 Konstruktion der Plasmide .....	36
2.3.8.1 pPAB404-KtrB-Derivate .....	36
2.3.8.2 pJLZ104-KtrB-Derivate .....	36

2.3.8.3 pKT84BamHI 260 bis pKT84BamHI 351 .....	36
2.3.8.4 Sandwichfusionsplasmide pMBPhoA260S bis pMBPhoA351S und pMBLacZ260S bis pMBLacZ351S.....	37
2.3.8.5 KtrB-Einzelcysteinvarianten.....	37
2.3.8.5.1 pKT84-Derivate (pNTCI2 317C bis pNTCI2 333C) .....	37
2.3.8.5.2 pETKtrABH-Derivate (pETC317 bis pETC333) .....	37
2.3.8.5.3 pEL903-Derivate (100-116) .....	37
2.4 Biochemische Methoden .....	38
2.4.1 Überexpression von <i>ktrB</i> -6xHis.....	38
2.4.1.1 pET29b-Derivate.....	38
2.4.1.2 pBAD18-Derivate.....	38
2.4.2 Markierung von Cysteinresten mit Thiolreagenzien in intakten Zellen .....	39
2.4.3 Markierung von Cysteinresten mit einem Methan-Thiosulfonat-Spinlabel.....	39
2.4.4 Reinigung von KtrB-6xHis via NiNTA-Affinitätschromatographie .....	40
2.4.4.1 pET29b-Derivate.....	40
2.4.4.2 pBAD18-Derivate.....	41
2.4.5 Rekonstitution von KtrB-6xHis in polare <i>E.coli</i> Lipide .....	42
2.4.5.1 Vorbereitung der Lipide .....	42
2.4.5.2 Vorbereitung der SM2-BioBeads .....	43
2.4.5.3 Rekonstituion von VaKtrB .....	43
2.4.6 PhoA-Test.....	44
2.4.6.1 PhoA-Plattentest.....	44
2.4.6.2 PhoA-Test in ganzen Zellen.....	44
2.4.7 $\beta$ -Galactosidase-Test.....	45
2.4.7.1 $\beta$ -Galactosidase-Plattentest.....	45
2.4.7.2 Test in ganzen Zellen .....	45
2.4.8 SDS-PAGE .....	46
2.4.9 Immunblot .....	47
2.4.10 Proteinbestimmung nach Lowry mit SDS.....	48
2.4.11 TCA-Fällung.....	48
2.5 Biophysikalische Methoden.....	48
2.5.1 Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Spektroskopie.....	48
2.5.1.1 Mobilitätsanalyse .....	49
2.5.1.2 Analyse der Zugänglichkeiten spinmarkierter Seitenketten für paramagnetische Quencher .....	49

2.5.1.3 Bestimmung der Hyperfeinwechselwirkung durch Tiefentemperaturmessungen .....	49
3 Ergebnisse .....	51
3.1 Untersuchungen an Fusionsproteinen .....	52
3.1.1 PhoA-Fusionen .....	52
3.1.1.1 Terminale PhoA-Fusionen in KtrB .....	53
3.1.1.2 PhoA-Test mit KtrB-Sandwichfusionen .....	58
3.1.1.3 Übersicht über PhoA-Fusionsstudien an KtrB.....	59
3.1.2 LacZ-Fusionen .....	62
3.1.2.1 Terminale LacZ-Fusionen in KtrB .....	62
3.2 Überexpression und Reinigung von KtrB aus <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	65
3.2.1 Fermentation von C43/Rosetta2-pEL903-Derivaten .....	65
3.3 Cystein zugänglichkeiten .....	67
3.3.1 Komplementationsstudien der Einzelcysteinvarianten .....	68
3.3.2 Auswirkung von pH 6,1 und 7,0 auf die Spezifität und Effizienz der Maleimidreaktion mit der Sulfhydrylgruppe.....	69
3.3.3 Cystein zugänglichkeiten im Bereich von M <sub>2C</sub> und dem folgenden cytoplasmatischen Loop von KtrB .....	71
3.3.3.1 Cystein zugänglichkeiten im Bereich von KtrB-M <sub>2C</sub> .....	71
3.3.3.2 Cystein zugänglichkeiten im Bereich der putativen cytoplasmatischen Schlaufe nach M <sub>2C</sub> .....	72
3.3.4 Dynamik von KtrB bei variablen Salzbedingungen .....	73
3.4 Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Spektroskopie .....	76
3.4.1 Spinlabelmarkierung während der Nickelaffinitätschromatographie von VaKtrB im gebundenen Zustand.....	77
3.4.2 ESR-Spektrenübersicht .....	80
3.4.3 Mobilitätsanalysen spinmarkierter Einzelcysteinvarianten im solubilisierten und rekonstituierten Zustand von KtrB.....	82
3.4.4 Charakterisierung der Umgebungspolarität des gebundenen Spinlabels in KtrB-Einzelcysteinvarianten.....	84
3.4.5 Zugänglichkeitsbestimmungen markierter Einzelcysteinvarianten im solubilisierten Zustand sowie ausgewählter rekonstituierter Reste mit Hilfe von Sättigungsmessungen .....	86
4 Diskussion .....	91

4.1 Hat VaKtrB eine MPM-Domänen Struktur? .....	91
4.2 Ergebnisse im Bereich MPM <sub>C</sub> .....	94
4.3 Vergleich der Topologie von VaKtrB im solubilisierten und rekonstituierten Zustand .....	98
4.4 Die Faltung der M <sub>2C</sub> -Helix .....	100
5 Literaturverzeichnis .....	111
6 Publikationen .....	121
Anhang .....	122
Danksagung .....	123
Lebenslauf .....	125
Eidstattliche Erklärung .....	126

# I Abkürzungsverzeichnis

Aa	<i>Aquifex aeolicus</i>
Amp	Ampicillin
amp <sup>R</sup>	plasmidvermittelte Ampicillin-Resistenz
A <sub>zz</sub>	Der A <sub>zz</sub> -Wert ist dabei ein Maß für die Wasserdichte in der Mikroumgebung des Spinlabels.
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Carb	Carbenicillin
CrOx	Chromoxalat
DDM	n-D-β-Dodecylmaltosid
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
HRP	Meerrettichperoxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KTN	<u>K</u> <sup>+</sup> <u>t</u> ransport <u>n</u> ucleotid binding
lt	Tieftemperatur
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonat
NiEDDA	Nickel-Ethylendiamin N,N'-diacetat
MTSSL	(1-Oxyl-2,2,5,5-Tetramethyl-Δ <sup>3</sup> -Pyrrolin-3-Methyl) Methanthiosulfonat-Spinlabel
Ni <sup>2+</sup> -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure ( <u>n</u> ickel- <u>n</u> itrilo- <u>t</u> riacetic <u>a</u> cid)
NBT	4-Nitro-blue-tetrazolium-chlorid
NTA	Triazetonitril
OD <sub>x nm</sub>	optische Dichte bei x nm
ONPG	O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
R1	spinmarkierte Seitenkette einer Einzelcysteinvariante
RCK	„ <u>R</u> egulation of <u>K</u> <sup>+</sup> <u>c</u> hannel (activity)“
rec	rekonstituiert
Rifampicin	3-[4-Methylpiperazinyliminomethyl]-rifamycin
RT/rt	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDSL	<u>S</u> ite <u>d</u> irected <u>S</u> pin <u>l</u> abeling
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Elektrophorese
sol	solubilisiert

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TG	Trockengewicht
ÜN	über Nacht
Va	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Wex	Austauschfrequenz
$\Delta H_{pp}^{-1}$	Mobilitätsparameter (pp = peak to peak)

## II Zusammenfassung

Das Na<sup>+</sup>-abhängige hoch affine K<sup>+</sup>-Aufnahmesystem Ktr aus *Vibrio alginolyticus* setzt sich aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten zusammen. Die membranassoziierte, regulatorische Untereinheit KtrA bindet als Ligand ATP. Die membranintegrale Untereinheit KtrB transloziert die K<sup>+</sup>-Ionen. KtrA vermittelt bei der Bindung an KtrB dem Transportsystem Kaliumselektivität und Geschwindigkeit. Wichtig für diese Arbeit war die Feststellung, dass KtrB auch ohne KtrA aktiv ist, da davon auszugehen ist, dass die Faltung auch im nicht assoziierten Zustand erhalten bleibt. KtrB gehört zu einer Superfamilie von K<sup>+</sup>-Transportern (SKT-Proteine), die vermutlich durch mehrfache Genverdoppelung und Genfusion aus einfachen Kaliumkanälen entstanden. Wichtig für die Strukturvorhersagen der SKT-Proteine war die Kristallstruktur des K<sup>+</sup>-Kanals KcsA aus *Streptomyces lividans*. Der KcsA-Komplex setzt sich aus vier identischen Untereinheiten zusammen, die jeweils zwei Transmembranhelices (M1 und M2) enthalten. Diese beiden Helices werden durch eine bis zur Mitte in die Membran von außen zurückfaltende Struktur verbunden. Hierbei handelt es sich um den sogenannten „P-Loop“, der den K<sup>+</sup>-Selektivitätsfilter (TVGYG) trägt und somit den engsten Durchgang der Pore bildet. Die SKT-Proteine bilden kovalent verbundene Tetramere (M<sub>1</sub>PM<sub>2</sub>)<sub>4</sub>. Bei den Strukturvorhersagen für die Vertreter dieser Superfamilie anhand der KcsA-Topologie fiel im Besonderen die Helix M<sub>2C</sub> durch ihre ungewöhnliche Aminosäuresequenz auf. Der erste hydrophobe Teilabschnitt (M<sub>2C1</sub>) besteht in VaKtrB aus 12 Aminosäuren (302-PALLIMIVLMLI-313) und bildet vermutlich eine α-Helix. Diesem Bereich folgt ein sehr flexibler, hydrophiler Abschnitt (M<sub>2C2</sub>), der voraussichtlich keine helikale Konformation einnehmen kann (314-GAGSTSTGGGIKVST-328). Auffällig ist hierbei, dass in diesem Bereich sehr viele Glycine und andere kleine, teils polare Aminosäuren vorkommen. Der dritte und letzte Bereich (M<sub>2C3</sub>) dieser schwer zu modellierenden Helix zeigt in Topologievorhersagen einen bedingt amphipatischen und α-helikalen Charakter (329-FAVAFMATWTFLL-340). Direkt im Anschluss an diese Sequenz finden sich an den Positionen R341, K343 und K344 drei positiv geladene Aminosäuren, die der „positive inside rule“ entsprechen und deshalb im Cytoplasma lokalisiert sein müssten. Für M<sub>2C</sub> wurden zwei Topologiemodelle vorgeschlagen. Im ersten bilden M<sub>2C1</sub> und M<sub>2C3</sub> die Membranpassage und M<sub>2C2</sub> liegt als Schleife innerhalb der Kavität. Im zweiten Modell bilden M<sub>2C1</sub> und M<sub>2C2</sub> die vollständige Membranüberquerung und

$M_{2C3}$  ist als waagerechte Helix in die Membranoberfläche eingebettet, wobei  $M_{2C2}$  praktisch als gestrecktes Verbindungsstück zwischen  $M_{2C1}$  und  $M_{2C3}$  fungiert.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen nur grundlegende Topologieuntersuchungen für einige andere Vertreter der SKT-Familie, sowie vereinzelte Cysteinzugänglichkeiten in VaKtrB, vor. Um eine grundsätzliche Topologiebestimmung von VaKtrB zu erhalten, wurden in den Bereichen  $MPM_{B-D}$  PhoA-Fusionen durchgeführt. Es wurden folgende Erkenntnisse erzielt: 1. Die Topologie von VaKtrB entspricht den Vorhersagen und nimmt für die Domänen B-D ein  $(M_1PM_2)_3$ -Faltungsmotiv ein. 2. Die Aktivitätsprofile innerhalb der MPM-Motive lassen vermuten, dass vor dem P-Loop eine sogenannte Türmchenstruktur vorliegt, wie sie schon zuvor in der Kristallstruktur des KcsA-Kanals gefunden wurde. 3. Die Aktivität der Fusionskonstrukte nimmt zum C-Terminus hin ab. 4. Die Stabilität des Fusionsproteins erwies sich als schlecht. Cytoplasmatisch orientierte Fusionen wurden praktisch vollständig abgebaut. In aktiven KtrB-PhoA-Hybridproteinen war neben dem intakten Fusionsprotein häufig auch abgespaltene Phosphatase zu finden. Diese Zustände ließen sich auch nicht durch den Einsatz von SF120-Zellen verbessern, die Defizienzen für verschiedene Proteasen aufweisen (DegP, Protease III → Periplasma; ompT → äußere Membran). 5. Die Position L340 (am Ende von  $M_{2C3}$  und sollte deshalb nahe am Cytoplasma lokalisiert sein) erbrachte in den PhoA-Fusionen ein interessantes Ergebnis, das darauf hindeutet, dass dank des flexiblen Teilstücks  $M_{2C2}$  die alkalische Phosphatase vermutlich auf die periplasmatische Seite gezogen wird.

Die Cysteinzugänglichkeiten ergaben ein schwer zu deutendes Bild. 1. Es lassen sich praktisch alle untersuchten Einzelcysteinvarianten mehr oder minder stark durch ein membranimpermeables Maleimid schützen, was eine eindeutige Positionsbestimmung verhindert. 2. Interessanterweise zeigten einige unerwartete Positionen (vermutlich cytoplasmatisch bzw. im Protein lokalisiert) sehr starke Zugänglichkeiten für das membranimpermeable Maleimid, was vermuten lässt, dass vom Periplasma eine wässrige Verbindung bis tief in den internen Bereich von KtrB zumindest zeitweise bestehen muss. 3. Die Zugänglichkeiten für das biotinylierte Maleimid legen den Schluss nahe, dass der C-terminale Abschnitt von  $M_{2C3}$  einseitig schlecht zugänglich ist, was den amphipatischen Charakter dieses Teilstücks der  $M_{2C}$ -Helix widerspiegeln könnte.

Diese Experimente wurden ergänzt mit ESR-Untersuchungen der paramagnetischen Substanz MTSSL, gebunden an einzelne ausgewählte Einzelcystein-Varianten in  $M_{2C}$ . Dabei wurden vergleichende Untersuchungen zwischen solubilisiertem (n-D- $\beta$ -

Dodecylmaltosid) und rekonstituiertem (*E. coli* Lipide) KtrB-Protein durchgeführt. Diese Analysen führten zu folgenden Ergebnissen: 1. Die Faltung von KtrB ist in solubilisierter Form deutlich aufgelockert. 2. Das solubilierte Protein scheint zumindest teilweise aufgefaltet zu sein. 3. Das KtrB-Protein (solubiliert) ist von der Detergenzmicelle großflächig umschlossen, da sämtliche Positionen nicht mehr zugänglich für den paramagnetischen Quencher NiEDDA (wasserlöslich) sind, sehr wohl aber für molekularen Sauerstoff (Lipidphase). Die ESR-spektroskopischen Analysen an spinmarkierten und rekonstituierten KtrB-Einzelcysteinvarianten führten zu folgenden Feststellungen: 1. Alle untersuchten Bereiche unterliegen starken Einschränkungen der Seitenkettenmobilität, die auf starke Interaktion mit anderen Proteinstrukturen hinweisen. Als Ausnahme ist Aminosäureposition T300R1 zu nennen, die an einer Helixoberfläche lokalisiert sein sollte. 2. Die Zugänglichkeiten spinmarkierter KtrB-Einzelcysteinvarianten für paramagnetische Quencher ergaben keine den Modellen widersprechenden Ergebnisse, sofern folgende Daten bedacht werden. Die spinmarkierte Aminosäureseitenkette L340R1 ist im Lipid lokalisiert. Die Position T318R1 lieferte in der ESR-Zugänglichkeit (im Protein verborgen) den Cysteinzugänglichkeiten (zugänglich vom Periplasma) widersprechende Daten, die möglicherweise auf die Anwesenheit von KtrA zurückzuführen sind. Die Komplementationsstudien an Einzelcysteinvarianten legen nahe, dass die Region im Bereich von  $M_{2C2}$  einen wichtigen Stellenwert bei der geregelten Aktivität von KtrB einnimmt.

Abschließend muss angemerkt werden, dass die Topologie der  $M_{2C}$ -Helix nicht geklärt wurde.  $M_{2C1}$  scheint sich entsprechend der Modellvorstellungen zu verhalten. Der Bereich  $M_{2C2}$  scheint ein flexibles Teilstück zu besitzen, was möglicherweise in die Regulation und/oder den Transportmechanismus involviert ist und dabei an die flexiblen Linkerregionen im  $Na^+/H^+$ -Antiporters NhaA (Helices IV und XI) erinnert. Allerdings ist die Lokalisierung und Topologie dieses Teilstücks weiterhin fraglich. Die putative bedingt amphipathische Teilhelix  $M_{2C3}$  scheint nach den in dieser Arbeit gewonnenen Daten eher eine an die Membran angelagerte Orientierung einzunehmen, die allerdings deutlich näher an der Kavität bzw. im Protein eingebunden sein muss, als es bislang in den Modellvorstellungen postuliert ist.

# 1 Einleitung

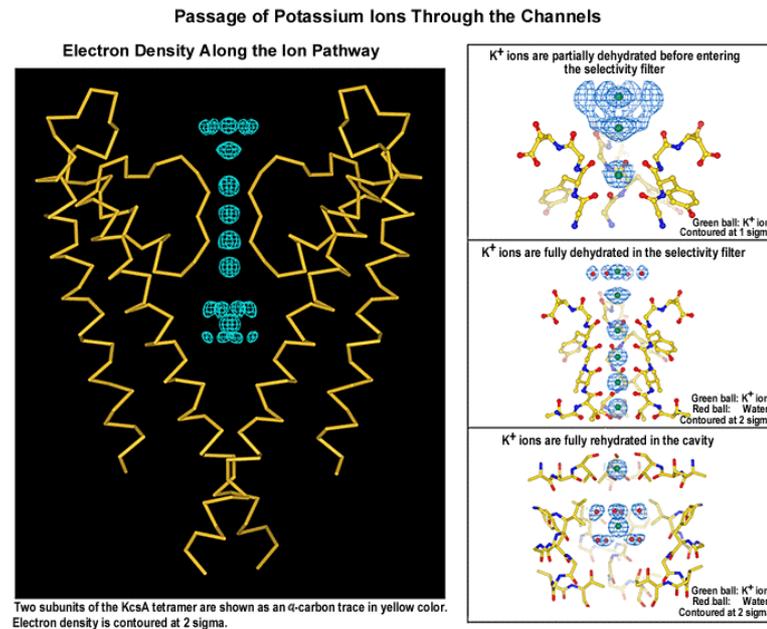
## 1.1 Kalium

Kalium ist nach Natrium das am zweithäufigsten vorkommende monovalente Kation in der Natur. Es dient als Hauptosmolyt in Prokaryoten (Stumpe *et al.*, 1996) und spielt somit eine bedeutende Rolle in der Osmoadaptation. Warum Kalium im Vergleich zu Natrium in dieser Aufgabe präferiert wird und entsprechend hohe Konzentrationen intrazellulär toleriert werden, ist noch ungeklärt. Einerseits kann es an der Eigenschaft von Kalium liegen, die Faltung und die Aktivität von Enzymen zu unterstützen, andererseits hält die Verwendung von Kalium für diese Aufgabe (speziell in einer natriumreichen Umgebung) die Möglichkeit offen, einen Natriumgradienten aufzubauen und diesen elektrochemisch zu nutzen (Bakker, 1993). Kalium liegt normalerweise in hohen Konzentrationen im Cytoplasma vor (*E. coli*: 200 mM). Kaliumein- bzw. ausstrom ist die erste Antwort auf osmotische Veränderungen. Drohen die Zellen zu platzen, erfolgt ein massiver Kaliumausstrom, der von mechanosensitiven Kanälen bewerkstelligt wird (Meury *et al.*, 1985; Booth *et al.*, 1985). Wird *E. coli* einem hyperosmotischen Schock unterzogen, ist die erste Antwort eine starke Kaliumaufnahme ins Cytoplasma (Dinnbier *et al.*, 1988; McLaggan *et al.*, 1994; Csonka & Epstein, 1996). Im weiteren Verlauf der Osmostressantwort wird als erstes Glutamat synthetisiert, welches als  $K^+$ -Glutamat durch Akkumulation den Zellturgor bei einem hyperosmotischen Schock ausgleicht. Allerdings besitzt  $K^+$ -Glutamat die Eigenschaft in hohen Konzentrationen inhibierend auf die Enzymaktivität zu wirken und wird deshalb im folgenden durch ein nicht ionisches Osmolyt ersetzt. Dabei handelt es sich in der Regel um Trehalose, wobei das Kalium wieder exkretiert und das Glutamat abgebaut wird (Dinnbier *et al.*, 1988). Sind im Medium kompatible Solute wie Glycin-Betain, Prolin oder Ectoin vorhanden, so werden diese bevorzugt aufgenommen, was zu einer Verringerung der Kaliumaufnahme bzw. Glutamatsynthese führt (Dinnbier *et al.*, 1988; Larsen *et al.*, 1987). Hierbei handelt es sich um osmotisch wirksame Substanzen, die aber weniger Auswirkungen auf die Reaktionsbedingungen im Cytoplasma haben als Kalium. Es ist nachgewiesen, dass Kalium in die pH und pmf-Homöostase involviert ist. Dies geschieht bei einer Ansäuerung des Cytoplasma durch einen aktiven, elektrogenen  $K^+$ -Transport ins Cytoplasma, wobei im Gegenzug Protonen aktiv herausgepumpt

werden. Im umgekehrten Fall werden Kationen über einen Antiporter im Austausch gegen Protonen sekretiert (Booth 1985; Krulwich *et al.*, 1990).

## 1.2 KcsA-Kanal

Die Entdeckung und anschließende Strukturaufklärung des KcsA  $K^+$ -Kanals aus *Streptomyces lividans* (Schrempf *et al.*, 1995; Doyle *et al.*, 1998; Abb. 1.1), läutete eine neue Ära auf diesem Gebiet ein. Diese Klasse von kleinen Kaliumkanälen zeichnet sich durch eine zuvor unbekannte Topologie aus, die aus zwei Transmembranhelices (M1 und M2) und einem zentralen P-Loop (hohe Ähnlichkeit zum H5-Segment eukaryotischer Ionen-Kanäle) besteht. Der erwähnte KcsA-Kanal hat eine Größe von 17,6 kDa pro Untereinheit, wobei sich ein vollständiger Kanal aus 4 gleichen Untereinheiten zusammensetzt, die sich um eine zentrale Pore arrangieren. Die Pore wird durch die P-Loops gebildet, die sich halb in die Membran zurückfalten. Dabei wird der Selektivitätsfilter durch die Aminosäuresequenz TVGYGD gebildet. Das Kaliumion wird vor dem Eintritt in den Selektivitätsfilter durch die Carbonyl-Sauerstoffatome, die in die Lösung ragen, vollständig dehydratisiert (Abb. 1.1; Zhou *et al.*, 2001). Die Carbonyl-Sauerstoffatome der Selektivitätsfilter bilden dabei die vier Kaliumbindestellen innerhalb der Pore, wobei immer nur zwei dieser Positionen gleichzeitig besetzt sind. Entweder liegen Kaliumionen an den Positionen 1 und 3 oder an 2 und 4 vor. Tritt das  $K^+$ -Ion in die Kavität über, wird es rehydratisiert. Das  $K^+$ -Ion ist dabei geordnet von 8 Wassermolekülen umgeben (Abb. 1.1; Zhou *et al.*, 2001).

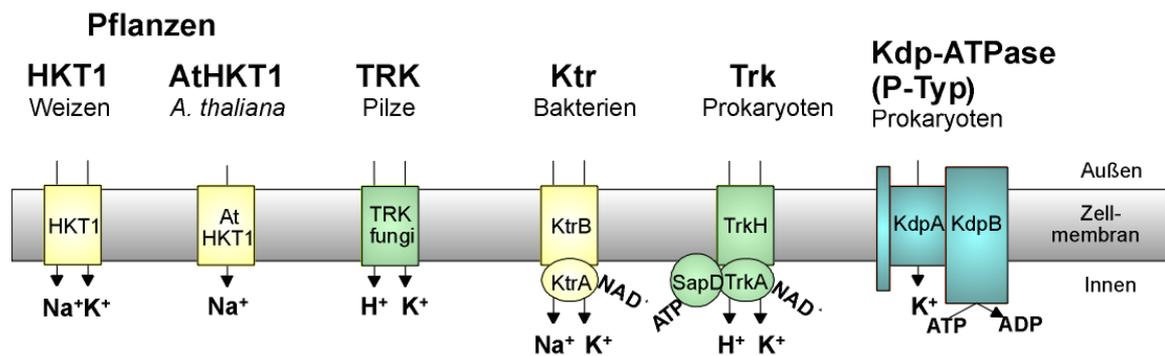


**Abb. 1.1: KcsA-Kanal-Kristallstruktur.** Links: zwei Untereinheiten des KcsA-Tetramers. Rechts: Durchgang eines Kalium-Ions durch den Selektivitätsfilter in die Kavität. (<http://www.hhmi.org/research/investigators/mackinnon.html> Image: Yufeng Zhou, in the MacKinnon lab, Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase). Originalreferenz : Zhou *et al.*, 2001.

### 1.3 Die Superfamilie der Kaliumtransportproteine

Die KcsA-Struktur (Doyle *et al.*, 1998) führte zu der Hypothese, dass mindestens vier Familien von Transportern, Trk und KtrAB aus Prokaryoten, Trk 1,2 aus Pilzen und HKT1 aus Weizen, von bakteriellen Kalium-Kanalproteinen (2TM-Kanäle) abstammen (Abb. 1.2) (Durell *et al.*, 1999). Sequenzvergleiche zeigten besondere Ähnlichkeiten zu dem im KcsA-Kanal gefundenen M<sub>1</sub>PM<sub>2</sub>-Motiv (Abb. 1.1), allerdings sind vier dieser MPM-Motive im Unterschied zu KcsA in einem Protein kovalent über cytoplasmatische Schleifen verbunden (Abb. 1.3). Durell *et al.* stellten die Theorie auf, dass diese Art von Symportern aus dem einfachen Kaliumkanal-Motiv (MPM) evolutionär durch Genfusion und Genduplikation entstanden ist. Die KtrB-Proteine scheinen hierbei am nächsten verwandt mit der Grundstruktur des KcsA-Kanals zu sein, wohingegen die Trk-Systeme sowie die HKT-Systeme zusätzliche Modifikationen des klassischen MPM-Motivs aufweisen (Durell *et al.*, 1999). Im Vergleich zum klassischen K<sup>+</sup>-Selektivitätsfiltermotiv (TVGYG) sind die Motive in dieser Superfamilie weit weniger konserviert bzw. ausgeprägt. In den meisten Transportern befindet sich in die Membran zurückgefalteten P-Loop nur ein

konserviertes Glycin. Dabei sind nicht alle Vertreter dieser Superfamilie Kaliumtransportsysteme; einige, wie z.B. AtHTK1 aus *Arabidopsis thaliana*, sind in erster Linie Na<sup>+</sup>-Transporter. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Selektivitätsfiltersequenz, wobei ein Glycin gegen ein Serin ausgetauscht vorliegt (Mäser *et al.*, 2002). Die Topologie für drei dieser SKT-Transporter (Superfamily of K<sup>+</sup>-Transporters) ist zumindest in Ansätzen geklärt und scheint von den einfachen 2TM-Kanälen abgeleitet zu sein (*E. coli* KdpA, Buurman *et al.*, 1995; AtHTK1, Kato *et al.*, 2001; *Saccharomyces cerevisiae* Trk2p, Zeng *et al.*, 2004).



**Abb. 1.2: SKT-Transporter-Übersicht.** Ähnliche Transportsysteme sind farblich gekennzeichnet. gelb= Natrium-abhängig, grün= ursprünglich Protonen-abhängig, blau= P-Typ-ATPase (Durell and Guy, (1999); Durell *et al.*, (2000); Tholema (2002)). [transportierte Ionen bei Trk-Proteinen noch nicht abschließend geklärt]

Wie auch bei einigen 2TM-Kanälen zu finden, gibt es in dieser Superfamilie einige Transportsysteme, die regulatorische, Liganden-bindende Untereinheiten aufweisen. Diese Untereinheiten gehören zur Familie der RCK/KTN (Regulation of K<sup>+</sup> channel /K<sup>+</sup> transport nucleotide binding)-Regulationsproteine bzw. -Domänen. Sie befinden sich im Cytoplasma und regulieren die Aktivität des Kanals bzw. Transporters durch die Bindung eines Liganden, der einen sogenannten „Conformational Switch“ Mechanismus auslöst (Kröning *et al.*, 2007; Kröning Dissertation, 2007; Albright *et al.*, 2006; Roosild *et al.*, 2002).

## 1.4 *Vibrio alginolyticus*

*Vibrio alginolyticus* ist ein gram-negativer Meerwassermikroorganismus und gehört zur Familie der *Vibrionaceae*, die zu den Gammaproteobakterien zählen (Thompson *et al.*, 2004). *Vibrios* sind mobile Stäbchen, die mesophil und chemoorganotroph wachsen. Der Cholera-Erreger wurde als erste *Vibrio*-Spezies 1854 während einer Seuche in Florenz entdeckt. Im Laufe der Jahre erlangte *Vibrio cholerae* aufgrund

der durch ihn verursachten Seuchen weltweit zweifelhaften Ruhm und ist der wohl bekannteste Vertreter dieser Gattung. Neben den humanpathogenen *Vibrios*, darunter auch *Vibrio alginolyticus*, agieren viele weitere als pathogene Keime in Meerwasserkulturen (auch hier *Vibrio alginolyticus*) und bedingen damit einen großen wirtschaftlichen Schaden für die Fischerei. *Vibrio alginolyticus* ist nur dann pathogen für den Menschen, wenn er mit kontaminierten Lebensmitteln verzehrt wird (akute Gastroenteritis; UH *et al.*, 2001) oder durch Wunden in den Körper gelangt (Schmidt *et al.*, 1979). Allerdings hat die Familie der *Vibrionaceae* auch andere wirtschaftlich interessante Seiten, da ihre Mitglieder viele spezielle Enzyme/Substanzen produzieren, die in der Industrie Anwendung finden. Hierzu zählen chitinabbauende Enzyme, Antibiotika und nicht zuletzt auch Proteasen und Kollagenasen (*V. alginolyticus*), die zum Gerben von Leder verwendet werden. Diese Familie ist auch in der Lage polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe abzubauen. Zur Familie der *Vibrionaceae* gehört nur das Genus *Vibrio*, welches mittlerweile 63 beschriebene Arten enthält (Thomson *et al.*, 2004). Neuere Verwandtschaftsuntersuchungen zeigen, dass *V. alginolyticus* sehr nahe mit *V. harveyi* verwandt ist, welcher durch sein über „Quorum sensing“ gesteuertes Leuchtverhalten Aufmerksamkeit erregt hat.

Wie alle anderen Mikroorganismen auch müssen *Vibrios* dazu in der Lage sein, sich an schnell wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Dazu gehören Nährstoff-, Temperatur-, Sauerstoffgehaltsveränderungen und Unterschiede in der Osmolarität sowie des pH-Wertes. Im Fall der Osmoadaptation spielt auch in *V. alginolyticus* der Kaliumtransport als erste Instanz eine wichtige Rolle, wobei die cytoplasmatische Konzentration dieses Kations 400 mM beträgt (Tokudo *et al.*, 1981). Sie wird in *Vibrio alginolyticus* durch zwei  $K^+$ -Aufnahmesysteme und  $K^+$ -Effluxsysteme gesteuert. Beim ersten handelt es sich um ein Trk-ähnliches, gering affines ( $K_m=3$  mM) aber konstitutiv aktives Transportsystem (Nakamura *et al.*, 1994). Das andere ist ein KtrAB-Transporter (*ntpJ* ähnlich,  $K_m=0,3$  mM, Nakamura *et al.*, 1994), der hoch affin für Kalium ist und nach Bedarf induziert werden kann (Nakamura *et al.*, 1998).

Neben der Osmoadaptation spielt der Kaliumtransport in *V. alginolyticus* bei der cytoplasmatischen pH-Homöostase eine entscheidende Rolle, wenn es unter alkalischen Bedingungen wächst (Nakamura *et al.*, 1984). Die Kaliumtransportsysteme sind in der Lage, in Kombination mit einem  $K^+/H^+$ -Antiporter den internen pH-Wert konstant bei pH 7,8 zu halten, sofern die pH-Wert-Differenz zum externen Milieu nicht zu groß wird. Neben diesem System zur pH-Regulation

wurde in *V. alginolyticus* ein  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (Nakamura *et al.*, 1992) in Kombination mit der  $\text{Na}^+$ -Pumpe NADH-CoenzymQ-Reduktase (Unemoto *et al.*, 1990) beschrieben, die unter Bedingungen, die keinen  $\text{H}^+$ -Gradienten erlauben, einen elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten generieren und damit einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Protonentransport ermöglichen.

## 1.5 Der $\text{Na}^+$ -abhängige $\text{K}^+$ -Transporter KtrAB aus *Vibrio alginolyticus*

In dieser Arbeit wurde das KtrAB-System aus *Vibrio alginolyticus* untersucht. Dieses System wurde 1998 von Nakamura *et al.* entdeckt und beschrieben. Auf dem 4004 Bp großen klonierten Fragment liegen die Gene für eine RNA-Helicase (RhIE), der 28 kDa schweren A-Untereinheit und der membranständigen B-Untereinheit (50 kDa) dieses Transportsystems. Es handelt sich hierbei um einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Transporter, der eine Affinität von 25  $\mu\text{M}$  für Kalium aufweist (Tholema *et al.*, 2001). Die maximale Aufnahme rate für dieses Kation beträgt 200 nmol/mg Zelltrockengewicht. Diese Daten wurden in *E. coli* bestimmt (Tholema *et al.*, 2005). Allerdings ist noch nicht geklärt, ob es sich bei der Natriumabhängigkeit um einen  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ -Symport oder nur um eine Bindung von Natrium als Ligand handelt. Es wird spekuliert, ob neben der Kaliumpore noch eine zweite Pore für  $\text{Na}^+$  existiert. Die B-Untereinheit dieses Transportsystems ist durchaus ohne die periphere A-Untereinheit aktiv, allerdings büßt sie hierbei ihre  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit, Geschwindigkeit (Faktor 100 erniedrigt) und Ionenspezifität ein. Die Affinität für  $\text{K}^+$  verändert sich hingegen nicht (Tholema *et al.*, 2005).

## 1.6 Die VaKtrA-Untereinheit

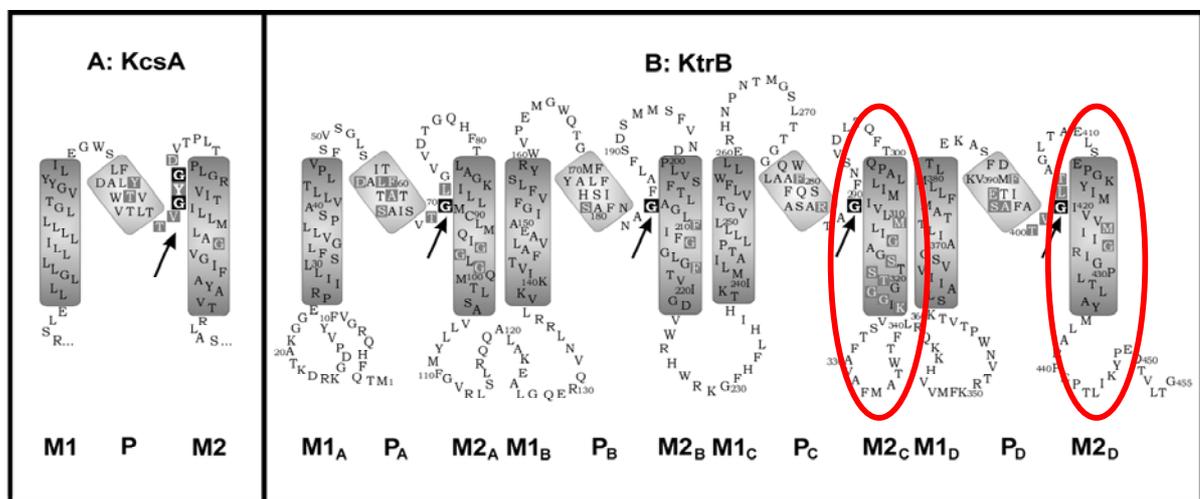
Die 28 kDa schwere Untereinheit dieses Transportsystems gehört zu der Familie der KTN/RCK-Proteine. Diese an die cytoplasmatische Seite der Membran angelagerten Proteindomänen regulieren durch Ligandenbindung die Aktivität von einigen  $\text{K}^+$ -Transportern bzw. -Kanälen. Die Art des Liganden variiert im allgemeinen je nach Transportsystem. Es wurde z.B. für den  $\text{K}^+$ -Kanal MthK (*Methanococcus jannaschii*)  $\text{Ca}^{2+}$  als Ligand bestimmt (Jiang *et al.*, 2001, 2002). Die Einordnung von KtrA in

diese Proteinfamilie erfolgte aufgrund der konservierten GXGXXG-Sequenz einer Adenin-/Nukelotid-Bindestelle, die in einem sogenannten „Rossmann fold“ lokalisiert ist. Diese Bindedomäne ähnelt stark der der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Dehydrogenasen (Nakamura *et al.*, 1998) und da in dem KtrA ähnlichen Protein TrkA eine NAD<sup>+</sup>-Bindung vorliegt (Schlösser *et al.*, 1993), wurden diese beiden Proteine von Roosild *et al.* (2002) in die Gruppe der KTN-Domänen eingeordnet. Dabei war zu diesem Zeitpunkt noch keine Bindung von NAD<sup>+</sup> für KtrA gezeigt. Allerdings wurde in VaKtrA im Gegensatz zu einer früher postulierten NADH- eine ATP-Bindung nachgewiesen (Kröning *et al.*, 2007). Für KtrA wurde von Roosild *et al.* ein sogenannter „conformational switch“-Mechanismus vorgeschlagen, bei dem eine Winkeländerung im Protein auftritt, sofern ein Ligand bindet, welcher für KtrA aus *Vibrio alginolyticus* untermauert werden konnte (Kröning *et al.*, 2007). Hinzu kommt, dass die hoch affine ATP-Bindung ( $K_D \approx 10 \mu\text{M}$ ) die Assemblierung des KtrAB-Komplexes forciert und dadurch die K<sup>+</sup>-Transportaktivität des Systems reguliert. Allerdings muss ATP als alleinige Antriebskraft für den Transport ausgeschlossen werden, da die A-Untereinheit keinerlei ATPase-Aktivität zeigt und nur in Anwesenheit eines hohen Membranpotentials eine Aktivität zeigt (Kröning *et al.*, 2007). Es wird zur Zeit ein Regulationsmechanismus diskutiert, der dem der V-ATPase ähnelt. Dies geschieht durch die Dissoziation des V<sub>1</sub>-Komplexes vom V<sub>o</sub>-Teils während Hungerzeiten. Möglicherweise wird das im Fall von VaKtrA durch die Verschiebung des Verhältnisses von AMP zu ATP erreicht (Kröning *et al.*, 2007). Kristallstruktur-Untersuchungen von KtrA aus *Bacillus subtilis* zeigten, dass die A-Untereinheit einen oktameren „Gating Ring“ bildet, wie es schon bei den RCK-Domänen der Kaliumkanäle beschrieben wurde. In *B. subtilis* KtrAB ist eine Stöchiometrie von A zu B von 8:2 gezeigt worden. (Albright *et al.*, 2006).

## 1.7 Die VaKtrB-Untereinheit

Die B-Untereinheit des Na<sup>+</sup>-abhängigen Kaliumtransportsystems enthält acht Transmembrandurchgänge, wobei immer zwei durch einen sogenannten P-Loop verbunden sind. Der Selektivitätsfilter im P-Loop von VaKtrB unterscheidet sich allerdings von dem klassischen TVGYG Motiv, da hier nur ein konserviertes Glycin vorliegt (Abb. 1.3). Es ist durch Mutagenesestudien nachgewiesen worden, dass diese konservierten Glycine in den putativen P-Loops die Transporteigenschaften

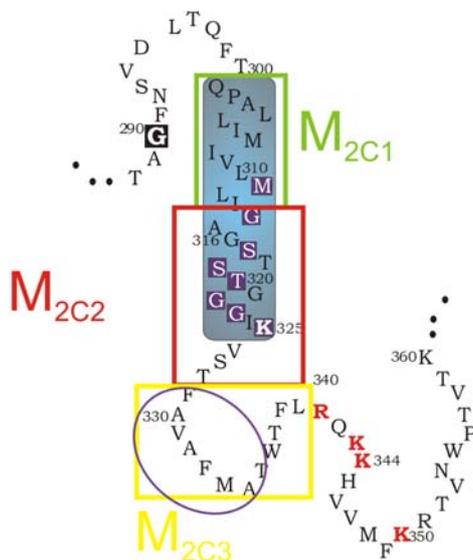
beeinflussen. Der Austausch von nur einem dieser Selektivitätsfilterglycine zu einem Serin führt in VaKtrB zu einer  $\text{Na}^+$ -Transportleistung dieses Systems (Tholema *et al.*, 2005). Neuere Studien zeigen, dass es vermutlich noch weitere bedeutsame konservierte Reste im Bereich der Pore gibt. Es wurde ein stark konserviertes Histidin im *Synechocystis spec.* KtrB PC6803 identifiziert (an Position 157 [VaKtrB H176], Abb. 1.3; Zulkifli *et al.*, 2006). Es ist im  $\alpha$ -helikalen Teil von  $P_B$  zu finden. Mutagenesestudien an dieser Position führten zu einer Erniedrigung der Aufnahme rate um einen Faktor 5-10 und eine Erhöhung des  $K_m$ -Wertes um einen Faktor 25 im Vergleich zum Wildtyp. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die Ansäuerung des externen pH-Wertes (im Vergleich zu pH 7,5) beim Wildtyp zu einer Verminderung der Affinität und  $v_{\text{max}}$  von *Synechocystis* KtrB für Kalium führt, wobei allerdings kein Zusammenhang zu dem Histidin 157 festgestellt werden konnte. Auch die grundsätzliche Struktur der VaKtrB-Untereinheit konnte anhand der entdeckten KcsA-MPM-Struktur modelliert werden (Doyle *et al.*, 1998; Abb.1.3), wobei zwei Regionen auffallend waren, da sie nicht aus der Struktur des Kanals abzuleiten waren. Diese Regionen sind zum einen in  $M2_C$  und zum anderen  $M2_D$  zu finden (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3:  $M_1PM_2$ -Domänen-Struktur des KcsA-Monomers, sowie das kovalent verbundene KtrB-Tetramer aus *Vibrio alginolyticus*.** Konservierte Reste sind weiß auf schwarz dargestellt. Transmembranhelices haben einen grauen Hintergrund (M1, M2). Putative P-Loop-Helices sind hellgrau unterlegt. Die Selektivitätsfilter sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (Modifiziert nach Tholema *et al.*, 2005). Rote Kreise weisen auf interessante Bereiche hin.

### 1.7.1 Die $M_{2C}$ -Helix

Bei Topologievorhersagen und statistischen Untersuchungen fallen im Besonderen folgende Bereiche auf, die einerseits schwer zu modellieren sind und andererseits hochkonserviert in allen Symportern vorliegen. Sie sind bis jetzt noch nicht genauer untersucht. Die  $M_{2C}$ -Helix lässt sich schwer vorhersagen, da eine Vielzahl von Konformationen in den Modellierungsstudien möglich sind. Diese Region ist in sofern äußerst problematisch, da sie sich stark von den bisher bekannten Kristallstrukturdaten und der dazugehörigen Aminosäuresequenz der Kaliumkanäle unterscheidet. Diese spezielle Region lässt sich in drei Regionen aufteilen ( $M_{2C1}$ ,  $M_{2C2}$ ,  $M_{2C3}$ ) (Durell und Guy, 1999) (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Drei Bereiche der  $M_{2C}$ -Helix aus VaKtrB.** C1:  $\alpha$ -helikaler Bereich C2: Glycin-, Serin-, Threonin- und Prolinreicher Bereich.  $\rightarrow$  random coil und/oder  $\beta$ -Faltblatt C3:  $\alpha$ -Helix äquivalent zur Abbildung 1.5. Enthält sieben nicht konservierte apolare Aminosäuren, die  $M_{2C2}$  folgen, die durch einen violetten Kreis markiert sind (Durell und Guy, 1999). Positiv geladene Aminosäuren nach diesen Sequenzen sind in roten Buchstaben dargestellt.

Der erste Bereich zeichnet sich durch eine dem KcsA ähnliche Aminosäuresequenz aus ( $M_{2C1}$  grün Abb. 1.4). Dieser zwölf Aminosäuren lange Abschnitt lässt sich entsprechend der Informationen des KcsA-Kanals als  $\alpha$ -helikaler Bereich modellieren. Der zweite Bereich zeigt hingegen ein deutlich anderes Bild, welches sich in folgender Konsensus-Sequenz widerspiegelt. Es handelt sich um einen in KtrB hoch-konservierten Bereich, der aus einem hohen Anteil an Glycinen, Serinen, Threoninen und Prolinen besteht.

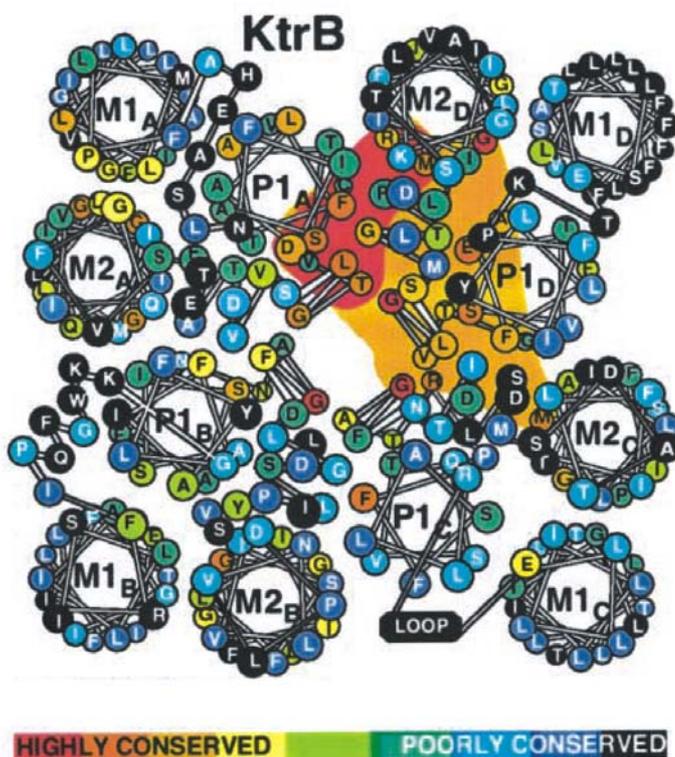


Diese Zusammensetzung von Aminosäuren findet man normalerweise nicht in  $\alpha$ -helikalen Bereichen, sondern in „random coil“ oder  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Chou und Fasman, 1974). Die meisten Vertreter der SKT-Superfamilie besitzen diese Region (Durell und Guy, 1999). Der dritte Bereich ( $M_{2C3}$ ) zeichnet sich durch sieben apolare Seitenketten aus, die allerdings in der SKT-Superfamilie nicht konserviert sind. Diese Sequenz kann keinen weiteren Membrandurchgang bewerkstelligen, da sie deutlich zu kurz ist. Danach folgt ein kleiner heterogener Bereich, an den sich drei positiv geladene Aminosäuren anschließen (R341, K343, K344 und später noch K350), was der „positive inside rule“ entsprechen würde (von Heijne, 1986). Wenn es sich hierbei um ein Sortierungssignal für die cytoplasmatische Seite handelt, würde das die grundsätzliche MPM-Struktur des KtrB-Transporters untermauern. Auf diesen Grundlagen beruhend entwickelten Durell und Guy (1999) zwei mögliche Konformationen der  $M_{2C}$ -Helix in KtrB. Bei diesen Modellen gibt es zum Einen die Vorstellung, dass sich der Bereich von  $M_{2C1}$  ähnlich wie die KcsA-Helices faltet, der  $M_{2C2}$ -Bereich aber die Helixstruktur durchbricht und den Übergang zum zweiten hydrophoben und  $\alpha$ -helikalen Bereich bildet. In einer Variante lagert sich die  $M_{2C3}$ -Struktur an die Membran an, wobei  $M_{2C2}$  diese Winkeländerung ermöglicht, selbst aber in Richtung Kavität gedreht ist (Abb. 1.5 A und B). Im zweiten Modell bildet  $M_{2C2}$  eine Schleife, die vollständig in die Kavität unter dem Selektivitätsfilter untergebracht ist. Die  $M_{2C3}$ -Helix verläuft in diesem Modell eher als Verlängerung zu  $M_{2C1}$  wieder mehr oder weniger senkrecht zur Membranoberfläche (Abb. 1.5 C und D).



### 1.7.2 Die M<sub>2D</sub>-Helix

Die andere hochkonservierte Region dieser Symporterfamilie liegt im Bereich der M<sub>2D</sub>-Helix. Hier fällt die Aminosäuresequenz MXXGR (VaKtrB MIIGR) auf, die nicht in dem K<sup>+</sup>-Kanal KcsA zu finden ist (Durell *et al.*, 2000). Im Anschluss an diese Sequenz findet man ein signifikantes Unterscheidungsmerkmal zwischen KtrB und TrkH, das sich in der Sequenz GRIG (KtrB) und GRIE (TrkH) widerspiegelt. Es wird für das positiv geladene Arginin eine mögliche Aufgabe als Rückflusssperre im Bereich der Kavität des Transportproteins postuliert (Durell *et al.*, 2000, Abb. 1.1, Abb. 1.5). Hierbei soll dieser Rest das Kalium-Ion ins Cytoplasma drücken und danach als Ladungsbarriere dienen, die einen K<sup>+</sup>-Rückfluss ins Periplasma verhindern soll. Gerade im Bereich um M<sub>2D</sub> befindet sich einer der konserviertesten Bereiche in KtrB-Untereinheiten, wenn man die räumliche Anordnung betrachtet. In den Unterfamilien der HKT- und TRK-Proteine befinden sich in der Transmembranhelix M<sub>2D</sub> sehr hoch konservierte positive Aminosäurereste, die in KtrB-Proteinen nicht in dem Maße vorkommen (Durell und Guy, 1999). Diese räumliche Anhäufung von konservierten Resten ist nicht in KcsA zu finden, im Gegensatz dazu aber in mehr oder weniger ausgeprägter Natur in allen Vertretern der SKT-Familie (Durell und Guy, 1999; Abb. 1.6), was als Besonderheit der Symporterfamilie anzusehen sein dürfte.



**Abb. 1.6:** Darstellung von KtrB-Symportern im helikalen Rad-Modell. Jedes Rad stellt eine  $\alpha$ -Helix von der Außenseite, die Achse hinunter, dar. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode als Konsensus-Sequenz gezeigt. Abbildung entnommen aus Durell und Guy (1999).

## 1.8 Aufgabenstellung

Die SKT-Superfamilie und ihre Abstammung von einfachen 2TM-Kaliumkanälen beruht zum größten Teil auf Sequenzanalysen und statistischen Untersuchungen (Durell und Guy, 1999; Durell *et al.*, 2000). Die MPM-Struktur scheint grundsätzlich korrekt für diese Kaliumtransportsysteme vorhergesagt zu sein, da zumindest für drei Mitglieder der SKT-Transporterfamilie erste grobe Topologiestudien veröffentlicht wurden (Buurman *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2004). Eine besonders interessante Region in allen dieser Superfamilienmitglieder ist die  $M_{2C}$ -Helix und der darauffolgende cytoplasmatische Loop. Im kristallisierten KcsA-Kanal aus *Streptomyces lividans* wurde keine zur  $M_{2C}$ -Helix äquivalente Struktur gefunden. Somit stellt sie eine Besonderheit der SKT-Familie dar (Abb. 1.1, 1.3), woraus sich Schwierigkeiten in der Topologievorhersage ergeben.

Aus diesem Grund bestand das Ziel dieser Arbeit darin, Topologieinformationen im speziellen im Bereich von  $MPM_C$  von VaKtrB zu erlangen, da es sich hierbei um eine besonders interessante und praktisch nicht bestimmte Struktur in der Symporterfamilie handelt. Hierzu mussten verschiedenste Plasmide und Cysteinvarianten hergestellt werden. Die eingesetzten Methoden begannen mit klassischen Fusionstechniken (PhoA und LacZ, terminal und Sandwich), die für eine erste, grobe Topologiekartographie prädestiniert sind. Darüberhinaus wurden Cysteinzugänglichkeiten mit verschiedenen Maleimiden durchgeführt, wobei die ersten Grundlagen für diese Technik von Nancy Tholema während Ihrer Dissertation erarbeitet wurden. Diese Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erweitert und entsprechend eingesetzt.

Als letzter und umfangreichster Ansatz wurden Elektronen-Resonanzspektroskopische Untersuchungen an spinmarkierten Einzelmaleimvarianten von KtrB in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H.-J. Steinhoff des Fachbereichs Physik, Universität Osnabrück im speziellen mit Dipl.-Phys. Meike Döbber durchgeführt. Eigens hierfür musste ein neues Überproduktionsprotokoll erstellt werden, sowie ein neues Markierungsprotokoll für VaKtrB mit dem verwendeten Nitroxid-Spinlabel erarbeitet werden. Im weiteren Verlauf dieser Untersuchungen war es für die ESR-spektroskopischen Messungen notwendig, ein Rekonstitutionsprotokoll von VaKtrB zu erstellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Tabelle 2.1 a: *E. coli* K-12

Stamm	Genotyp	Referenz
CC181	[F128 $lacI^q$ / $\Delta$ (ara, leu)7697 $\Delta$ lacX74 $\Delta$ phoA $\Delta$ 20 galE galK thi rpsE rpoB argE(am) recA1 lacY328(am)]	Calamia & Manoil, 1990
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR recA endA1 hsdR17</i> ( $r_K^-$ , $m_K^+$ )	Ausubel <i>et al.</i> (1991)
LB2003	F <sup>-</sup> <i>thi metE rpsL gal rha kup1 <math>\Delta</math>kdpABC5 <math>\Delta</math>trkA</i>	Stumpe <i>et al.</i> , 1997
LZ110	$\Delta$ ( <i>argF-lac</i> )U169 <i>zah-735::Tn10Tet<sup>R</sup></i>	Zeppenfeld <i>et al.</i> , 2000
SF120	<i>KS272 degP pte ompT Kn<sup>r</sup> Cm<sup>r</sup></i>	Meerman <i>et al.</i> , 1994
XL1 blue	<i>RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI<sup>f</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>)]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987

Tabelle 2.1 b: *E. coli* B

Stamm	Genotyp	Referenz
C43 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT r<sup>-</sup>m<sup>-</sup></i> BL21 Abkömmling	Miroux & Walker, 1996
Rosetta <sup>TM</sup> (DE3) pLysSRARE	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE	Novy <i>et al.</i> , 2001
Rosetta2 <sup>TM</sup> (DE3) pRARE2	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pRARE2	Novy <i>et al.</i> , 2001

Tabelle 2.2: Verwendete und hergestellte Plasmide

Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Quelle
pBAD18	Amp <sup>R</sup>	Klonierungs- und Überexpressionsvektor	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pET29b	Kan <sup>R</sup>	Klonierungs- und Überexpressionsvektor	Novagen
pETKtrABH	Kan <sup>R</sup>	pET29b <i>KtrBH KtrA</i>	T. Nakamura
pETCI	Kan <sup>R</sup>	pETKtrABH mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch C90S	N.Tholema (2002)
pETC286	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch A286C	N.Tholema (2002)
pETC300	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch T300C	N.Tholema (2002)
pETC327	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch S327C	N.Tholema (2002)
pETC329	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch F329C	N.Tholema (2002)
pETC331	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch V331C	N.Tholema (2002)
pETC455	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch G455C	N.Tholema (2002)
pETC317	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch S317C	diese Arbeit
pETC318	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch T318C	diese Arbeit
pETC319	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch S319C	diese Arbeit
pETC320	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch T320C	diese Arbeit
pETC333	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch F333C	diese Arbeit
pAR337	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch W337C	Diplomarbeit Axel Rose
pAR338	Kan <sup>R</sup>	pETCI mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch T338C	Diplomarbeit Axel Rose

pAR339	Kan <sup>R</sup>	pETCl mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch F339C	Diplomarbeit Axel Rose
pAR340	Kan <sup>R</sup>	pETCl mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch L340C	Diplomarbeit Axel Rose
pAR341	Kan <sup>R</sup>	pETCl mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch R341C	Diplomarbeit Axel Rose
pAR343	Kan <sup>R</sup>	pETCl mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch K343C	Diplomarbeit Axel Rose
pPAB404	Amp <sup>R</sup>	Expressionsvektor für C terminale PhoA Fusionen	Buurman et al.
pMBPhoA229	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 229	diese Arbeit
pMBPhoA239	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 239	diese Arbeit
pMBPhoA260	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 260	diese Arbeit
pMBPhoA263	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 263	diese Arbeit
pMBPhoA286	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 286	diese Arbeit
pMBPhoA293	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 293	diese Arbeit
pMBPhoA295	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 295	diese Arbeit
pMBPhoA300	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 300	diese Arbeit
pMBPhoA301	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 301	diese Arbeit
pMBPhoA316	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 316	diese Arbeit
pMBPhoA325	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 325	diese Arbeit
pMBPhoA327	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 327	diese Arbeit
pMBPhoA331	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 331	diese Arbeit

pMBPhoA340	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 340	diese Arbeit
pMBPhoA344	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 344	diese Arbeit
pMBPhoA351	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 351	diese Arbeit
pMBPhoA360	Amp <sup>R</sup>	pPAB404 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 360	diese Arbeit
pD55	Amp <sup>R</sup>	AthHKT PhoA Fusion mit hoher PhoA Aktivität	Kato <i>et al.</i> , 2001
pJLZ104	Amp <sup>R</sup>	Expressionsvektor für C-terminale LacZ Fusion	Buurman <i>et al.</i> , 1995
pMBLacZ260	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 229	diese Arbeit
pMBLacZ263	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 260	diese Arbeit
pMBLacZ286	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 263	diese Arbeit
pMBLacZ293	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 286	diese Arbeit
pMBLacZ295	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 300	diese Arbeit
pMBLacZ300	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 301	diese Arbeit
pMBLacZ316	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 316	diese Arbeit
pMBLacZ325	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 325	diese Arbeit
pMBLacZ327	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 327	diese Arbeit
pMBLacZ331	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 331	diese Arbeit
pMBLacZ340	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 340	diese Arbeit
pMBLacZ344	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 344	diese Arbeit

pMBLacZ351	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 351	diese Arbeit
pMBLacZ360	Amp <sup>R</sup>	pJLZ104 mit partiellem <i>ktrB</i> kodierend von AS 1 bis 360	diese Arbeit
pKT84KtrBBamHI 260	Amp <sup>R</sup>	pKT84 mit Mutation in <i>ktrB</i> zu einer BamHI Schnittstelle hinter AS 260	diese Arbeit
pKT84 KtrB BamHI 331	Amp <sup>R</sup>	pKT84 mit Mutation in <i>ktrB</i> zu einer BamHI Schnittstelle hinter AS 331	diese Arbeit
pKT84 KtrB BamHI 340	Amp <sup>R</sup>	pKT84 mit Mutation in <i>ktrB</i> zu einer BamHI Schnittstelle hinter AS 340	diese Arbeit
pKT84 KtrB BamHI 351	Amp <sup>R</sup>	pKT84 mit Mutation in <i>ktrB</i> zu einer BamHI Schnittstelle hinter AS 351	diese Arbeit
pMBPhoA260S	Amp <sup>R</sup>	Kassette für alk. Phosphatase inseriert über BamHI in pKT84 KtrB BamHI 260	diese Arbeit
pMBPhoA331S	Amp <sup>R</sup>	Kassette für alk. Phosphatase inseriert über BamHI in pKT84 KtrB BamHI 331	diese Arbeit
pMBPhoA340S	Amp <sup>R</sup>	Kassette für alk. Phosphatase inseriert über BamHI in pKT84 KtrB BamHI 340	diese Arbeit
pMBPhoA351S	Amp <sup>R</sup>	Kassette für alk. Phosphatase inseriert über BamHI in pKT84 KtrB BamHI 351	diese Arbeit
pMBLacZ260S	Amp <sup>R</sup>	Kassette für $\beta$ -Galactosidase inseriert über BamHI in pKT84 KtrB BamHI 260	diese Arbeit
pMBLacZ331S	Amp <sup>R</sup>	Kassette für $\beta$ -Galactosidase inseriert über BamHI in pKT84 KtrB BamHI 331	diese Arbeit
pMBLacZ340S	Amp <sup>R</sup>	Kassette für $\beta$ -Galactosidase inseriert über BamHI in pKT84 KtrB BamHI 340	diese Arbeit
pMBLacZ351S	Amp <sup>R</sup>	Kassette für $\beta$ -Galactosidase inseriert über BamHI in pKT84 KtrB BamHI 351	diese Arbeit
pEL903	Amp <sup>R</sup>	<i>ktrB</i> in pBAD18 mit C-terminalem 6xHis-Tag	Labor-sammlung
pEL903-100	Amp <sup>R</sup>	<i>ktrB</i> in pBAD18 mit C terminalen His Tag und dem As Austausch C90S	diese Arbeit
pEL903-101	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch A286C	diese Arbeit
pEL903-102	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch T300C	diese Arbeit

pEL903-103	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch S317C	diese Arbeit
pEL903-104	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch T318C	diese Arbeit
pEL903-106	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch T320C	diese Arbeit
pEL903-107	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch S327C	diese Arbeit
pEL903-109	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch V331C	diese Arbeit
pEL903-110	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch F333C	diese Arbeit
pEL903-111	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch W337C	diese Arbeit
pEL903-112	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch T338C	diese Arbeit
pEL903-113	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch F339C	diese Arbeit
pEL903-114	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch L340C	diese Arbeit
pEL903-115	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch R341C	diese Arbeit
pEL903-116	Amp <sup>R</sup>	pEL903-100 mit dem Aminosäureaustausch K343C	diese Arbeit
pKT84	Amp <sup>R</sup>	pHG165-Derivat	Nakamura <i>et al.</i> , 1998
pNTCI2	Amp <sup>R</sup>	pKT84 mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für den Aminosäureaustausch C90S	N.Tholema (2002)
pNTCI2 317C	Amp <sup>R</sup>	pKT84 mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für die Aminosäureaustausche C90S und S317C	diese Arbeit
pNTCI2 318C	Amp <sup>R</sup>	pKT84 mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für die Aminosäureaustausche C90S und T318C	diese Arbeit
pNTCI2 319C	Amp <sup>R</sup>	pKT84 mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für die Aminosäureaustausche C90S und S319C	diese Arbeit

pNTC12 320C	Amp <sup>R</sup>	pKT84 mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für die Aminosäureaustausche C90S und T320C	diese Arbeit
pNTC12 333C	Amp <sup>R</sup>	pKT84 mit Mutation in <i>ktrB</i> kodierend für die Aminosäureaustausche C90S und F333C	diese Arbeit
pSU18PhoA	Cam <sup>R</sup>	Vektor mit PhoA BamHI Kasette im Leseraster +1	Dr.Knut Jahreis (Genetik, Universität Osnabrück)
pSU18LacZ	Cam <sup>R</sup>	Vektor mit LacZ BamHI Kasette im Leseraster +1	Dr.Knut Jahreis (Genetik, Universität Osnabrück)

Tabelle 2.3: Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
KtrB BamHlf	GGCAAGGATCCAGGAATCATTATGACGC
KtrBK229Pstlr	GTAAGAAGTGCTGCAGTTTACGCCAATG
KtrBK239Pstlr	GTGTTGGGGTTCTGCAGTTCCAAAAGC
KtrBE260Pstlr	GTGGCAATCAACTGCAGTTTGGTGTG
KtrBN263Pstlr	GACCCCATGGTCTGCAGGTTGTGACG
KtrBA286Pstr	GTAAAACCCGCCTGCAGCGCACTGGC
KtrBS293Pstlr	CTGCGTAACTGCAGACTGTAAAAC
KtrBD295Pstlr	GCGTGAAGTCTGCAGATCAACACTG
KtrBT300Pstlr	GTGTTGATTTAACGCTGCAGACGCAAC
KtrBQ301Pstlr	GATGAGTAACTGCAGTTGCGTGAAC
KtrBG316Pstlr	CACCCGTAGACTGCAGACCCGCACCAATG
KtrBK325Pstlr	CCGCAAAGTCTGCAGACCCGCACCAATG
KtrBV331Pstlr	CTACTTTTGCGGTCCTGCAGATGGCGAC
KtrBL340Pstlr	CGTGTTCCTTCTGCAGCAAGAACGTC
KtrBK344Pstl	GCGTCAAAGAAACTGCAGGTGATGTTTAAG
KtrBR351Pstl	GATGTTTAAGAGACTGCAGAACTGGCC
KtrBK360Pstl	CGGTAACAAAGCTGCAGGCAATCATTG

pPAB404SEQr	CGCTAAGAGAATCACGCAGAGC
PhoAseqf	CTCGGCTGCATCAGCAACCG
LacZseq1f	AAAACCGCCTCGCGGTGATG
LacZseq2f	GCTGTTCCGATTATCCGAAC
LacZseq3f	TACAGGGCGGCTTCGTCTGG
pKT84BahmH1E260fo	GGCTTTGGAAGGATCCAACCCCAACACCATGGGG
pKT84BamHIE260re	CCCCATGGTGTGGGGTTGGATCCTTCCAAAAGC
pKT84BamHIV331fo	CTACTTTTGCGGTCGGATCCATGGCGACGTGG
pKT84BamHIV331re	CCACGTCGCCATGGATCCGACCGCAAAGTAG
pKT84BamHIL340fo	CGTGGACGTTCTTGGGATCCAAGAAACACGTG
pKT84BamHIL340re	CACGTGTTTCTTGGATCCCAAGAACGTCCACG
pKT84BamHIR351fo	GATGTTTAAGAGAGGATCCAAGTGGCCAACGG
pKT84BamHIR351re	CCGTTGGCCAGTTGGATCCTCTCTTAAACATC
KtrB317Cysf	GATTGGTGCGGGTTGTACCTCTACGGGTG
KtrB317Cysr	CACCCGTAGAGGTACAACCCGCACCAATC
KtrB318Cysf	GGTGCGGGTTCGTGCTCTACGGGTGGC
KtrB318Cysr	GCCACCCGTAGAGCACGAACCCGCACC
KtrB319Cysf	GCGGGTTCGACCTGTACGGGTGGCGG
KtrB319Cysr	CCGCCACCCGTACAGGTCTGAACCCGC
KtrB320Cysf	GGTTCGACCTCTTGGGTGGCGGTATC
KtrB320Cysr	GATACCGCCACCGCAAGAGGTCTGAACC
KtrB333Cysf	CTTTTGCGGTCGCGTGTATGGCGACGTGGAC
KtrB333Cysr	GTCCACGTCGCCATACACGCGACCGCAAAG
M13 rev (-49)	GAGCGGATAACAATTCACACAGG
PhoAinfor	CTCTAGAGGATCCCGGATAACCTTTCAG
PhoAinrev	CCCGGGGATCCCGGGTACCTGACTC
LacZinfor	CTCTAGAGGATCCCCAGACCAACTGG
LacZinrev	CCCGGGGATCCGTCGTTTTACAACG

**Tabelle 2.4: Verwendete Materialien und Chemikalien**

Becton & Dickinson  
Calbiochem

Bacto™-Yeastextract; Bacto™-Tryptone  
n-Dodecyl-β-D-maltoside, Ultrol Grade

Peqlab Biotechnologie GmbH(Erlangen)	„PeqGOLD“ Protein-Molekulargewichtsstandards; Nassblotapparatur
Qiagen (Hilden)	„QIAprep Spin Miniprep“-Kit; „QIAquick Gel Extraction“-Kit; „Dye Ex™ 2.0 Spin“-Kit; Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose; Penta-His-Antikörper
Schleicher & Schüll (Dassel)	„Protan® Nitrocellulose Membran“
MWG Biotech (Ebersberg)	Synthetische Oligonukleotide
New England Biolabs (Frankfurt a. M.)	Restriktionsenzyme; BstE II- geschnittene λ-DNA
Roth GmbH (Karlsruhe)	Antibiotika; „rotiphorese® Gel 30“ Fertiglösung
Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	Protease-Inhibitor-Cocktail P8849; L-(+)-Arabinose
TaKaRa Biomedicals (Shiga, Japan)	Ligationskit Ver 2, Takara Ex Taq
TRC (Toronto Research Chemicals Inc)	MTSSL [1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-3-methyl] Methanethiosulfonate
Molecular Probes, Inc. (Leiden, NI)	N <sup>ε</sup> -(3-maleimidylpropionyl)biocytin; 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'- disulfonsäure
Avanti Polar Lipids, Inc.	<i>E. coli</i> polar lipids extract in Chloroform 20 mg/ml
MERCK	Triton-X100
Westfalen-AG	Argon, Stickstoff (gasförmig)

Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen Bayer (Leverkusen), Biomol (Hamburg), BioRad (München), Biozym Diagnostics GmbH (Hess. Oldendorf), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Eggenstein), ICN Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio), E. Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad “pro analysis“ bezogen.

## 2.2 Anzuchtverfahren

Die Anzucht der in Tab. 2.1 aufgeführten Stämme erfolgte in LB-Medium [1% NaCl, 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt]. Im Fall von Fermentationen wurde diesem Medium 0,5% Glycerin als zusätzliche Kohlenstoffquelle und 0,05% L-Arabinose zur Induktion des pBAD-Promotors hinzugefügt. KML-Medium [1% KCl, 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt] wurde im Fall von LB2003 verwendet. Für Komplementationsversuche wurden phosphatgepufferte Medien mit definierten Kalium-Konzentrationen nach Epstein und Kim (1971), die zusätzlich mit Thiamin (1 mg/ml) sowie Glukose (10 mM) bzw. im Fall von pBAD18-Derivaten mit 0,2% (f.c.) Glycerin als Kohlenstoffquelle versetzt wurden (siehe auch 2.2.1), verwendet. Um feste Nährböden zu erhalten, wurden die Medien mit 1,5% Agar versehen. Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 100 µg/ml (Ampicillin, Carbenicillin), 25 µg/ml (Kanamycin), 12,5 µg/ml (Tetracyclin) bzw. 34 µg/ml (Chloramphenicol). Die Anzuchten wurden bei 37 °C aerob im Fermenter bei einer konstanten Sauerstoffspannung von mindestens 60% durchgeführt. Um die optische Dichte bei 578 nm zu bestimmen, wurde ein Shimadzu Spektrophotometer UV-120-02 verwendet.

### 2.2.1 Komplementationstest

Um zu überprüfen, ob die jeweiligen an *ktrB* vorgenommenen Modifizierungen Einfluss auf den K<sup>+</sup>-Transport nehmen, wurden K<sup>+</sup>-Aufnahme-defiziente *E. coli*-Zellen LB2003 mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Die Zellen wurden in K30-Flüssigmedium bei 37 °C über Nacht angezogen. Die Flüssigmedien wurden aus der K30-Übernachtskultur mit einer Verdünnung von 1:300 angeimpft. Die gewünschte K<sup>+</sup>-Konzentration wurde mittels definierter K<sup>+</sup>-Stocklösungen eingestellt. Die Komplementation wurde in Flüssigmedium definierter K<sup>+</sup>-Konzentrationen (K0,1; K1; K3; K6; K10; K30; K115) nach 20-24 Stunden getestet. Hierzu wurde die OD<sub>578</sub> ermittelt und gegen die Kaliumkonzentration aufgetragen (modifiziert nach Epstein und Kim; 1971).

### **2.2.2 Entfernung von Kalium und Natrium aus *E. coli* Zellen**

Nach Waschen mit einem 120 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, wurden die Zellen mit demselben Puffer auf 10 mg/ml Trockengewicht eingestellt, wobei davon ausgegangen wurde, dass eine  $OD_{578nm} = 1$  einem Zelltrockengewicht von 0,3 mg/ml entspricht (Bakker & Mangerich, 1981). Anschließend wurden die Zellen mit 1 mM EDTA für 10 min bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert, um internes Kalium und Natrium zu entfernen. Es folgten drei Waschschrte in Kalium/Natriumfreiem Triethanolamin-MES-Puffer (50 mM), pH 6.1. Die Zellen wurden am Ende resuspendiert und weiterverarbeitet.

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 Plasmidisolierung**

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Übernachtskulturen mittels „QIAprep Spin Miniprep“-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. In Abwandlung des Protokolls wurde die DNA in 50 µl  $H_2O_{bidest}$  (pH 7,5) aufgenommen.

### **2.3.2 DNA-Modifikation**

Standard-DNA-Techniken wurden, sofern nicht anders beschrieben, nach Maniatis *et al.* (1989) und Asubel *et al.* (1991) durchgeführt. Um zielgerichtete Mutationen zu erzielen, wurde das „QuickChange“ Site-Directed-Mutagenesis Kit von „Stratagene“ (La Jolla, Kalifornien) verwendet. Das Herstellerprotokoll wurde dahingehend verändert, dass die Zyklenzahl auf 18, die initiale Denaturierung bei 95 °C von 30 s auf pauschal 5 min, die Denaturierungszeiten im Zyklus von 30 auf 45 s und die Elongationszeit auf 20 min gesetzt wurde.

*In vitro* Modifikationen von DNA, wie z.B. Restriktion und Ligation, wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Um definierte DNA-Fragmente zu amplifizieren und Modifikationen am 5'-bzw. 3'-Ende einzufügen, wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Die Annealing-Temperaturen wurden sowohl anhand der  $T_m$  wie auch mit Hilfe der empirischen Formel  $T_{\text{Annealing}} = 4 \text{ °C} * (G+C) + 2 \text{ °C} * (A+T) - 5 \text{ °C}$  abgeschätzt. Es wurden die Takara Ex Taq, sowie die Taq-Polymerase von „MBI Fermentas“ nach Herstellerangaben in einem Master Cycler Gradient der Firma „Eppendorf“ verwendet.

### 2.3.4 DNA-Gelelektrophorese

Analytische und präparative DNA-Auftrennung wurde mit Hilfe einer 0,8-1%igen Agarose-Gel-Matrix in TAE-Puffer (40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) durchgeführt. Der 6,7fach Probenpuffer setzt sich wie folgt zusammen: 0,25% Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF, 15% Ficoll. Als Größenstandard wurde mit BstE II geschnittene  $\lambda$ -DNA der Firma „New England Biolabs“ genutzt. Der Gellauf wurde in einem „Easycast Electrophoresis System“ Modell #B1 oder #B2 (PeqLab, Erlangen) bei konstant 120 V für 30-60 min durchgeführt. Die Färbung der DNA erfolgte in einem Ethidiumbromidbad (250  $\mu\text{g/l}$ ) für mindestens 10 min. Zur Dokumentation der gefärbten Gele fand eine „E.A.S.Y.“store Anlage von „Herolab“ (Wiesloch) Verwendung.

### 2.3.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden nach Herstellerangaben mittels „Qiaquick Gelextraction Kit“ (Qiagen, Hilden) aus Agarosegelen extrahiert. Zur Elution wurden 30  $\mu\text{l}$  steriles  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  (ph 7,5) verwendet.

### 2.3.6 Kompetente Zellen und Transformation

Mit Ausnahme von „*E.coli* DH5 $\alpha$ “-Zellen (subcloning efficiency), die von der Firma „Life Technologies“, Eggstein bezogen wurden, sind alle in dieser Arbeit verwendeten kompetenten Zellen nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt worden. Hierzu wurde eine 50 ml Kultur 1:100 aus einer Vorkultur angeimpft und bis OD<sub>578</sub> von 0,5 wachsen gelassen. Die Ernte erfolgte bei 5000xg für 5 Minuten bei 4 °C unter sterilen Bedingungen. Das Zellpellet wurde in 20 ml eiskalten, sterilen 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal wie oben beschrieben abzentrifugiert und in 2 ml eiskalten, sterilen CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Inkubationszeitraum kann bis zu 4 h ausgeweitet werden. Zur Lagerung wurden die 2 ml kompetenten Zellen mit 650  $\mu$ l sterilem, kaltem 87%igen Glycerin versetzt, gemischt und aliquotiert. Die Aliquots werden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Für einen Transformationsansatz wurden 50 bis 250  $\mu$ l kompetente Zellen mit 100-200 ng DNA gemischt und für 1 h auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 60 s bis 2 min bei 42 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen zur phänotypischen Expression mit 1 ml Medium versetzt und für 1,5 h bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Kultur wurden je nach Effizienz der Transformation 150  $\mu$ l bzw. der ganze Ansatz auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.3.7 DNA-Sequenzanalyse

Zur Überprüfung etwaiger DNA-Konstrukte wurde der Sequenzierungsservice der Speziellen Botanik (Universität Osnabrück) sowie der Firma „Seqlab Sequence Laboratories“, Göttingen genutzt. Die Sequenzierungsansätze wurden entsprechend der Serviceanbieter vorbereitet.

### **2.3.8 Konstruktion der Plasmide**

(siehe Tabellen 2.1, 2.2, 2.3)

#### **2.3.8.1 pPAB404-KtrB-Derivate**

Die Plasmide pMBPhoA229, 239, 260, 263, 286, 293, 295, 300, 301, 316, 325, 327, 331, 340, 344, 351 und pMBPhoA360 wurden durch PCR (2.3.3) mit den Primern KtrBBamHI\_f und den jeweiligen KtrBk229PstIrev (entsprechend der Position s.o.) hergestellt. Als Template für die PCR diente pKT84. Die hierdurch entstandenen Fragmente wurden über die Schnittstellen BamHI und PstI in den Vektor pPAB404 gebracht (2.3.2). Durch diese Schritte wird C-terminal an ein partielles KtrB eine funktionelle alkalische Phosphatase angehängt.

#### **2.3.8.2 pJLZ104-KtrB-Derivate**

Die Plasmide pMBLacZ260, 263, 286, 293, 295, 300, 316, 325, 327, 331, 340, 344, 351 und pMBLacZ360 wurden wie folgt hergestellt: Das Insert wurde jeweils aus den pMBPhoA-Plasmiden mit DraI und EcoRI herausgeschnitten und in den mit EcoRI und SmaI geöffneten Vektor pJLZ104 ligiert (2.3.2). Die Blunt End Schnittstellen DraI und SmaI werden dabei zerstört. Durch diesen Schritt wird an das partielle KtrB eine funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase fusioniert.

#### **2.3.8.3 pKT84BamHI 260 bis pKT84BamHI 351**

Als Ausgangsplasmid wurde hierfür der Vektor pKT84 verwendet, der einer gezielten Mutagenese (2.3.2) mit den Primerpaaren pKT84BamHIE260fo und pKT84BamHIE260rev unterzogen wurde. Das so entstandene Plasmid wurde pKT84BamHI 260 genannt. Weitere analog hergestellte Konstrukte mit den entsprechenden Primerpaaren sind für die Positionen 331, 340, 351 vorhanden und entsprechend benannt.

#### **2.3.8.4 Sandwichfusionsplasmide pMBPhoA 260S bis pMBPhoA 351S und pMBLacZ 260S bis pMBLacZ 351S**

Die BamHI-Kassetten eines Gens für eine alkalische Phosphatase bzw. einer  $\beta$ -Galaktosidase wurden aus den Vektoren pSU18PhoA bzw. pSU18LacZ entnommen und in die inserierte BamHI-Schnittstelle im *KtrB*-Gen der Plasmide pKT84BamHI260 bis pKT84BamHI351 ligiert (2.3.2). Die so entstandenen Plasmide erhielten die Bezeichnungen pMBPhoA260S bis pMBPhoA351S und pMBLacZ260S bis pMBLacZ351S.

#### **2.3.8.5 KtrB-Einzelmethioninvarianten**

##### **2.3.8.5.1 pKT84-Derivate (pNTCI2 317C bis pNTCI2 333C)**

Als Ausgangsplasmid hierfür wurde das Plasmid pNTCI2 verwendet. Als Mutagenese-PCR-Primer wurden jeweils die Paare KtrB317Cysf und KtrB317Cysr bis KtrB333Cysf und KtrB333Cysr verwendet. Die so entstandenen Plasmide wurden pNTCI2 317C bis pNTCI2 333C genannt (2.3.2).

##### **2.3.8.5.2 pETKtrABH-Derivate (pETC317 bis pETC333)**

Als Ausgangsplasmid hierfür wurden die Einzelmethionin-pKT84-Derivate pNTCI2 317C, 318, 319, 320 bis pNTCI2 333C verwendet. Aus diesen Vektoren wurde durch eine Restriktion mit *AgeI* und *PstI* ein ~1 kb Fragment von *ktrB* herausgeschnitten. Die so gewonnenen Fragmente wurden in den mit denselben Enzymen geöffneten Vektor pETCI überführt (2.3.2). Die so entstandenen Plasmide wurden pETC317, 318, 319, 320, pETC333 genannt.

##### **2.3.8.5.3 pEL903-Derivate (100 bis 116)**

Um diese Plasmide herzustellen, wurde ein partielles Teilstück von *ktrB* mit *MscI* und *BlnI* aus den Vektoren pETCI bis pETC333 sowie den Vektoren pAR337 und pAR343

herausgeschnitten und jeweils in den mit den gleichen Enzymen geöffneten pEL903-Vektor ligiert. Die so entstandenen Plasmide erhielten den Namen pEL903-100 bis pEL903-116.

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Überexpression von *ktrB*-6xHis

Die Überexpression von *ktrB*-6xHis erfolgte während dieser Arbeit über zwei verschiedene Systeme. Zum Einen wurde es als pET29b Derivat durch IPTG-Induktion exprimiert, zum Anderen als pBAD18-Konstrukt, welches einen Arabinose-induzierbaren-Promotor trägt.

#### 2.4.1.1 pET29b-Derivate

600 ml Medium wurden auf  $OD_{578nm}$  0,1 aus einer Vorkultur C43/pETKtrABH (oder andere pET29b Derivate) angeimpft und bei 37 °C bis OD 0,7 geschüttelt (siehe 2.2). Die Induktion erfolgte mit 1 mM IPTG. Nach weiteren 20 min erfolgte die Zugabe von 50 ng/ml Rifampicin mit anschließender 2-3 stündiger Inkubation unter Schütteln bei 37 °C.

#### 2.4.1.2 pBAD18-Derivate

5 l LB-Medium + 0,5% Glycerin wurden auf eine  $OD_{578}$  0,1 aus einer Vorkultur Rosetta2/pBAD18-KtrB-Derivate angeimpft und bei 37 °C und einer konstanten Sauerstoffspannung von mindestens 60% (siehe 2.2) in einem „Braun Biostat Laborfermenter“ fermentiert. Die Induktion erfolgte mit 0,05% L-Arabinose der Firma „Sigma“ aus einer 10%igen Stocklösung mit Beginn der Anzucht.

### 2.4.2 Markierung von Cysteinresten mit Thiolreagenzien in intakten Zellen

Um Cystein-Zugänglichkeiten von KtrB-Einzelcysteinvarianten zu bestimmen, wurden Zellen des Stammes *E. coli* C43 mit pET29b-Derivaten angezogen und nach der Ernte mit MES-Puffer [50 mM Na<sup>+</sup>/MES pH 6,1; 500 mM NaCl] auf eine Proteinmenge von 15,75 mg eingestellt (OD<sub>578</sub> = 1 ~ 150 µg/ml; Bakker & Mangerich 1981). Es wurden die ganzen Zellen optional mit 1 mM 4-Acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonsäure als Blockierungsreagenz/Schutzreagenz (bzw. Blockierungs-/Schutzmaleimid) (Membran-impermeabel) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um das überschüssige Reagenz aus den Ansätzen zu entfernen, wurden die Bakterien im Anschluss drei mal mit dem Reaktionspuffer (siehe MES-Puffer) gewaschen und dann mit 200 µM N<sup>α</sup>-(3-maleimidylpropionyl)biocytin (später auch: biotinyliertes Maleimid bzw. Biotinmaleimid) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses biotinylierte Maleimid wurde zur Detektion der nicht geschützten Maleimide verwendet. Um sämtliche Reaktionen abzustoppen, wurden die Ansätze mit 50 mM β-Mercapto-Ethanol versetzt. Die Proben wurden drei weitere Male gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert, sofern Weiterverarbeitung nicht sofort erfolgen sollte.

### 2.4.3 Markierung von Cysteinresten mit Methan-Thiosulfonat-Spinlabel

Die Spinlabel-Markierung von KtrB-6xHis Einzelcysteinvarianten erfolgte nach einem von unter 2.4.4.2 beschriebenen und abgewandelten Reinigungsprotokoll. KtrB-6xHis wurde, wie in 2.4.1 beschrieben, angezogen und im Anschluss gereinigt und markiert. Hierfür wurde das 2.4.4.2 beschriebene Reinigungsprotokoll derart abgewandelt, dass die Markierung in NiNTA gebundener Form erfolgte. Ab der Solubilisierung bis einschließlich „Waschpuffer 30“ wurden alle Puffer mit 2 mM β-Mercapto-Ethanol versehen. Hierbei wurde das Waschvolumen von 30fachem Säulenvolumen auf das 45fache angehoben. Der „Waschpuffer 50“ wurde durch entgasten Puffer K (50 mM KPi, pH 7; 200 mM NaCl; 10% Glycerin; 0,04% n-Dodecyl-β-D-Maltoside) mit 50 mM Imidazol ersetzt (=“Puffer K50“). Dieser Puffer wurde eingesetzt, um überschüssiges β-Mercapto-Ethanol zu entfernen und um die Säule auf die Reaktionsbedingungen zu äquilibrieren. Von 2 ml dieses Puffers

(versetzt mit 1 mM MTSSL [100 mM MTSSL, Toronto Research Chemical Inc., Stock in Acetonitril der Firma „Roth“]) durchliefen 1,5 ml die Säule, welche daraufhin verschlossen und über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Um ungebundenen Spinlabel zu entfernen, wurde die Matrix mit 50fachem Bettvolumen „Puffer K 50“ (s. o.) gewaschen. Die Elutionen erfolgten wie unter 2.4.4 beschrieben.

### 2.4.4 Reinigung von KtrB-6xHis via NiNTA-Affinitätschromatographie

#### 2.4.4.1 pET29b-Derivate

Die Anzucht und Ernte erfolgte wie unter 2.2 und 2.4.2 beschrieben. Die Reinigung im Anschluss an die Cystein zugänglichkeitsmarkierung wurde wie folgt durchgeführt: Der Zellaufschluss wurde in einem Volumen von 3 ml „Puffer S“ [50 ml Tris/HCl, pH 8,0; 600 mM NaCl; 10% Glycerin] und „Protease Inhibitor Cocktail zur Reinigung von Histidin getaggen Proteinen“ (1:100) der Firma „Sigma Aldrich“ (Pi-Mix) vorgenommen. Als Beschalldauer wurde 3-mal 20 s gewählt, wobei immer 20 s Pause eingehalten wurden. Die Einstellungen des „Cell Disruptors“ der Firma „Branson“ waren folgende: Duty cycle 50% und Intensität 5 (kleine Spitze). Dieser Schritt fand in einem Eiswasserbad statt. Danach wurde das Zelllysat zentrifugiert (18500xg, 15 min), was Zelltrümmer sowie nicht aufgeschlossene Zellen entfernte. Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde der Überstand in einer MiniUltrazentrifuge der Firma „Beckmann“ in einem TLA 100.3 Rotor bei 80000 rpm für 30 min zentrifugiert. Das hierbei gewonnene Membranpellet wurde in 150 µl „Puffer S“ + Pi-Mix aufgenommen, mit demselben Puffer auf 2 ml aufgefüllt und zum Solubilisieren auf eine n-Dodecyl-β-D-maltoside (Calbiochem)-Konzentration von 1,5% (w/v) eingestellt. Die Ansätze wurden für 2 h auf Eis geschüttelt und einer erneuten Ultrazentrifugation (s.o.) unterzogen. Der Überstand wurde anschließend auf eine verschließbare 2 ml-Tropfsäule (Qiagen) mit 1/20 Volumen (abgesetztes Säulenmaterial) Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Qiagen) gebracht, welche mit „Waschpuffer 10“ [20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10% Glycerin; 0,2 M NaCl; 0,04% DDM; 2 mM β-Mercapto-Ethanol; 10 mM Imidazol] äquilibriert worden war, und für 60 min bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen der Säule mit der 100fachen Menge des Säulenmaterials an „Waschpuffer 30“ [20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 % Glycerin; 0,2 M NaCl; 0,04 % DDM; 2 mM β-

Mercapto-Ethanol; 30 mM Imidazol] entfernt. Ein weiterer Waschschrift mit dem 15fachen Säulenvolumen an „Waschpuffer 50“ [s.o.; 50 mM Imidazol] diente dazu, unspezifisch gebundene Proteine von der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose zu lösen. Die Elution der KtrB-Derivate erfolgte durch Waschpuffer mit einer Imidazolkonzentration von 100 mM in zwei Fraktionen von je 1/10 des Ausgangsvolumens und weiteren zwei Fraktionen mit Reinigungspuffer (200 mM Imidazol).

### 2.4.4.2 pBAD18-Derivate

Die wie in 2.4.1 kultivierten Zellen wurden mittels Zentrifugation (13500xg ,10 min) geerntet. Das Zellpellet wurde mit „Puffer S“ + 1mM EDTA (50 mM Tris/HCl, pH 8; 600 mM NaCl; 10% Glycerin) gewaschen und wie oben beschrieben erneut pelletiert. Das Zellnassgewicht des Pellets wurde bestimmt und (das Pellet) anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C. Die eingefrorenen Zellpellets wurden in „Puffer S“ + 1 mM EDTA resuspendiert (50 ml Puffer auf 10 g Zellnassgewicht), wobei zusätzlich eine Spatelspitze „Deoxyribonuclease I from bovine pancreas“ (Sigma Aldrich) und „Protease Inhibitor Cocktail zur Reinigung von Histidine getaggtten Proteinen“ der Firma „Sigma Aldrich“ (1:100) zugegeben wurden.

Der folgende Zellaufschluss geschah in 40 ml Portionen mit einem Cell Disruptor B15 der Firma „Branson“ für 5 x 30 s mit jeweils 30 s Pause in einem Eiswasserbad. Es wurde die vom Hersteller für dieses Volumen vorgesehene Spitze bei 50% duty cycle und einer Intensität von 7 verwendet. Die Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenen Zellen wurden in einem sogenannten „Low Speed Pellet“ bei 18500xg für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Ultrazentrifugation bei 235000xg für 90 min in Cytoplasma und Membranfraktion aufgetrennt. Im Folgenden konnte mit den isolierten Membranen weitergearbeitet werden. Diese wurden in „Puffer S“ (50 mM Tris/HCl, pH 8; 600 mM NaCl; 10% Glycerin) resuspendiert, flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Die Solubilisierung der Membranfraktion erfolgte mit einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml und einer n-Dodecyl-β-D-maltoside (Calbiochem)- Konzentration von 1,5% (w/v). Der Solubilisierungsansatz wurde für 2 h bei 4 °C geschüttelt (in einem Standardansatz für die ESR-Spektroskopie wurden 200 mg Membranprotein eingesetzt). Um die solubilisierten Proteine von den Membranresten zu trennen,

erfolgte ein weiterer Ultrazentrifugationsschritt bei 340000xg für 30 min bei 4 °C. Der Überstand wurde für die NiNTA-Affinitätschromatographie verwendet. Die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen und im Anschluss mit „Waschpuffer“ + 10 mM Imidazol (20 mM Tris/HCl, pH 8; 200 mM NaCl; 10% Glycerin; 0,04% n-Dodecyl-β-D-Maltoside) mit dem 10fachen Säulenvolumen äquilibriert. In einem Ansatz mit 200 mg Membranproteinen wurde 1 ml Bettvolumen Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Qiagen) verwendet. Das Solubilisat wurde für 2 h mit der äquilibrierten Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose bei 4 °C unter Schütteln inkubiert und im Anschluss in ein 5 ml Tropfsäulchen (Qiagen) überführt. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Matrix im ersten Waschschrift mit „Waschpuffer“ + 30 mM Imidazol und einem 30fachen Säulenvolumen gewaschen. Der folgende Waschschrift enthielt 50 mM Imidazol, anstatt der zuvor verwendeten 30 mM. Die Volumina blieben allerdings konstant. Die Elution der KtrB-6xHis-Derivate erfolgte mit „Waschpuffer“ in insgesamt drei Imidazolstufen (100 mM ; 150 mM ; 250 mM ) mit jeweils 2-mal 3fachem Säulenvolumen.

### 2.4.5 Rekonstitution von KtrB-6xHis in polare *E. coli* Lipide

#### 2.4.5.1 Vorbereitung der Lipide

Die Rekonstitution erfolgte in Anlehnung an die Veröffentlichungen von Lévy *et al.* (1990 a and b), Rigaud *et al.* (1995), Lasch *et al.* (1995) und Holloway (1973).

„*E. coli* polar lipids“ (20 mg/ml in Chloroform) der Firma „Avanti Polar Lipids, Inc.“ wurden unter Argon-Begasung bei Raumtemperatur und Lichtausschluss eingedampft. Das Lipidpellet wurde in 50 mM KPi, pH 7,5; 0,5% Octyl-β-D-glucopyranoside (Sigma/Biomol) und 2 mM β-Mercapto-Ethanol mit einer Konzentration von 10 mg/ml resuspendiert. Um das Detergenz zu entfernen, wurden die Lipide 3-mal gegen den Puffer ohne Detergenz mit einem Faktor von 1:350 dialysiert. Die ersten zwei Dialyseschritte wurden für 2 h und der dritte für mindestens 16 h durchgeführt. Alle Dialyseschritte erfolgten bei 4 °C. Die Lipidlösung wurde schockgefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Direkt vor der Verwendung der Lipide wurden diese mit einem Mini Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc) sowie Whatman 400 nm PC Membranfiltern und Filtersupports (Avanti Polar Lipids, Inc) auf

eine einheitliche Größe gebracht und unilamellar gemacht (Mayer *et al.*, 1986). Nach 19 Membranpassagen wurden die Lipide auf der *trans*-Seite entnommen.

#### 2.4.5.2 Vorbereitung der SM2-BioBeads

Um Detergenzien aus Lösungen zu entfernen, ohne dabei das Protein zu verdünnen oder in irgendeiner Weise zu beeinflussen, entwickelte P.W. Holloway (1973) eine hierfür geeignete Methode. Dafür setzte er sogenannte BioBeads ein. In dieser Arbeit wurden SM2-BioBeads der Firma „BioRad“ verwendet. Sie wurden wie folgt vorbereitet:

3 g BioBeads wurden mit 50 ml Methanol 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die BioBeads wurden in einem Tropf-Plastiksälchen der Firma „Qiagen“ vom Methanol getrennt und mit weiteren 125 ml Methanol gewaschen. Im Anschluss wurden sie mit 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gespült. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>. Direkt vor der Nutzung wurden die Beads für 30 min in dem Reaktionspuffer äquilibriert.

#### 2.4.5.3 Rekonstitution von VaKtrB

Um solubilisiertes KtrB in „*E. coli* polar Lipid“-Liposomen zu rekonstituieren, wurde ein abgewandelter Ansatz nach Rigaud *et al.* (1995) und Levy *et al.* (1990 a und b) durchgeführt. Hierzu wurde KtrB-6xHis in einem Protein zu Lipid Verhältnis von 1:30 eingesetzt. Die Lipide wurden im Ansatz auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml eingestellt, wobei die Proteinmenge variabel in Abhängigkeit der Lipidgesamtmenge ist. Hierzu wurden Gesamtlipidmengen von 1 mg bis 20 mg pro Ansatz eingesetzt. Ein für die ESR-Messungen durchgeführter Standardansatz beinhaltete 200 bzw. 400 µg KtrB bei einer Lipidmenge von 6 bzw. 12 mg. Es wurde Triton-X100 p.a. (MERCK) in der gewünschten Konzentration zugegeben (Standardansatz 1,5% (v/v) zur totalen Solubilisierung der Lipide). Lévy *et al.* (1990) konnten zeigen, dass die Wahl des Triton-X100 je nach Hersteller einen deutlichen Einfluss auf das Verhalten bei der BioBead-Behandlung hat, also die Geschwindigkeit des Detergenzentzugs aus der Lösung beeinflusst. Das Detergenz wurde als letztes unter Rühren zum Ansatz gegeben, der im Folgenden bei Raumtemperatur für 20 min bei leichter

Bewegung inkubiert wurde. Die Biobeads wurden sukzessive in einem 5fachen Überschuss (im Vergleich zu Triton-X100) nach der oben durchgeführten Inkubation zugegeben, sowie nach weiteren 1,5 h. Die dritte Zugabe erfolgt mit einem 10fachen Überschuss nach insgesamt 3 h. Danach wurde der Ansatz bei 4 °C über Nacht unter leichter Bewegung inkubiert. Die Proteoliposomen wurden 2-mal mit dem doppelten Ansatzvolumen gewaschen, bei  $r_{\max}$  von 265000xg für 1 h in einer Beckman Ultrazentrifuge pelletiert und in 15 µl (bei 12 mg Lipid) resuspendiert. Etwaige Dokumentationen des Lipid-Solubilisierungsstatus bzw. der Entfernung der Detergenzien aus dem Ansatz wurden photometrisch bei  $OD_{600nm}$  durchgeführt.

## **2.4.6 PhoA-Test**

### **2.4.6.1 PhoA-Plattentest**

Dieser Test erfolgte auf KML-Festmedien, die mit 40 µg/ml BCIP (Natrium-Salz), Antibiotikum und wahlweise 0,03-0,05 mM IPTG als Induktor versehen wurden. Als Teststämme wurden *E. coli* CC181 (sowie SF 120 Zellen) verwendet, die mit den pPAB404-Derivaten pMBPhoA oder den pKT84-Derivaten pMBPhoA S transformiert waren. Die Platten wurden nach dem Animpfen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei einer Aktivität der alkalischen Phosphatase sollte eine Blaufärbung zu detektieren sein.

### **2.4.6.2 PhoA-Test in ganzen Zellen**

Die Anzucht der CC181-pPAB404-Derivate (sowie SF 120 Zellen) und pKT84-Sandwichfusions-Konstrukte erfolgte in 5 ml Vollmedium, das wahlweise mit und ohne IPTG (0-0,3 mM) sowie Ampicillin versetzt wurde. Die Zellen wurden bei einer  $OD_{578}$  0,5 geerntet, wobei die optische Dichte in einem Röhrenphotometer „Spectronic 20 Genesys“ ermittelt wurde. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000 rpm für 15 min in einer Variofuge) und anschließend mit 5 ml Waschpuffer [PhoA] (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl) gewaschen und erneut pelletiert. Dieses Pellet wurde nun in 0,5 ml Waschpuffer (s.o.) resuspendiert. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,1 ml Zellen in Waschpuffer [PhoA] (s. o.)  
0,9 ml 1 M Tris-HCl, pH 9,0 ; 1 mM ZnCl<sub>2</sub>  
0,025 ml 0,1%igem SDS  
0,025 ml Chloroform

Diese Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sie gelegentlich geschüttelt wurden. Zum Zeitpunkt  $t=0$  erfolgte die Zugabe von 0,1 ml einer 0,4%igen p-Nitrophenylphosphat Na<sup>+</sup>-Salz Lösung. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bei 37 °C inkubiert. Die Zeit bis zur Farbreaktion (gelb) im Ansatz wurde festgehalten und dieser wurde sofort mit 0,1 ml einer 2,5 molaren K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung abgestoppt. Um Zelltrümmer und etwaige Störfaktoren für die photometrische Bestimmung der Proben zu entfernen, wurden diese für 10 min bei 9300xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in einem ShimadzuPhotometer bei 400 nm gemessen.

Der Umsatz wurde nach der Formel unter 3.1.1, basierend auf dem Lambert-Beerschen-Gesetz, berechnet.

### 2.4.7 $\beta$ -Galactosidase-Test

#### 2.4.7.1 $\beta$ -Galactosidase-Plattentest

Dieser Test erfolgte auf KML-Festmedien, die mit X-Gal, Antibiotikum und wahlweise 0,03-0,05 mM IPTG als Induktor versehen wurden. Als Teststämme wurden *E. coli* LZ110 bzw. XL1-Blue verwendet, die mit den pJLZ104-Derivaten pMBLacZ oder den pKT84-Derivaten pMBLacZ S transformiert wurden. Die Platten wurden nach dem Animpfen 5-8 h bei 37 °C inkubiert. Bei vorhandener  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität sollten sich die Kolonien blau färben.

#### 2.4.7.2 Test in ganzen Zellen

Die Vorkulturen wurden in KML mit oder ohne 1 mM IPTG sowie Ampicillin versehen und bei 37 °C inkubiert. Die hierzu verwendeten Stämme waren LZ110-Zellen mit pJLZ104-KtrB-Derivaten sowie den pKT84-Sandwichfusionsplasmiden pMBLacZ S.

Frisches Medium wurde anschließend mit 50 µl der Vorkultur angeimpft und bei einer OD<sub>600</sub> 0,28-0,7 in Eiswasser überführt und für 20 min gekühlt, was ein weiteres Wachstum der Bakterien verhindern sollte. Anschließend wurde erneut die aktuelle Zelldichte in den Proben bei OD<sub>600</sub> bestimmt. Die Ansätze wurden bei hohen β-Galactosidase-Aktivitäten wie folgt erstellt: 0,1 ml der Kultur wurden mit 0,9 ml „Puffer Z“ (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM β-Mercapto-Ethanol) versehen (bei niedrigen Aktivitäten: 0,5 ml Zellen +0,5 „Puffer Z“). Die Zellen wurden mit 2 Tropfen Chloroform und 1 Tropfen 0,1%igem SDS geöffnet. Der Ansatz wurde für 10 s gevortext. Die Eppendorfreaktionsgefäße wurden in einem Wasserbad bei 28 °C für 5 min auf Reaktionstemperatur gebracht. Gestartet wurde der Ansatz durch die Zugabe von 0,2 ml ONPG (4 mg/ml in 100 mM Phosphat-Puffer pH 7,0). Die Proben wurden kurz geschüttelt. Nach einer adäquaten Gelbfärbung wurde die Reaktion mit 0,5 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestoppt, die Zeit notiert und für jedes Röhrchen die Extinktion OD<sub>420nm</sub> bestimmt. Um die Lichtstreuung herausrechnen zu können, wurden zusätzlich die optischen Dichten bei 550 und 600 nm gemessen.

Die Miller-Units wurden nach der Formel unter 3.1.2 berechnet.

### 2.4.8 SDS-PAGE

Um Proteine elektrophoretisch aufzutrennen, wurden in dieser Arbeit SDS-PAGE nach Laemmli (1970) verwandt. Die Flachgele wurden in einer Apparatur (Mini-Protean) von BioRad hergestellt und verwendet (0,75 mm dick und 7x10 cm). Mit Hilfe der Fertiglösung Rotiphorese Gel 30 (Roth) wurden Sammelgele mit einer Acrylamid Konzentration von 4,9% und Trenngele mit 11% hergestellt. Die Proteinproben wurden mit 2fach Probenpuffer 1:1 gemischt (8% SDS, 24% Glycerin, 100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% β-Mercapto-Ethanol und 0,02% Serva Blau G). Als Proteinstandards dienten sowohl der „6His Ladder“ von Qiagen, sowie der „Prestained High Range“ Standard von Biorad wie auch die Proteinstandards peqGold I und III von Peqlab. Die Minigele wurden bei konstant 180 V gefahren. Die anschließende Coomassie-Färbung der Proteine erfolgte nach Weber & Osborn (1969), wobei die Färbelösung noch 10% TCA (w/v) enthielt, um die Proteine zu fixieren. Das Entfärben wurde mit einem Gemisch aus 5% Methanol (v/v) und 7,5% Essigsäure (v/v) erreicht. Eine optionale Entfärbevariante bestand darin, die Gele in

destilliertem Wasser in einer Mikrowelle zu kochen. Zur Konservierung wurden die Gele in einem „Slab Gel Dryer SE1160“ (Hofer) auf Whatmanpapier bei 80 °C getrocknet.

### 2.4.9 Immunblot

Um durch SDS-PAGE (2.4.8) aufgetrennte Proteine auf Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Schleicher & Schüll) via Elektrotransfer zu übertragen, wurde eine Nassblotkammer der Firma „peqlab“ verwendet. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 500 mA für 3,5 h bei 4 °C. Der Blotpuffer setzte sich wie folgt zusammen: 25 mM Tris-HCl, pH 8,6, 192 mM Glycin und 20% Methanol (v/v). Um die übertragenen Proteine auf der Membran kurzzeitig sichtbar zu machen, wurde eine Ponceau S –Lösung [0,2% Ponceau S (w/v), 3% TCA (v/v)] verwendet. KtrB mit His-Tag wurde mit Hilfe von Penta His-Antikörpern von Qiagen detektiert. Dabei wurde nach Vorschrift des Herstellers verfahren. Als sekundärer Antikörper kam der „Immunopure Antibody“ der Firma „Pierce“ zum Einsatz (1:5000). Dieser Goat-anti-Mouse-IgG ist ein alkalisches Phosphatase-Konjugat, welches zur Blotentwicklung mit Hilfe von NBT-BCIP (Roche Diagnostics GmbH) [100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>] verwendet werden kann.

Zur Detektion biotinylierter Proteine wurde ein Streptavidin-HRP-Konjugat der Firma „Amersham Life science“ eingesetzt. Die Lichtreaktion wurde mit dem „Supersignal Chemiluminescent Substrate“ der Firma „Pierce“ erzeugt (nach Herstellerangaben) und auf Hyperfilm ECL der Firma „Amersham Biotech“ dokumentiert.

Die KtrB-PhoA-Fusionsproteine wurden mit „Monoclonal Antibodies To Bacterial Alkaline Phosphatase“ (Caltag Laboratories) markiert und über den sekundären anti-Mouse-IgG (siehe oben) angefärbt.

Die KtrB-β-Galactosidase-Fusionsproteine wurden mit Hilfe eines anti-β-Gal-Antikörper der Firma „Promega“ nachgewiesen und über einen sekundären anti-Mouse-IgG (siehe oben) angefärbt. Beide Antikörper wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

#### **2.4.10 Proteinbestimmung nach Lowry mit SDS**

Proteinbestimmungen wurden in Anlehnung an das Protokoll von Lowry *et al.* (1951) durchgeführt. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (Serva) verwendet. In Ergänzung dazu wurden die Intensitäten angefärbter Banden nach Auftrennung durch SDS-PAGE in Laemmli-Gelen verglichen und der Proteingehalt mit dem Auge abgeschätzt.

#### **2.4.11 TCA-Fällung**

Mit Hilfe der TCA-Fällung wurde die Proteinverteilung in *E.coli* Zellen für spätere Detektionen festgehalten. Da das gesamte Proteom hierbei gefällt wird, gehen keine weiteren Proteine durch Proteolyse verloren. Zu diesem Zweck wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten 1 ml Zellsuspension aus den Kulturen entnommen und mit 10% TCA versetzt. Der Ansatz wurde im Folgenden für 30 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 11.000xg zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Präzipitat 2-mal mit 120 mM Tris-HCl pH 8,0 vorsichtig gewaschen und erneut unter o. g. Bedingungen zentrifugiert. Nach Resuspension des Sediments in 1 x Probeaufnahmebuffer wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und KtrB mittels Western-Blot-Methode detektiert (2.4.8 und 2.4.9).

### **2.5 Biophysikalische Methoden**

#### **2.5.1 Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Spektroskopie**

Um die Proben für die ESR-Spektroskopie vorzubereiten, wurden gereinigte KtrB-Einzelcysteinvarianten entsprechend der Vorgaben aus 2.4.3 angezogen, markiert und, wie unter 2.4.5 beschrieben, rekonstituiert. Die ESR-spektroskopischen Messungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-J. Steinhoff „Experimentalphysik Makromolekülstruktur“, Fachbereich Physik der Universität Osnabrück von Dipl.-Phys. Meike A. Döbber durchgeführt. Alle im Folgenden gezeigten Spektren wurden mit Gerätschaften der AG Steinhoff aufgenommen und dokumentiert.

### 2.5.1.1 Mobilitätsanalyse

Die cw (continuous wave)–ESR-Experimente wurden mit einem X-Band ESR-Spektrometer ( $\nu \approx 9$  GHz) bei Raumtemperatur aufgenommen. Hierzu wurde ein Miniscope MS200 (Magnettech) verwendet. Die markierten Proteinproben wurden in einer im Resonator des Gerätes befindlichen Quarzkapillare gemessen. Das Probenvolumen betrug ca. 15  $\mu\text{l}$ . Als Wert für die Mobilität wurde die inverse Linienbreite der Mittelfeldlinie ( $\Delta H_{\text{PP}}^{-1}$ ) herangezogen.

### 2.5.1.2 Analyse der Zugänglichkeiten spinmarkierter Seitenketten für paramagnetische Quencher

Im Fall der Sättigungsmessungen wurden gaspermeable TPX-Kapillaren in einem selbstgebauten X-Band ESR-Spektrometer verwendet (AG Steinhoff, Physik, Universität Osnabrück). Hierfür wurden ca. 7  $\mu\text{l}$  der Proben in die dünnwandige Kunststoffkapillare gegeben. Als Referenz für die Sättigungsmessungen wurde Stickstoff eingesetzt, der den Sauerstoff in der Probe ersetzt. Um Messungen für den apolaren Quencher  $\text{O}_2$  (Luftsauerstoff=21%) durchzuführen, wurde der Stickstoffstrom durch Luft Begasung ersetzt. Die NiEDDA-(polar) Messungen wurden unter Stickstoffbegasung durchgeführt, indem die Probe mit 20 mM NiEDDA versetzt wurde. Die Begasung der Proben erfolgte für mindestens 20 min vor Beginn der Messungen, wodurch ein annähernd vollständiger Austausch zum gewünschten Gas hin gewährleistet war. Aus den Messungen kann die Austauschfrequenz ( $W_{\text{ex}}$ ) des Spinlabels mit dem eingesetzten Quencher bestimmt werden, wodurch wiederum Rückschlüsse auf die Umgebung der markierten Seitenkette möglich werden.

### 2.5.1.3 Bestimmung der Hyperfeinwechselwirkung durch Tieftemperaturmessungen

Die Tieftemperatur-ESR-Messungen (160 K) erfolgten in einem selbstgebauten X-Band-Spektrometer der AG Steinhoff (Physik, Universität Osnabrück). 40  $\mu\text{l}$  Proteinprobe wurden in einer gekühlten Quarzküvette (Durchmesser: 3 mm) gemessen. Die Polarität des den Spinlabel umgebenden Milieus wird hierbei durch die  $A_{\text{zz}}$ -

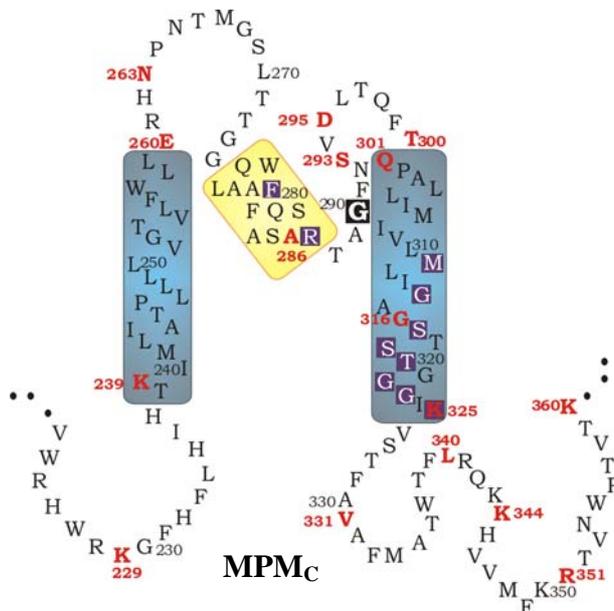
Komponente des Hyperfeinwechselwirkungs-Tensors ausgedrückt. Dieser wird durch den halben Abstand der Extrema zwischen den Niedrig- und Hochfeldlinien bestimmt.

### 3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Topologie von VaKtrB, im speziellen seiner MPM<sub>C</sub>-Domäne, besser zu verstehen. Diese Region ist vor allem in dem Bereich der zweiten Transmembranhelix und dem folgenden cytoplasmatischen Loop schlecht zu modellieren (Durell *et al.*, 1999; Durell & Guy, 2000), da äquivalente Strukturen bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vorliegen (1.2; 1.8). Dazu wurden insgesamt vier Methoden angewendet. Bei den ersten beiden Methoden handelt es sich um Fusionstechniken (PhoA [2.4.6] und LacZ [2.4.7]), die aufgrund ihrer Methodik für eine erste Charakterisierung geeignet erscheinen. Als dritter Ansatz wurden Cysteinzugänglichkeiten mit Hilfe von Thiolreagenzien in ganzen Zellen bestimmt (2.4.2). Hierfür wurden Einzelcysteinvarianten von KtrB hergestellt, um positionsspezifische Aussagen über die Zugänglichkeit für verschiedene Reagenzien zu erhalten. Bei der letzten Methode wurden Einzelcysteinvarianten in der ESR-Spektroskopie (2.5.1) eingesetzt. Hierzu wurden isolierte KtrB-Derivate mit einem paramagnetischen Spinlabel an Einzelcysteinvarianten (2.4.3) markiert. Es wurden mit den spinmarkierten Proteinproben Raumtemperaturspektren (293 K) aufgenommen, bei denen Mobilitätsanalysen durchgeführt (2.5.1.1) und Zugänglichkeiten für paramagnetische Quencher (O<sub>2</sub> und NiEDDA) (2.5.1.2) bestimmt wurden. Darüber hinaus erfolgte eine Bestimmung der Umgebungspolarität der markierten Seitenketten (2.5.1.3) im immobilisierten Zustand mit Hilfe von Tieftemperaturspektren (160 K). Im Folgenden werden diese Ansätze noch genauer erläutert. Methode 3 wurde mit KtrB-Varianten in Zellen, die noch den gesamten KtrAB-Komplex produzieren, durchgeführt. Dagegen wurden die Techniken 1, 2 (Ausnahme Sandwichfusionen) und 4 mit isoliertem KtrB bzw. mit unterschiedlich langen KtrB-Fusionsproteinen durchgeführt. Vorher wurde festgestellt, dass isoliertes KtrB einen wichtigen Teil seiner Eigenschaften behält (Tholema *et al.*, 2005). Es ist deshalb nicht zu erwarten, dass KtrB alleine sich in isolierter Form wesentlich anders als im KtrAB-Komplex in der Zellmembran verhält.

### 3.1 Untersuchungen an Fusionsproteinen

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Fusionsstudien dokumentiert. In Abbildung 3.1 sind die untersuchten Positionen für die terminalen PhoA- und LacZ-Fusionen im MPM<sub>C</sub>-Teilausschnitt nach dem Modell von Durell *et al.* (1999) dargestellt.



**Abb. 3.1: C-terminale PhoA-/LacZ-Fusionspositionen: MPM<sub>C</sub>-Domäne von KtrB aus *Vibrio alginolyticus*.** Die Positionen der Fusionsproteinuntersuchungen sind rot dargestellt. Modell modifiziert von N. Tholema (2002) nach Durell *et al.* (1999).

#### 3.1.1 PhoA-Fusionen

In der PhoA-Fusionstechnik wurden zunächst C-terminale Fusionen erzeugt (Buurman *et al.*, 1995; Uozumi *et al.*, 1998). Dabei wird der C-terminale Teil hinter einer ausgewählten Aminosäure eines Proteins durch eine alkalische Phosphatase ersetzt. Da es sich bei der alkalischen Phosphatase um ein Enzym handelt, das erst beim Export in das Periplasma oxidiert und über Disulfidbrückenbildung aktiviert wird (Derman und Beckwith, 1991), selbst aber in diesem Ansatz keine eigene Signal-/Sortierungssequenz besitzt (Michaelis *et al.*, 1983), kann durch den Vergleich der relativen Phosphataseaktivitäten die Lokalisation der ausgewählten Fusionspositionen bestimmt werden. Hierbei deutet eine hohe PhoA-Aktivität auf eine periplasmatische Positionierung hin, wohingegen eine niedrige Aktivität eine cytoplasmatische suggeriert. Ist der Rest in einer Lipidmembran lokalisiert, so gilt die Regel, dass die PhoA auf die Seite der näherliegenden Wasserphase gezogen wird. Die für diese Tests eingesetzten Konstrukte sind, wie im Material und Methoden Teil beschrieben, hergestellt worden (2.3.8.1, 2.3.8.3 und 2.3.8.4). Parallel zum PhoA-

Test (2.4.6) wurden in einigen Fällen die Zellproteine mit TCA gefällt (2.4.11). Nach SDS-PAGE (2.4.8) und Blotten wurden die PhoA-Fusionsproteine immunologisch (2.4.9) nachgewiesen. Die Bestimmung der spezifischen alkalischen Phosphataseaktivität erfolgte durch p-Nitrophenolphosphat. Dieses Substrat wird dephosphoryliert, wobei das gelbe p-Nitrophenol ( $\epsilon_{400}=18.300 \text{ l}/[\text{mol} \cdot \text{cm}]$ ) entsteht. Die Bestimmung des Zelltrockengewichts erfolgte nach diesen Angaben  $OD_{578\text{nm}} = 1$  von 0,3 mg/ml (Bakker & Mangerich, 1981). Die spezifischen Aktivitäten wurden nach folgender Formel berechnet:

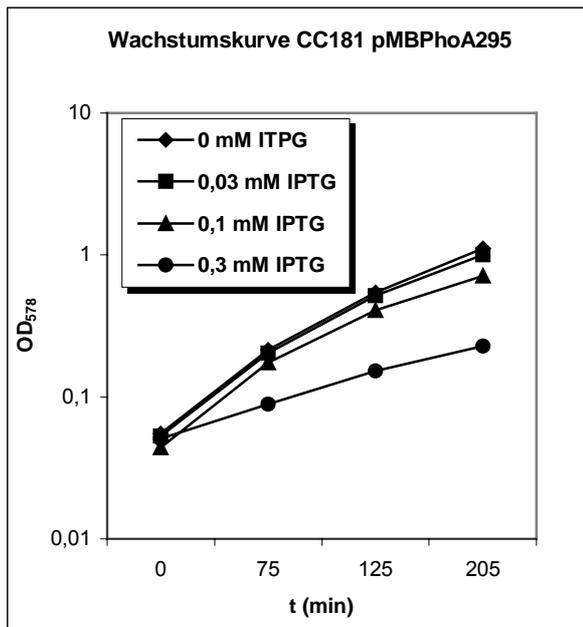
$$\frac{E_{400}}{\epsilon_{400} \times d} \times \frac{1}{t} \times \frac{3,3 \times \text{ml}}{0,1 \times OD_{578} \times \text{mg}} = \text{Aktivität} [\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \text{ TG} \times \text{min}^{-1}]$$

$E_{400}$  = gemessene Extinktion;  $t$ =Zeit [min];  $\epsilon_{400}=18,3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ;  $d$ =Schichtdicke [cm];  
TG=Zelltrockengewicht

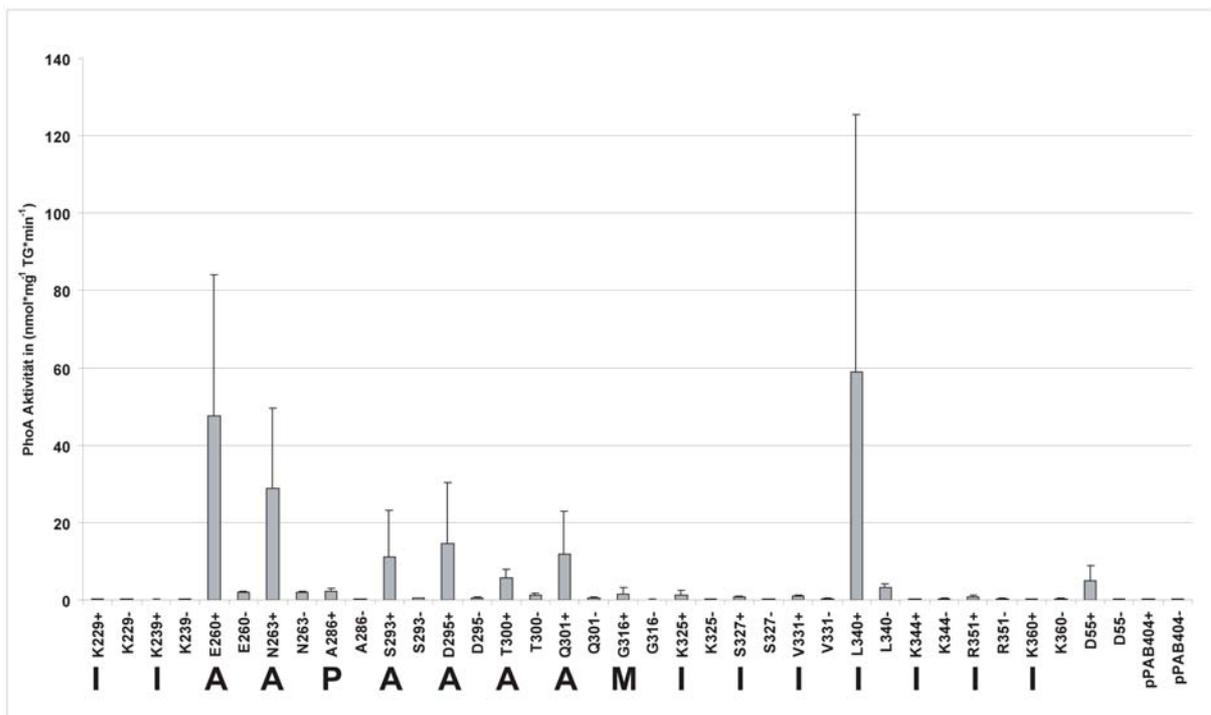
### 3.1.1.1 Terminale PhoA-Fusionen in KtrB

Die Stämme, die die Fusionsproteine für die Positionen A286, D295, Q301 und L340 produzieren, zeigten bei Wachstumsversuchen einen deutlichen Induktionseffekt (Abb. 3.2). Es kam bei IPTG-Konzentrationen über 0,1 mM zu extremen Reduzierungen der Wachstumsrate. Aus diesem Grund wurden alle PhoA-Tests mit einer IPTG-Konzentration von 0,03 mM durchgeführt.

In Abbildung 3.3 ist ein PhoA-Aktivitätsprofil über die Aminosäurepositionen K229-K360 dargestellt. Hierbei zeigt sich deutlich eine erhöhte Aktivität ab Position E260 bis Q301, wobei der Rest A286, der im putativen P-Loop Bereich liegt (Abb. 3.1), durchschnittlich kaum Aktivität zeigt. Besonders interessant ist hierbei die Position L340, die eine hohe Aktivität aufweist, somit auf der periplasmatischen Seite der Membran liegen sollte, in unserem Modell jedoch im Cytoplasma zu finden ist (siehe Abb. 3.1).



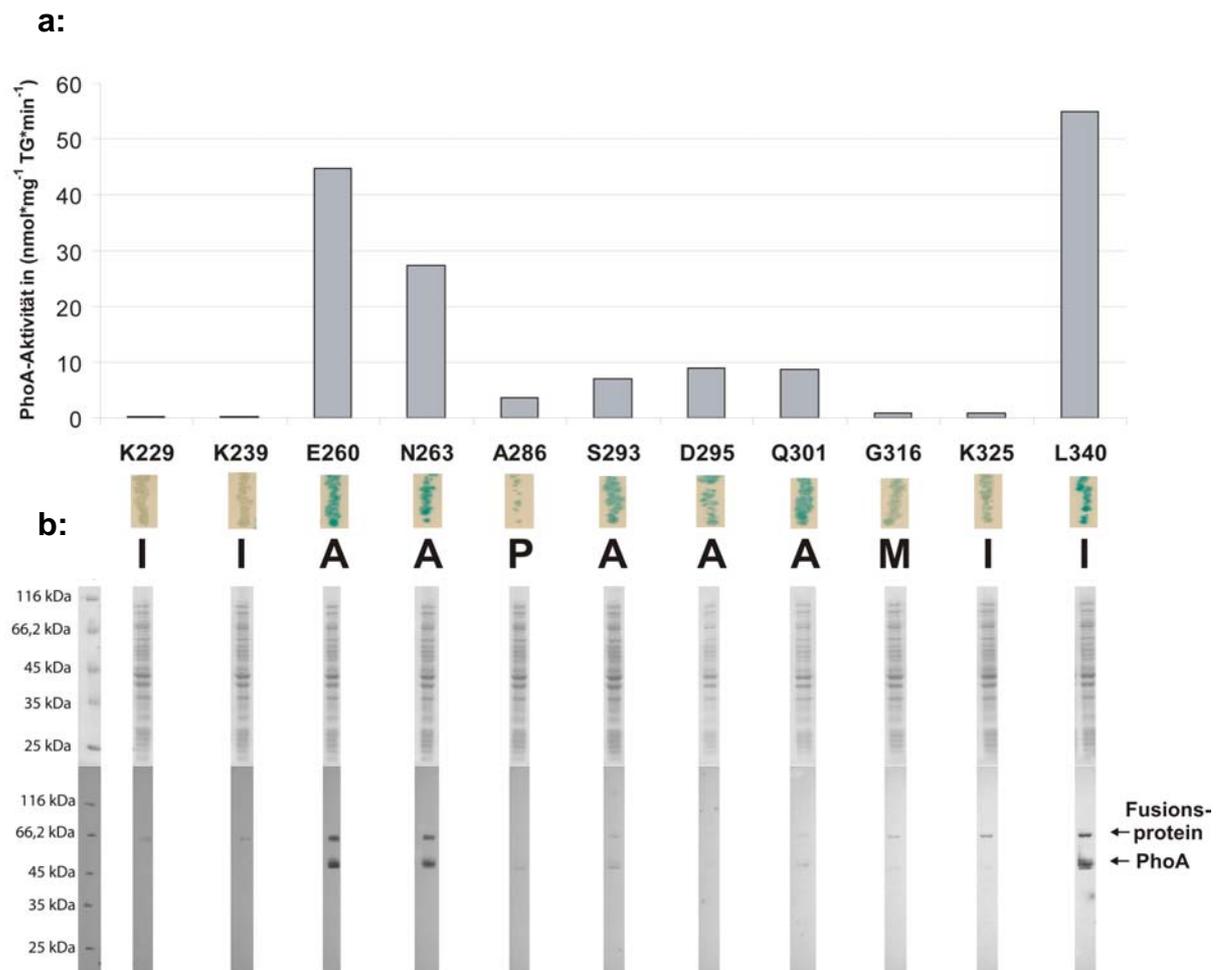
**Abb. 3.2: Exemplarische Wachstumskurve der CC181 pMBPhoA-Stämme (hier D295).** Wachstumsversuch in KML-Medium bei 37 °C, aerob. Ähnliche Ergebnisse zeigten *E. coli* CC181-Stämme mit den Plasmiden pMBPhoA286, pMBPhoA301 und pMBPhoA340.



**Abb. 3.3: PhoA-Aktivitätsprofil über den Bereich von Aminosäure K229 bis K360 in CC181-pPAB404-Derivaten.** Jeder Rest ist induziert bzw. nicht induziert dargestellt (+/-). Die Aktivität ist in  $\text{nmol} \cdot \text{mgTG}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  angegeben. Positivkontrolle D55 (Kato *et al.*, 2000) und Leervektor pPAB404 (Buurman *et al.*, 1995). (n=3 bis 7); vermutete Lokalisierung: I, innen; A, außen; P, P-Loop; M, Membran

Der Nachweis des Fusionsproteins ist von außerordentlicher Bedeutung für die Glaubwürdigkeit des Tests. Aus diesem Grund wurden aus den entsprechenden Ansätzen eines PhoA-Tests (Abb. 3.4 a) Zellproben entnommen, mit TCA (2.4.11) gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.8) und im Blot (2.4.9) mit einem anti-alkalischen Phosphataseantikörper untersucht. Die PhoA-Aktivitäten sind in der

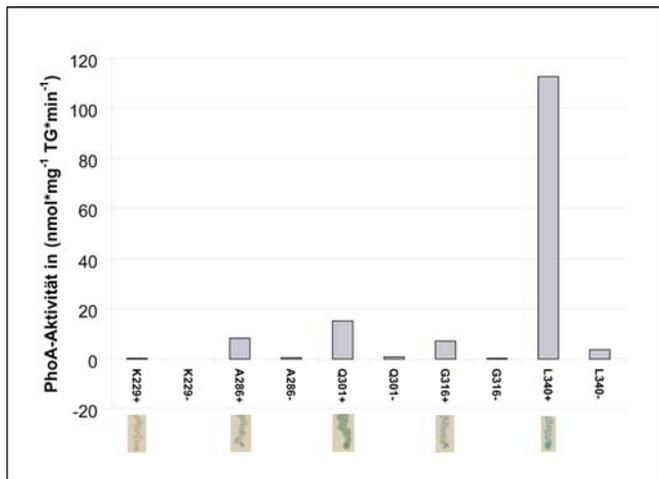
Abbildung 3.4 a dargestellt. Im mittleren Bereich der Abbildung sind die Ergebnisse des PhoA-Plattentests in kleinen Bildausschnitten gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung 3.4 b ist der Blot, Ponceau gefärbt, dokumentiert, um einen identischen Gesamtproteinlevel in allen Spuren zu garantieren. Im unteren Teil der Abbildung ist das Ergebnis der Immundetektion zu sehen. Hier ist deutlich gezeigt, dass die Fusionsproteine extrem unterschiedlich stark exprimiert wurden bzw. stabil waren (Jung *et al.*, 1998). Die oberen Banden entsprechen dem Volllängenfusionsprotein, leicht ansteigend mit ihrer zunehmenden Länge bei ca. 66 kDa (Abb. 3.4 b). Die unteren Banden zeigen abgespaltene alkalische Phosphatase bei ca. 50 kDa. In fast allen Fällen ist neben dem Fusionsprotein auch abgespaltenes Reporterenzym in gleichem Maße zu detektieren. Es fällt auf, dass hohe Expressionsraten mit hohen Aktivitäten korrelieren (260, 263 und 340). Dies ist logisch, denn da die alkalische Phosphatase selbst nur eine sehr geringe Halbwertszeit im Cytoplasma hat, ist davon auszugehen, dass in die Zelle gerichtete Fusionsproteine deutlich niedrigere Proteinmengen aufweisen (Buurman *et al.*, 1995). Weil ein starker Abbau der Fusionsproteine vorhanden war, wurde als nächstes getestet, ob diese Proteindegeneration vermindert werden kann, indem man einen Protease-defizienten Stamm, hier SF120 (Tab. 2.1), einsetzt. In diesem Stamm sind drei Proteasen ausgeschaltet worden, darunter die zwei periplasmatischen Proteasen Protease III und degP, sowie ompT in der äußeren Membran. Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen mit den CC181 und SF120 werden in Abbildung 3.5 gezeigt.



**Abb. 3.4 a: PhoA-Aktivitätsprofil über den Bereich K229 bis K340 im Stamm CC181.** PhoA-Plattentestergebnisse darunter mit kleinen Bildausschnitten dargestellt. Der Buchstabenkode gibt die vermutete Lokalisierung an: I, innen; A, außen; P, P-Loop; M, Membran

**Abb. 3.4 b: Detektion des PhoA-Fusionsproteins (unterer Bildabschnitt)** durch einen Blot von TCA gefällten Zellproben des PhoA-Test (induziert). Der Blot ist im oberen Teil der Abbildung Ponceau gefärbt, im unteren Teil ist die Immundetektion mit einem monoklonalen anti-alkalischen Phosphataseantikörper gezeigt. Die Pfeile zeigen das Fusionsprotein und die abgespaltene PhoA an.

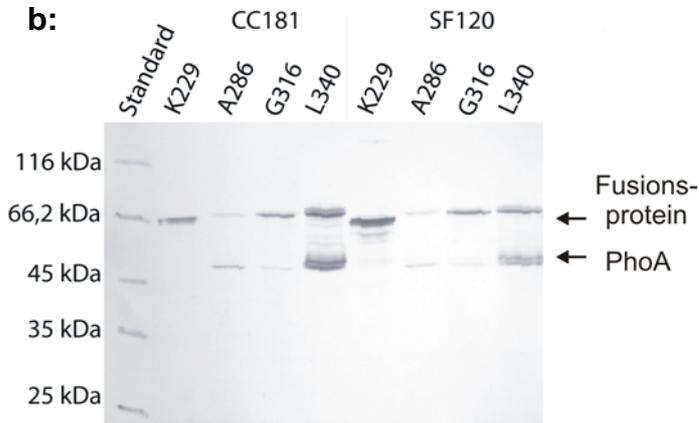
a:



**Abb. 3.5 a: PhoA-Aktivitäten ausgewählter pPAB404-Derivate in SF120-Zellen** (induziert/nicht induziert). In den kleinen Bildausschnitten sind die Ergebnisse des PhoA-Plattentests dokumentiert. Aktivität in  $\text{nmol} \cdot \text{mgTG}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  angegeben.

**Abb. 3.5 b: Immundetektion des Fusionsproteins.** Immunoblot TCA gefällter Zellen, die Stämme CC181 und SF120 vergleichend. Detektiert mit monoklonalem anti-alkalischen Phosphatase-antikörper.

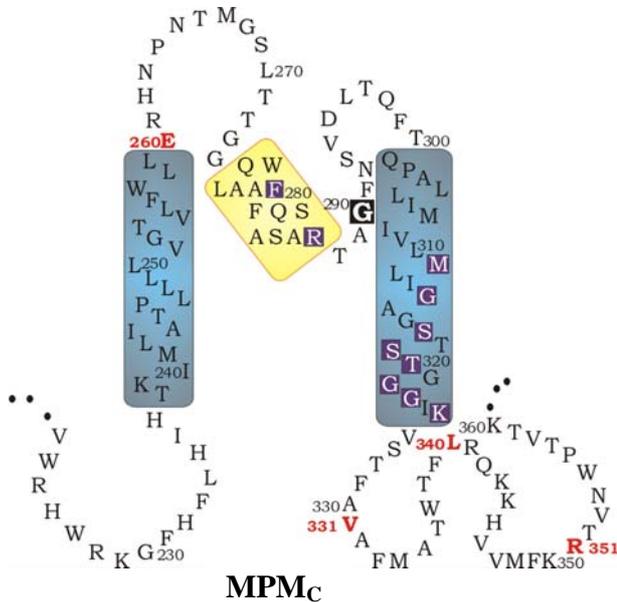
b:



In Abbildung 3.5 a sind die PhoA-Aktivitäten ausgewählter Reste im Stamm SF120 dargestellt. Die Aktivitäten ähneln in ihrem Verhältnis zueinander sehr stark denen im Stamm CC181 (Abb. 3.3). Die Position L340 weist wie im vorherigen Versuch die höchste Aktivität auf (Abb. 3.3; 3.4 a). Allerdings fallen bei der Betrachtung der Expressions- und Abbaumuster der Fusionsproteine im Vergleich zwischen den Stämmen CC181 und SF120 keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 3.5b). Hieraus kann geschlossen werden, dass dieser Ansatz kaum Verbesserung in Hinsicht auf die Stabilität und Expression brachte. Aus diesem Grund wurden weitere Untersuchungen mit dem üblichen Stamm CC181 durchgeführt. Die Aussagen des PhoA-Tests über die Topologie stimmen insgesamt gut mit den zu erwartenden Positionen überein (Abb. 3.3). Allerdings widersprechen die Ergebnisse an Aminosäureposition L340 unserem Arbeitsmodell. Darüberhinaus ist die Stabilität des Fusionsproteins nicht zufriedenstellend (Abb. 3.4; Abb. 3.5 b). Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob eine Optimierung durch PhoA-Sandwichfusionen erzielt werden kann.

### 3.1.1.2 PhoA-Test mit KtrB-Sandwichfusionen

Zur Überprüfung der erzielten Ergebnisse wurden an einigen Positionen Sandwichfusionen für sowohl PhoA als auch für LacZ vorgenommen (Abb. 3.6).



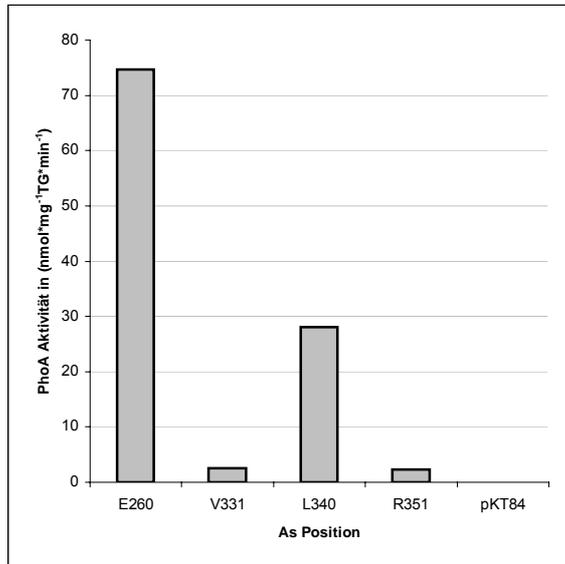
**Abb. 3.6: PhoA-/LacZ-Sandwich-Fusionspositionen MPM<sub>C</sub>-Domäne von KtrB aus *Vibrio alginolyticus*.** Die Positionen der Sandwich-Fusionsproteinuntersuchungen sind rot dargestellt. Modell modifiziert von N. Tholema (2002) nach Durell *et al.* (1999).

Bei dieser Methode wird eine alkalische Phosphatase-Kassette in das zu untersuchende Gen inseriert. Der Vorteil hierbei liegt darin, dass im exprimierten Fusionsprotein die PhoA in ihrer Position beim Einbau in die Cytoplasmamembran an zwei Seiten fixiert wird (N- und C-terminal durch KtrB fixiert) (Pi und Pittard, 1996) und die Ergebnisse so aussagekräftiger werden sollten.

In Abbildung 3.7 sind die Ergebnisse der Sandwichfusionen im Stamm CC181 dargestellt. Hierbei handelt es sich um den Vektorhintergrund pKT84, in dem neben der Untereinheit B auch KtrA exprimiert wird. Es wurde eine PhoA-Kassette an vier verschiedenen Positionen in die Untereinheit B eingefügt (Abb. 3.6). Ausgewählt wurde zum Einen die Position E260, die vermutlich im Periplasma lokalisiert sein sollte, zum Anderen drei cytoplasmatische Positionen, unter denen die interessante Aminosäureposition L340 zu finden ist, sowie zwei Positionen, die in der Nähe N- bzw. C-terminal von L340 lokalisiert sind.

Die Umsatzraten der PhoA an den einzelnen Positionen sehen wie folgt aus: An Position E260 findet man eine sehr hohe Aktivität, eine mittlere bei L340 und niedrige bis gar keine bei V331 und R351. Anscheinend verschieben sich hier die Aktivitäten in Relation zueinander zwischen den Resten E260 und L340. Diese spezifische Position scheint aber auch weiterhin ihre interessanten Eigenschaften zu behalten.

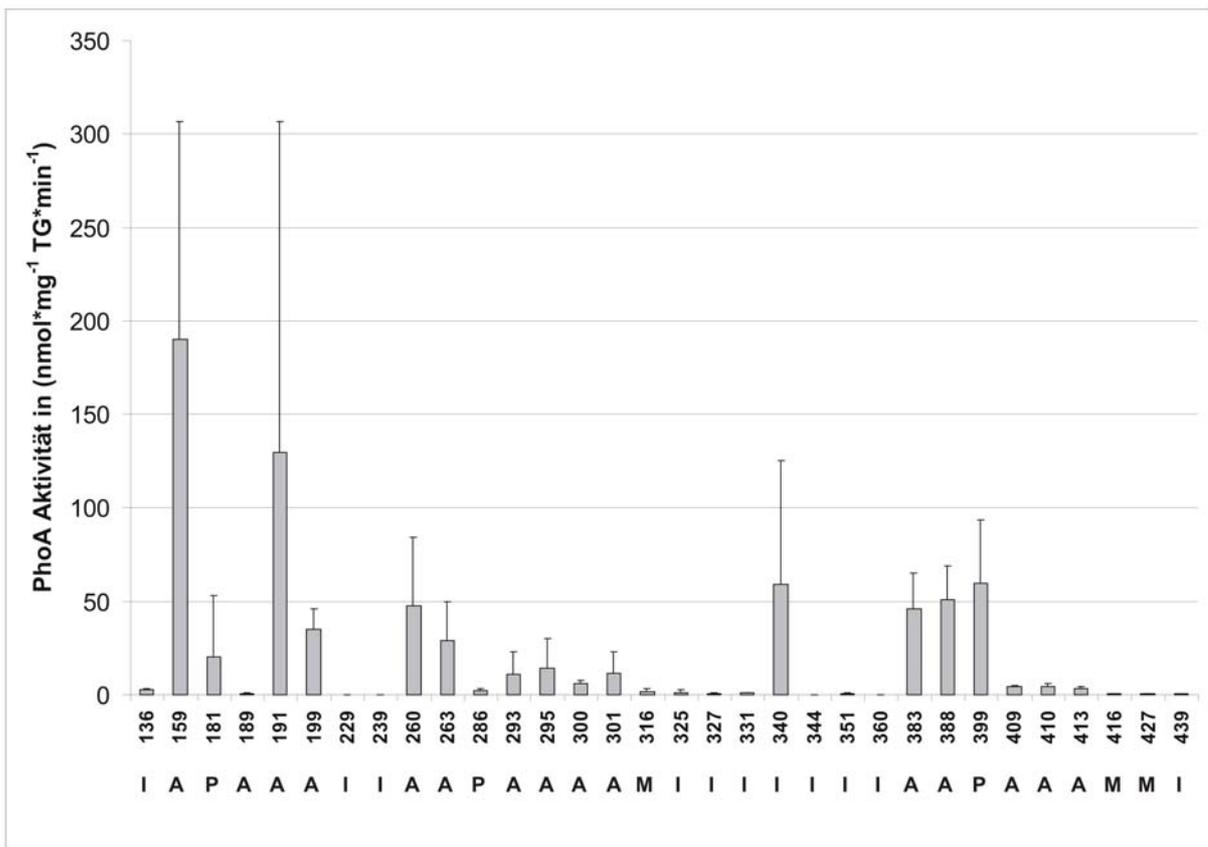
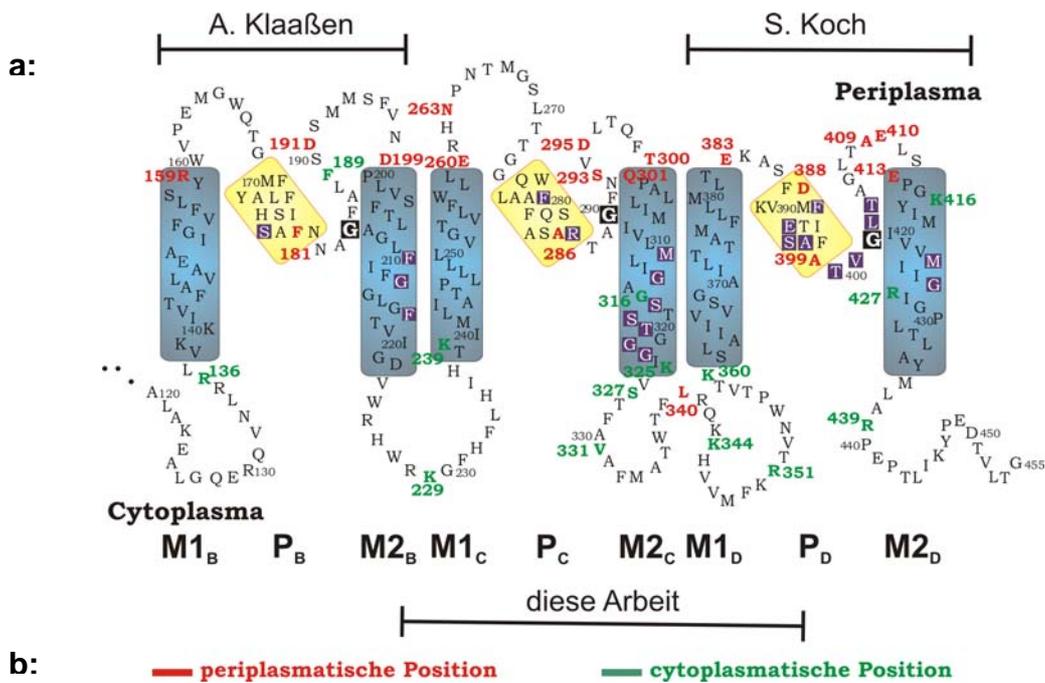
Das Fusionsprotein ist in diesem Vektorhintergrund im Immunblot nicht detektierbar gewesen. Da Pi und Pittard (1996) beschrieben, dass Sandwichfusionen z.T. noch funktionell vorliegen, wurde auch in dieser Arbeit die Aktivität dieser Konstrukte getestet. Es zeigte sich allerdings keine Komplementationsfähigkeit der KtrAB-PhoA-Hybrid-Proteine in LB2003-Zellen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.7: PhoA-Sandwichfusion-Aktivitätstest.** Aktivität der Fusionsproteine gemessen in CC181 und den Plasmiden pMBPhoA260S bis pMBPhoA351S. Als Leerkontrolle wurde pKT84 verwendet (Tab. 2.1 und Tab. 2.2.).

### 3.1.1.3 Übersicht über PhoA-Fusionsstudien an KtrB

Wegen der ungewöhnlichen Ergebnisse mit Rest L340 wurde überprüft, ob die PhoA-Fusionstechnik für VaKtrB generell anwendbar ist. Dazu wurden unter meiner Führung PhoA-Fusionsstudien durch die Diplomandin Alexandra Klaaßen und Bachelor-Studentin Sabrina Koch in den angrenzenden MPM-Domänen (B und D) durchgeführt. Die Versuche wurden, wie unter 3.1.1 beschrieben, durchgeführt.



**Abb. 3.8 a:** Übersicht der PhoA-Aktivitäten im Bereich KtrB-MPM<sub>B</sub> bis MPM<sub>D</sub>. In der Region MPM<sub>B</sub> wurden die Untersuchungen von A. Klaaßen im Rahmen einer Diplomarbeit (2002) und im Bereich MPM<sub>D</sub> von S. Koch während einer Bachelor-Arbeit (2003) durchgeführt. Die Aktivitätsmessungen der Positionen im Bereich der MPM<sub>C</sub>-Domäne wurden in dieser Arbeit angefertigt. In rot sind Reste mit erhöhter PhoA-Aktivität markiert, inaktive hingegen in grün. Modifiziert nach N. Tholema bzw. Durell *et al.* (1999).

**Abb. 3.8 b:** PhoA-Aktivitätsprofil im Bereich der Domänen MPM<sub>B-D</sub> von VaKtrB. Der Buchstabenkode gibt die vermutete Lokalisierung an: I, innen; A, außen; P, P-Loop; M, Membran

Um einen Überblick über die grundsätzliche Topologie von KtrB aus *Vibrio alginolyticus* zu erhalten, wurden als Erweiterung dieser Dissertation PhoA-Fusionen im Bereich von MPM<sub>B</sub> und MPM<sub>D</sub> durchgeführt. In Abbildung 3.8 a sind die Ergebnisse in einem Farbcode dargestellt, der, den Testergebnissen entsprechend, die Position der Reste andeutet. So zeigt die rote Farbe einer Aminosäureposition eine erhöhte PhoA-Aktivität an (Orientierung zum Periplasma), während eine grüne Darstellung inaktive Konstrukte, die im Cytoplasma lokalisiert sein sollten, markiert. In Abbildung 3.8 b ist das PhoA-Aktivitätsprofil über MPM<sub>B-D</sub> dokumentiert. In dieser Übersicht fallen zwei Positionen besonders auf, zum Einen die Position F189, die keine Aktivität zeigte, die in unserem Modell aber im Übergang von P-Loop zur periplasmatischen Schleife liegt und zum Anderen L340, welche, obwohl umliegende Reste inaktiv sind, eine sehr hohe Aktivität aufweist. Diese beiden Konstrukte stimmen nicht mit dem Arbeitsmodell überein. Für Position F189 wäre eine Aktivität wie bei den Positionen S293 oder D295 zu erwarten (Abb. 3.3; Abb. 3.8b). An den Grenzflächen der Transmembrandomänen (periplasmatische Seite) unseres Modells sind aktive PhoA-Konstrukte zu sehen (R159, D199, N260, T300, Q301, E383, E413). Betrachtet man einige Positionen, die in diesen putativen Transmembrandomänen etwas weiter Richtung Cytoplasma orientiert sind, zeigt sich, dass die Aktivität schnell gegen 0 sinkt (G316, K416, R427). Reste in den möglichen P-Loop-Regionen erscheinen im PhoA-Test mit niedriger Aktivität (Abb. 3.8 b). Ausnahme hierbei ist die Position A399, da diese eine ähnlich hohe Aktivität wie die Positionen 383 bzw. 388 zeigt. Somit ist die Einordnung dieser Position schwierig. Im cytoplasmatischen Bereich unseres Modells entsprechen alle getesteten Positionen dem erwarteten Bild mit Ausnahme der Position L340 (s.o.). Die PhoA-Aktivitäten an den Positionen 409, 410 und 413 zeigen sehr niedrige Aktivitäten, die an sich für diese Positionen nicht erwartet worden wären. Sie sollten vielmehr ein Verhalten zeigen wie die Aminosäurepositionen 293 –301.

Stabilitäts-/Expressionstudien der Fusionsproteine im Bereich der MPM<sub>B</sub>- und MPM<sub>D</sub>-Domänen zeigten, dass eine Verkürzung bzw. Verlängerung (im Vergleich zu MPM<sub>C</sub>) zu instabileren Fusionen führte. Dieser Effekt wurde schon von Kato *et al.* (2001) bei Fusionsstudien am AtHKT-Protein dokumentiert. Warum allerdings dabei im vorderen Bereich die Aktivitäten hoch sind, aber das Fusionsprotein nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden konnte, bleibt ungeklärt. Es ist aber wahrscheinlich in dem Ansatz des Fusionsproteinnachweises begründet, da der Immunnachweis im Vergleich zur Arbeit von Alexandra Klaaßen (2002) in dieser Arbeit optimiert wurde.

### 3.1.2 LacZ-Fusionen

Bei dieser Methode handelt es sich um einen komplementären Ansatz zur PhoA-Fusion. In diesem Fall wird anstatt der alkalischen Phosphatase das Gen einer  $\beta$ -Galactosidase an das 3'-Ende im Leseraster angehängt (terminal) oder über eine BamH1 -Kassette in das zu untersuchende Gen inseriert (Sandwich) (Buurmann *et al.*, 1995; Uozumi *et al.*, 1998). Der Mechanismus ist etwas anders geartet: Die  $\beta$ -Galactosidase liegt im Cytoplasma aktiv vor, wird aber inaktiviert (entfaltet), sobald eine Membranüberquerung erzwungen wird. Als Folge davon sollte sich eine hohe Aktivität bei Resten, die im Cytoplasma liegen, einstellen, eine niedrige hingegen bei periplasmatischen Lokalisationen. Der Test wurde nach Miller (Miller, 1992) durchgeführt. Nach der Herstellung der Konstrukte (2.3.8.2, 2.3.8.3 und 2.3.8.4) wurden diese im LacZ-Test (2.4.7) eingesetzt und ihre spezifische Aktivität bestimmt. Um das Fusionsprotein zu detektieren, wurden die Zellen einer TCA-Fällung (2.4.12) unterzogen. Die so gewonnenen Proteinproben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese (2.4.8) aufgetrennt und mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (2.4.9) sichtbar gemacht. Die Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität wurde mit Hilfe von *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactosid durchgeführt. Dieses wurde zu *o*-Nitrophenol und  $\beta$ -D-Galactose hydrolysiert. Die Miller Units wurden nach folgender Formel berechnet (Umrechnungsfaktor Miller Units zu nmol/[mg TG\*min]= 1,5).

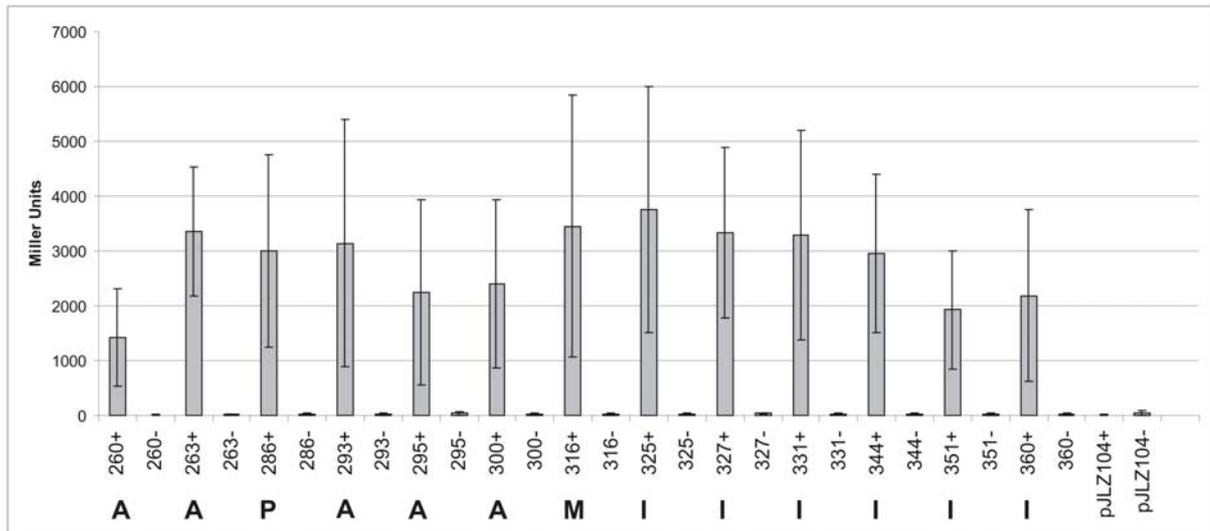
$$\frac{1000 \times E_{420}}{t \times V \times OD_{600}} = \text{units} \beta - \text{Galactosidase}$$

*t* = Reaktionszeit in min; *V* = eingesetzte Zellmenge in ml

#### 3.1.2.1 Terminale LacZ-Fusionen in KtrB

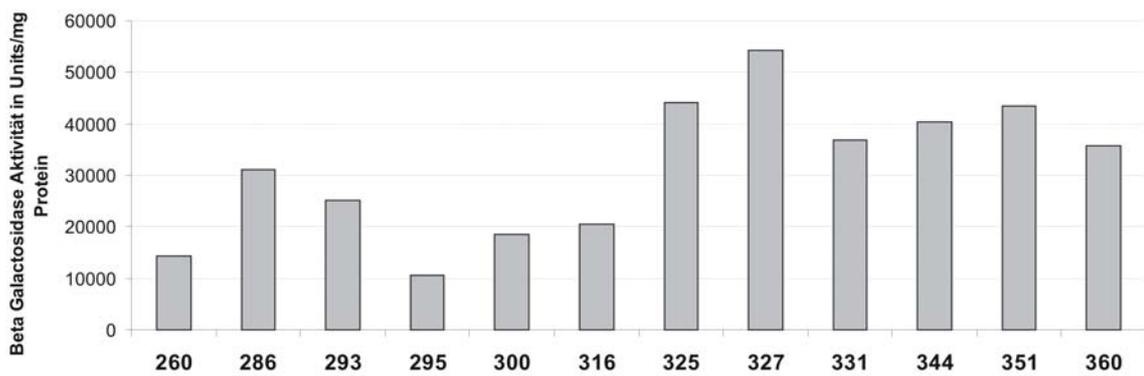
In Abbildung 3.9 ist das Aktivitätsprofil der LacZ-Fusionsproteine an den verschiedenen Positionen in der Region MPM<sub>C</sub> dokumentiert. Es handelt sich hierbei um die gleichen Positionen wie in dem vorher beschriebenen PhoA-Fusionstest (3.1.1). In Vorversuchen fielen die Positionen K229 und L340 auf, da sie auf die Induktion mit IPTG mit einem stark verschlechterten Zellwachstum im Stammhintergrund LZ110 reagierten. Die Stagnation des Wachstums verschwindet nach ca. drei Stunden, was auf eine Veränderung im Plasmid hindeutet. Dies ist

möglicherweise eine Erklärung, warum beide Konstrukte keinerlei LacZ-Aktivität zeigen. Aus diesem Grund wurden beide Konstrukte nicht weiter in die Bewertung aufgenommen. Allerdings bleibt zu vermerken, dass auch hier wieder die Aminosäureposition L340 ein ungewöhnliches Verhalten im LacZ-Test aufweist. Betrachtet man das Aktivitätsprofil in Abbildung 3.9, zeigt sich ein leichtes Wellenmotiv, welches seine Minima an den Positionen E260, D295 und R351 hat. Die Aminosäurepositionen, die zwischen diesen Minima vorliegen, zeigen um bis zu einem Faktor von zwei erhöhte Aktivitäten (Aminosäure 263 bis 293 und 316 bis 344). Es liegt eine sehr hohe, anscheinend unspezifische Hintergrundaktivität vor. Die Durchschnittswerte zeigen kein eindeutiges bzw. signifikantes Ergebnis (Abb. 3.9). Die im 2D-Modell (Abb. 3.1) periplasmatisch positionierten Aminosäuren 260, 295, 300 zeigen in Abbildung 3.10a eine niedrige Aktivität. Reste im putativen P-Loop hingegen weisen im Vergleich eine leicht erhöhte Aktivität (A286) auf. Mögliche cytoplasmatische Aminosäuren ab Position K325 zeigen eine hohe Aktivität. Grundsätzlich können Hinweise für eine MPM-artige Topologie gezeigt werden, allerdings sind diese Vermutungen durch die geringen Aktivitätsunterschiede vage (siehe Abb. 3.9). Um zu klären, warum es bei diesem Test zu einer so starken Hintergrundreaktion kommt, wurden auch hier entsprechende Immunblots von Zellproben eines LacZ-Tests gemacht. Bei den durchgeführten Plattentests erwies sich als kritisch, dass spätestens nach fünf Stunden alle Kolonien blau eingefärbt waren.



**Abb. 3.9: Übersicht: LacZ-Fusionsmessungen.** Dargestellt sind die einzelnen Aminosäurepositionen mit ihrer Aktivität in Miller Units. Induziert und nicht induziert (+/-) sind markiert. pJLZ104 dient als Negativkontrolle (Buurman *et al.*, 1995). Die Aktivität ist in Miller Units dargestellt. (n=2 bis 4). Der Buchstabenkode gibt die vermutete Lokalisierung an: I, innen; A, außen; P, P-Loop; M, Membran

**a:**



**b:**



**Abb. 3.10 a: LacZ-Fusion-Aktivitätstest im Bereich von Aminosäureposition E260 bis K360.** Die einzelnen Positionen sind induziert bzw. nicht induziert dargestellt. Im unteren Bereich sind die Ergebnisse der LacZ-Plattentests als kleine Bildausschnitte zu sehen. Aktivität in Units / mg Protein.

Der Buchstabenkode gibt die vermutete Lokalisierung an: I, innen; A, außen; P, P-Loop; M, Membran

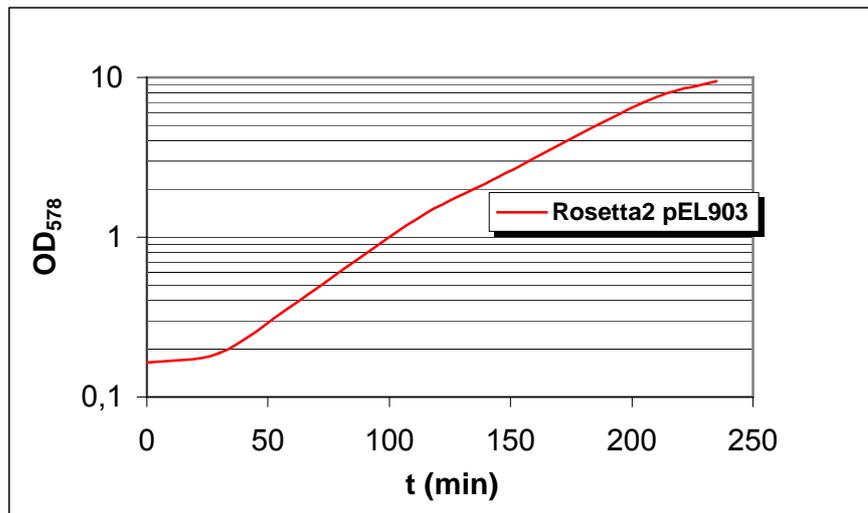
**Abb. 3.10 b: Immundetektion des  $\beta$ -Galactosidase-KtrB-Fusionsproteins.** Blot im oberen Bereich mit Ponceau Färbung, im unteren Bereich Immundetektion mit anti- $\beta$ -Galactosidase-Antikörper. Pfeile weisen auf Fusionsprotein bzw. abgespaltenes LacZ-Protein hin.

Für den Nachweis des Fusionsproteins wurden Aliquots des LacZ-Tests (Abb. 3.10 a) mit TCA (2.4.11) gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.8) und im Blot (2.4.9) mit einem anti- $\beta$ -Galactosidase-Antikörper der Firma Promega detektiert. In Abbildung 3.10 b ist der Blot im oberen Teil Ponceau gefärbt, im unteren sieht man das Ergebnis der Immundetektion des Fusionsproteins. Es wird ein extrem starker Abbau des Hybridproteins sichtbar. Die abgespaltene  $\beta$ -Galactosidase ist in allen Proben stark vertreten, wohingegen das intakte Fusionsprotein erst ab Position G316 in geringem Maße detektierbar wird. Durch den großen Umfang der freien  $\beta$ -Galactosidase im Cytoplasma sind die in Abbildung 3.9 dargestellten Ergebnisse zu erklären, da dieses Enzym im Cytoplasma aktiv vorliegt.

## **3.2 Überproduktion und Reinigung von KtrB aus *Vibrio alginolyticus***

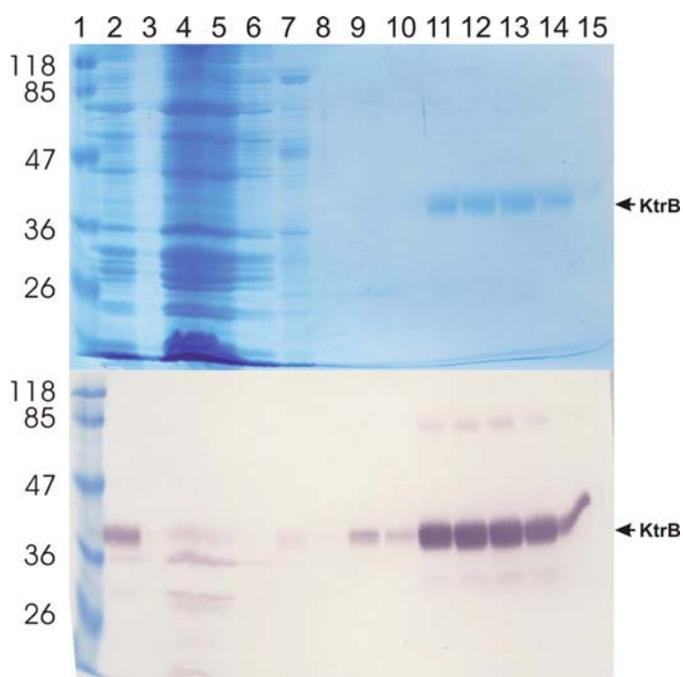
### **3.2.1 Fermentation von C43/Rosetta2-pEL903 Derivaten (2.1)**

Da die Überproduktion von KtrB in *E.coli* verbessert werden musste, wurde die Technik der Fermentation eingesetzt. Dies war notwendig, um ausreichende Mengen gereinigten Proteins für die ESR-Spektroskopie zu gewinnen, da das von Nancy Tholema (2002) entwickelte Überproduktionsprotokoll, das in dieser Arbeit auch für die Cysteinzugänglichkeiten genutzt wurde, nicht ausreichend KtrB-Protein erbrachte. Während einer Fermentation kann die Anzucht der Zellen unter definierten Bedingungen als in einer Kolbenzucht gewährleistet werden. Im Speziellen kann im Fermenter eine deutlich bessere Sauerstoffkontrolle und -versorgung erreicht werden. Die Fermentationen wurden in LB-Medium mit 0,5% Glycerin durchgeführt. Durch die ausreichende Sauerstoffversorgung und die zusätzliche Kohlenstoffquelle in Form von Glycerin war es möglich, die Stämme bei OD<sub>578</sub> 8-10 zu ernten, ohne dass die Bakterien in die stationäre Phase gelangten (Abb. 3.12). Dadurch ist eine höhere Ausbeute an Zellmasse und ein stressfreieres Zellwachstum im Vergleich zur Kolbenanzucht erzielt worden, was sich auf die Ausbeute an gereinigtem KtrB-Protein positiv auswirkte.



**Abb. 3.12: Exemplarische Wachstumskurve einer Fermentation bei einer Sauerstoffspannung von mindestens 60%. Die Ernte erfolgte bei OD<sub>578</sub> 8-10.**

Um das Protein zu gewinnen, wurden die *E.coli* Zellen geerntet und wie unter 2.4.4.2 beschrieben, behandelt. Um diesen Vorgang zu dokumentieren, ist im Folgenden ein typisches Übersichtsgel (2.4.8) der Reinigungsschritte ab Solubilisierung von KtrB dargestellt (2.4.9). In Solubilisierungsstudien zeigte sich, dass die Überproduktion im pBAD18 (Guzman *et al.*, 1995) Vektorhintergrund dahingehend von Vorteil war, dass sich große Anteile an KtrB (bis zu 90%) aus der Membranfraktion solubilisieren und reinigen ließen (Tholema *et al.*, 2005). Der Nachweis, dass es sich bei dem gereinigten Protein um KtrB handelt, wurde mit Hilfe eines anti-Penta His-Antikörpers erbracht.



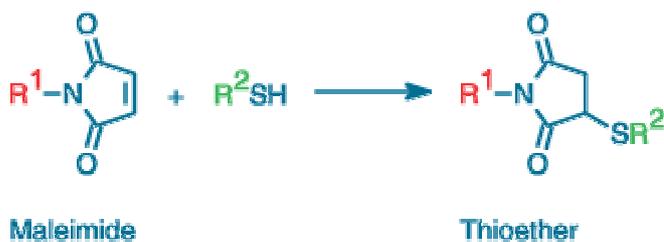
**Abb. 3.13: Nickelaffinitätschromatographische Reinigung von KtrB6His aus einer Rosetta2-pEL903 Fermentation.** Eingesetzt wurden 150 mg Protein aus *E.coli* Membranen. Im oberen Teil der Abbildung ist das Coomassie gefärbte Gel und im unteren der dazugehörige Blot dargestellt. KtrB6His wurde im Blot durch Immundetektion mit einem anti-Penta His-Antikörper sichtbar gemacht.

1:peq Standard 3; 2:Solubilisat; 3: Solubilisat Pellet; 4: Durchlauf; 5: W10 ; 6: W30.1; 7: W30.2; 8: W50.1; 9: W50.2; 10: W100.1; 11: W100.2 ; 12: W150.1; 13: W150.2; 14: W250.1; 15: W250.2 (Aufgetragen 15 µl der Fraktionen mit 5fach Probenpuffer versetzt) Pfeile deuten auf KtrB6His.

In Abbildung 3.13 wird gezeigt, dass mindestens 90% KtrB aus den *E.coli* Membranen solubilisiert wird (siehe Spur 2 und 3). Im Folgenden können sehr große Teile via Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt und somit gewonnen werden (siehe Elutionsfraktionen Spur 10-15 in Abb. 3.13). Überproduktion und Reinigung erbringen eine Ausbeute von bis zu 1 mg KtrB pro 5 Liter Zellfermentationskultur. Diese Aufskalierung war unerlässlich, um vom zu der Zeit bestehenden Überproduktionsprotokoll (Cysteinzugänglichkeiten), das in ganzen Zellen durchgeführt wurde, zu den spektroskopischen ESR-Methoden zu gelangen. Diese bedürfen deutlich höherer Proteinmengen und Konzentrationen an gereinigten Proteinen.

### 3.3 Cysteinzugänglichkeiten

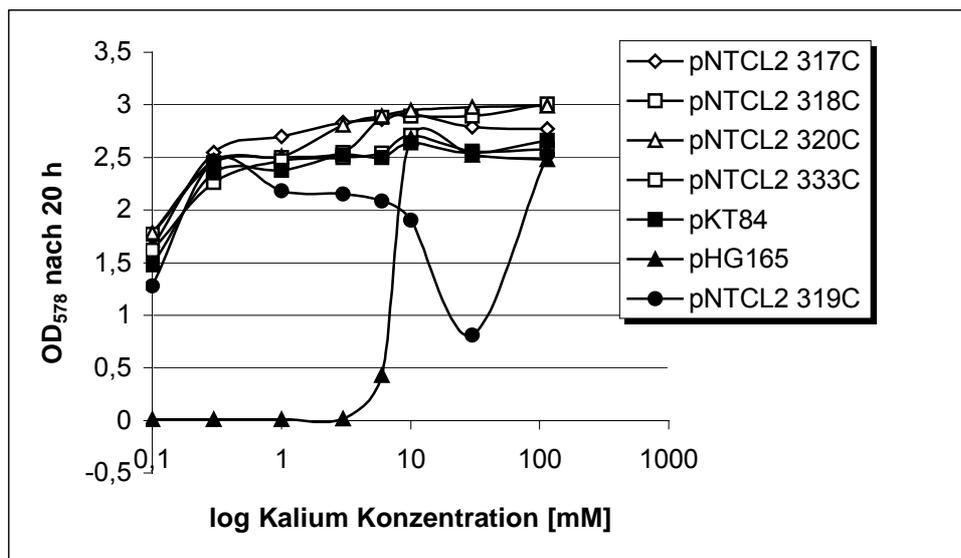
Bei dieser Methode wurden als Vorbereitung Einzelcysteinvarianten von KtrB aus *Vibrio alginolyticus* im KtrAB-Hintergrund hergestellt und anschließend in *E.coli* heterolog überproduziert. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen und mit unterschiedlichen Maleimiden inkubiert. Hierbei kamen zwei verschiedene Maleimide zum Einsatz. 4-acetamido-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonsäure ist eine membranimpermeable Substanz und wurde als Schutz-/Blockierungsreagenz für periplasmatische Reste eingesetzt.  $N^{\alpha}$ -(3-maleimidylpropionyl)biocytin hingegen ist membranpermeant und markiert periplasmatische als auch cytoplasmatische Sulfhydrylgruppen. Liegt ein Rest innerhalb des Lipidbilayers oder ist dieser im Protein verborgen, so sollte keine Reaktion stattfinden. Durch wahlweise Vorinkubation mit dem Blockierungsreagenz kann eine Fallunterscheidung zwischen periplasmatisch/cytoplasmatisch getroffen werden. Die Reaktion eines Maleimids mit einer SH-Gruppe ist in Abbildung 3.14 dargestellt.



**Abb. 3.14: Reaktion eines Maleimids mit einer SH-Gruppe. Es entsteht ein Thioether.**

### 3.3.1 Komplementationsstudien der Einzelcysteinvarianten

Als erster Schritt wurden in einem cysteinfreien KtrB Substitutionen einzelner Aminosäuren zu Cysteinresten im Bereich der M<sub>2C</sub>-Helix in Vektorhintergrund pKT84 durchgeführt (siehe Tab. 2.2 pNTCL2 317 bis pNTCL2 333; siehe auch 2.3.2 und 2.3.8). Um die Funktionsfähigkeit der so entstandenen Einzelcysteinvarianten zu überprüfen, wurden die Konstrukte in LB2003 einem Komplementationstest unterzogen (2.2.1).

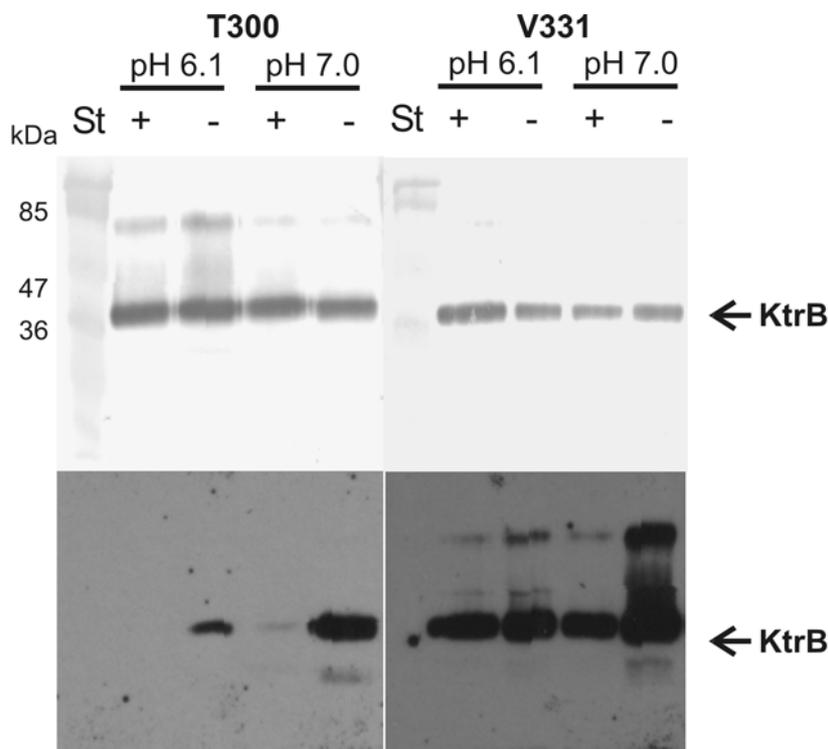


**Abb. 3.15: Komplementationsstudien der Einzelcysteinvarianten von KtrB in LB2003.** Aufgetragen ist die optische Dichte bei 578nm nach 20 Stunden Wachstum gegen die Kaliumkonzentration in mM (log). pKT84 dient als Referenz Wildtyp, pHG165 als Leerkontrolle.

In Abbildung 3.15 ist das Ergebnis der Komplementationsstudien dargestellt. Es zeigt sich eindeutig, dass das Wachstumsverhalten des Konstrukts LB2003/pNTCL2 319C different ist vom Wildtyp (pKT84). Der Stamm LB2003 pNTCL2 319C wächst zwar noch bei 0,1 mM Kalium, zeigt aber ab 1 mM – 30 mM Kalium ein ungewöhnliches Wachstumsschema. Dabei scheint der Transport von Kalium in dieser KtrB-Variante dereguliert zu sein, was zu toxischen Konzentrationen an K<sup>+</sup> innerhalb der Zelle führt. Im K115-Ansatz könnte es zu einer Reversion der Mutante kommen, die das Plasmid verändert hat. Grundsätzlich würde dieses das Ergebnis erklären, dass in Überexpressionsansätzen kein Protein zu detektieren war (siehe 3.2, 3.3). Langzeitstudien wurden nicht unternommen, ob auch im Bereich von 1 bis 30 mM Kaliumrevertanten auftreten. Die anderen Konstrukte hingegen verhalten sich wie das unveränderte KtrB-Protein aus *Vibrio alginolyticus*. Um für die



mit Maleimiden aufkam (Tholema, 2002), habe ich zunächst exemplarisch zwei Reste T300C (vermutlich periplasmatisch) und V331C (vermutlich cytoplasmatisch) unter diesen variierenden pH-Bedingungen getestet. Der Standardansatz wurde dahingehend abgeändert, dass die Zellen vor Beginn des Tests zweimal mit einem pH 6.1 bzw. pH 7.0 Puffer gewaschen wurden (2.4.2). Die pH-Werte wurden während des kompletten Reaktionszeitraumes beibehalten. Der Zellaufschluss und die Proteinreinigung (2.4.4.1) erfolgten wie oben beschrieben.



**Abb. 3.17: Cystein-zugänglichkeitsuntersuchung in ganzen Zellen der KtrB-Varianten T300C und V331C bei pH-Wert 6,1 und 7,0.** Im oberen Teil der Abbildung wurde das Protein durch anti-Penta His-Antikörper und sekundären alkalischen Phosphatase-anti-Maus-IgG detektiert. Im unteren Teil ist die Detektion der biotinylierten Cysteinvarianten dargestellt. Es handelt sich hierbei um denselben Blot. Die Zeichen + und - geben an, ob dieser Ansatz mit dem Blockierungsreagenz vorinkubiert wurde oder nicht.

In Abbildung 3.17 ist zu sehen, dass im Bereich des Periplasmas (T300) eine pH-Erniedrigung zu einer verminderten Markierungseffizienz beiträgt. Die Spezifität scheint hierbei allerdings nicht signifikant beeinflusst zu werden. Im Fall des cytoplasmatischen Restes zeigt sich ein etwas anderes Bild, da die äußere pH-Veränderung anscheinend geringeren Einfluss auf die im Cytoplasma stattfindende Reaktion hat im Vergleich zur periplasmatisch gelegenen Sulfhydrylgruppe. Dies beruht vermutlich darauf, dass der zellinterne pH-Wert von den Organismen konstant gehalten wird. Für die weiteren Versuche habe ich mich für einen Inkubations-pH-Wert von 6,1 für die Maleimidreaktion entschieden.

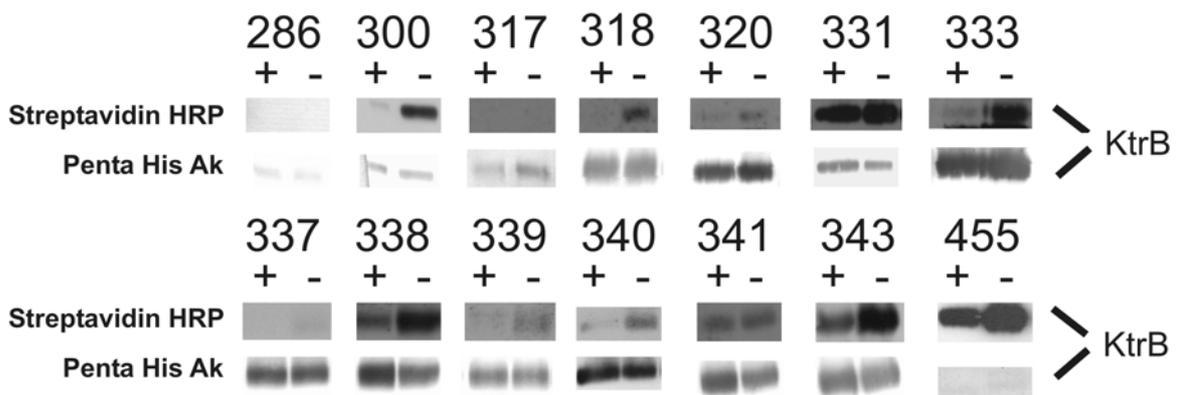
### 3.3.3 Cysteinzugänglichkeiten im Bereich von M<sub>2C</sub> und dem folgenden cytoplasmatischen Loop von KtrB

#### 3.3.3.1 Cysteinzugänglichkeiten im Bereich von KtrB-M<sub>2C</sub>

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse, die durch Cysteinzugänglichkeitsbestimmungen im Bereich von M<sub>2C</sub> gewonnen wurden, beschrieben. Die Markierungsvorgänge und die Reinigung erfolgten wie unter 3.3.1 beschrieben und entsprachen dem „Standardansatz“. Als Referenz wurden drei Reste verwendet, die von N. Tholema in ihrer Dissertation untersucht wurden (A 286C, T300C und V331C; siehe Abb. 3.16).

In Abbildung 3.18 sind die detektierten biotinylierten Cysteinvarianten sowie ihre zusätzliche Dektektion via anti-Penta His-Antikörper dargestellt. An Position A286C sieht man eindeutig, dass keine Markierung durch Biotinmaleimid stattfindet, was auf eine in der Membran/Protein verborgene Position hindeutet. Die Position T300C ist in unserem Arbeitsmodell am Übergang von der Membranhelix zum Periplasma lokalisiert. Die Ergebnisse aus der Cysteinzugänglichkeit weisen zumindest eine deutliche Schutzreaktion auf. Dieses Ergebnis stimmt mit unserem Modell überein. Aminosäure S317C zeigt keinerlei Markierung. Dies deutet, wie schon zuvor an Position A286C gesehen, auf eine verborgene bzw. lipidorientierte Position hin. T318C hingegen ist zum Einen für das Blockierungsreagenz zugänglich und zum Anderen auch durch Biotinmaleimid markierbar. Dieses Ergebnis spricht für eine Zugänglichkeit vom Periplasma, wie schon bei der Position T300C beschrieben. Das widerspricht unserem Modell, es sei denn, diese Stelle würde durch die Pore für das Blockierungsreagenz erreichbar sein. Das Biotinmaleimid müsste wahrscheinlich durch die Kavität das Cystein erreichen können. Die KtrB-Variante S319C, die ein ungewöhnliches Komplementationsverhalten zeigte, erbrachte bei Überproduktionsversuchen keinerlei Proteinausbeute. Die Position T320C lässt sich schwach durch das biotinylierte Maleimid markieren. Es ist eine Schutzreaktion zu sehen, wobei nicht geklärt ist, ob es sich um die allgemein vorhandene leichte Hintergrundschutzreaktion handelt, die das schwache Signal unter die Detektionsgrenze bringt, oder um eine lokalisationsbedingte Schutzreaktion. Es kann sich hier um eine mehr oder weniger verborgene Position handeln, ob periplasmatisch oder cytoplasmatisch zugänglich, ist nicht einzuschätzen. Aminosäureposition V331C verhält sich, wie vom Modell her zu erwarten war. Diese

zu einem Cystein substituierte Position lässt sich gut markieren, ist aber nicht zugänglich für das Blockierungsreagenz (Cytoplasma). Das Ergebnis der Position F333C widerspricht wieder dem bestehenden Modell mit einer cytoplasmatischen Orientierung, da sich dieser Rest eindeutig schützen lässt, was wiederum mit einer Zugänglichkeit vom Periplasma einhergehen sollte. G455 ist die letzte Aminosäure im nativen VaKtrB und sollte exponiert im Cytoplasma vorliegen. Die erhaltenen Versuchsergebnisse bestätigen diese Positionierung.



**Abb. 3.18: Übersicht der Cysteinzugänglichkeitsergebnisse zwischen Aminosäureposition A286C und G455C in VaKtrB.** Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen an, + und – ob der Ansatz mit dem Blockierungsreagenz vorbehandelt wurde. Die oberen Blotergebnisse zeigen die Detektion der biotinylierten Cysteinvarianten. Im unteren Bereich ist die Detektion des gereinigten Proteins durch einen anti-Penta His-Antikörper dargestellt. Beide Untersuchungen wurden auf demselben Blot durchgeführt.

### 3.3.3.2 Cysteinzugänglichkeiten im Bereich der putativen cytoplasmatischen Schlaufe nach M<sub>2C</sub>

Axel Rose hat während seiner Diplomarbeit Cysteinzugänglichkeiten im Bereich der putativ cytoplasmatischen Domäne von KtrB im Bereich nach M<sub>2C</sub> unter meiner Anleitung durchgeführt. Die Markierungs- und Detektionsprozeduren sind, wie unter 3.3.1 beschrieben, durchgeführt worden. Die hierzu verwendeten Plasmide sind pETC327, pAR337, pAR338, pAR339, pAR340, pAR341 und pAR343. In der Abbildung 3.16 sind die Positionen der durch Cystein substituierten Aminosäuren gezeigt. Die Ergebnisse zeigen in diesem Bereich ein uneinheitliches Bild (Abb. 3.18). An Position W337C scheint die Sulfhydrylgruppe für die Maleimide nicht zugänglich zu sein. Dies weist auf eine im Protein verborgene bzw. im Lipid

vorliegende Seitenkette hin. Die Position T338C ist zum Einen klar zugänglich für das Biotinmaleimid, zeigt darüber hinaus eine leichte Schutzreaktion, was auf eine vom Periplasma her zugängliche Position hindeutet. Eine entsprechende Ergebnislage ist bei dem Rest 343 zu beobachten. Die Aminosäureposition L340C scheint eindeutig vom Periplasma her zugänglich zu sein, wobei sie aber selbst nur eine mittlere Zugänglichkeit für Maleimide im Allgemeinen aufweist. Diese Position verhält sich ähnlich wie die KtrB-Variante T320C. Die Aminosäureposition R341C lässt sich nicht schützen, ist aber durch das biotinylierte Maleimid erreichbar. Dieses Ergebnis würde auf eine vom Cytoplasma zugängliche Lokalisation hindeuten. Position F339C zeigt nur eine sehr schwache Markierungsreaktion, die auch wie im Fall T320C eine entsprechende Schutzreaktion aufweist, was auf eine mehr oder weniger unzugängliche Position hinweist. Als Fazit dieser Versuche muss geschlossen werden, dass die Ergebnislage noch verwirrender wird, als es durch PhoA-Fusionsergebnisse an Position L340 zuvor war. Anscheinend ist das Blockierungsmaleimid in der Lage, ins Cytoplasma überzutreten und so fast alle Reste mehr oder weniger schützen. Es fallen signifikante Unterschiede in den Zugänglichkeiten für das Schutzmaleimid auf engem Raum auf (V331C und F333C bzw. T338C bis K343).

### **3.3.4 Dynamik von KtrB bei variablen Salzbedingungen**

Im folgenden Ansatz wurde untersucht, in wie weit unterschiedliche Salzkonzentrationen die Zugänglichkeit von ausgewählten Positionen in KtrB für die in der Cysteinzugänglichkeit verwendeten Maleimide verändern. Um die Zellen von internem  $K^+$  bzw.  $Na^+$  zu befreien, wurden sie nach der Ernte wie unter 2.2.2 beschrieben behandelt. Die aufgeteilten Ansätze wurden wahlweise mit 1 mM NaCl und/oder 500  $\mu$ M KCl versetzt. Diese Konzentrationen wurden während des folgenden Cysteinzugänglichkeitsversuches aufrechterhalten. Somit ergaben sich acht Ansätze pro Rest. Hierfür wurden die Positionen A286C und T300C ausgewählt (Abb. 3.16). Da der Rest A286C im putativen Porenbereich zu finden sein sollte, Position T300 hingegen im periplasmatischen Übergang von  $M_{2C}$ , wurden diese Positionen in der Aussicht auf eine Veränderung der Zugänglichkeit bei unterschiedlichen Salzbedingungen gewählt.

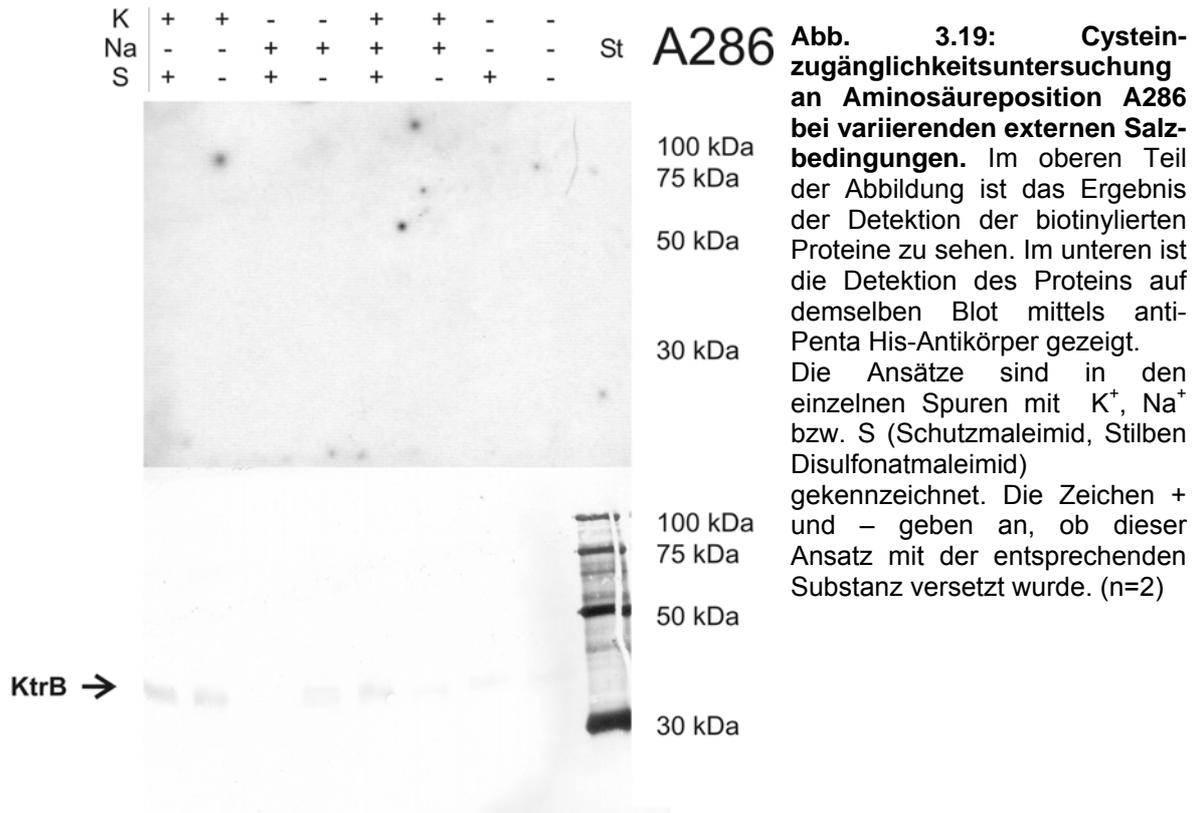
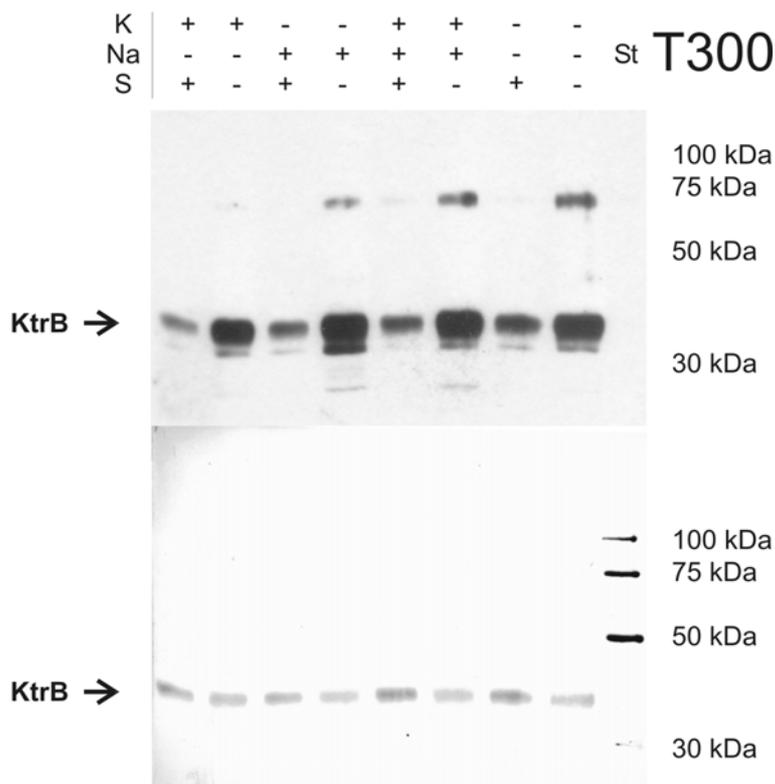


Abbildung 3.19 zeigt, dass an der Position A286C keine Veränderungen unter den verschiedenen Bedingungen zu detektieren sind (Vergleich 3.3.3; Abb. 3.18). Festzuhalten ist, dass in allen Ansätzen unterschiedlich viel Protein zu sehen ist. Dies hätte in diesem Fall problematisch werden können, da die Zugänglichkeiten immer in Relation zu der jeweiligen Proteinmenge eingeschätzt werden müssen. Da aber keinerlei Bande im oberen Blot zu sehen ist (ECL Reaktion ist sensitiver als die der alkalischen Phosphatase), fallen die unterschiedlichen Proteinmengen nicht ins Gewicht.



**Abb. 3.20: Cystein-zugänglichkeitsuntersuchung an Aminosäureposition T300C unter variierenden externen Salzbedingungen.** Im oberen Teil der Abbildung ist das Ergebnis der Detektion der biotinylierten Proteine und im unteren die Detektion des Proteins auf demselben Blot mittels anti-Penta His-Antikörper zu sehen. Die Ansätze sind in den einzelnen Spuren mit  $K^+$ ,  $Na^+$  bzw. S (Schutzmaleimid, Stilben Disulfonatmaleimid) gekennzeichnet. Die Zeichen + und - geben an, ob dieser Ansatz mit der entsprechenden Substanz versetzt wurde. (n=5).

In Abbildung 3.20 sind die Ergebnisse der unterschiedlichen Salzkonzentrationen während der Cysteinmarkierungsversuche an Position T300C dargestellt. Im oberen Bereich ist die Detektion der biotinylierten Cysteinvariante durch ein Streptavidin-Horseredidishperoxidase-Konjugat und ECL zu sehen und im unteren die Visualisierung des gereinigten Proteins auf demselben Blot mit Hilfe eines anti-Penta His-Antikörpers (alkalische Phosphatase). Im Vergleich zu der Markierung dieser Position ohne vorherige Waschschrte zur Salzentfernung (3.3.1 und 3.3.2) sieht man hier eine wesentlich schlechtere Blockierungseffizienz. Dieses Ergebnis ist vermutlich dadurch zu erklären, dass durch die Vorbehandlung der Zellen zur Entfernung von Kalium und Natrium (2.2.2) eine Veränderung eintrat, die die Effizienz negativ beeinflusst hat. Möglich wäre auch eine versuchsbedingte Schwankung der Effizienz. Es scheint keinen Kationen-spezifischen Effekt der Markierung zu geben, der an dieser Position auf eine Konformationsänderung hindeuten würde.

Die Durchführung von Wiederholungsversuchen führte zwar zu Schwankungen bzw. zeigte mögliche Salzeinflüsse. Diese Effekte waren jedoch schlecht reproduzierbar. Da es sich möglicherweise doch um eine Konformationsänderung handeln könnte,

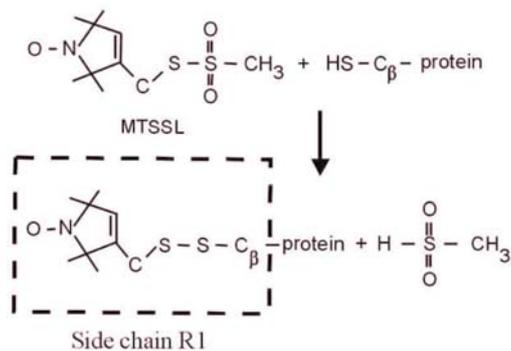
die *in vivo* zu schwer zu detektieren ist, sollten unter definierteren Bedingungen *in vitro* Versuche mit rekonstituiertem KtrB durchgeführt werden.

### 3.4 Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)- Spektroskopie

Unter der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie versteht man die Absorption von Mikrowellenstrahlung durch einen paramagnetischen Stoff, wodurch Energieniveauübergänge der ungepaarten Elektronen induziert werden. Gerade im Bereich der Erforschung von Proteinstrukturen oder Dynamiken wird sich der diamagnetische Zustand von Proteinen zunutze gemacht. Dabei wird eine ortsspezifische Spinmarkierung mit einem paramagnetischen Stoff an definierter Stelle in einem Protein durchgeführt, um so die Umgebung des Spinlabels und damit die Beschaffenheit des Proteins an dieser Stelle genauer zu untersuchen. Die ortsspezifische Spinlabelmarkierung (Site directed Spin labeling = SDSL [2.4.3]) ist in Kombination mit der ESR-Spektroskopie (2.5) ein effizientes Werkzeug zur Vorhersage von Proteinstrukturen, die durch ihre Eigenschaften (stark amphiphatisch, Größe) für röntgenkristallographische Untersuchungen oder 2D-NMR-Spektroskopie nicht geeignet sind. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass es nicht zu einer Zerstörung der Proben kommt. Dies ermöglicht Strukturänderungen im Millisekundenmaßstab aufzulösen. Die ESR-Spektroskopie liefert Informationen über die Mobilität des Spinlabels (2.5.1.1), sowie die Zugänglichkeit des Spinlabels für gelöste paramagnetische Stoffe (2.5.1.2), die verschiedene Löslichkeiten aufweisen. Diese Messungen werden bei Raumtemperatur aufgenommen. In der Tieftemperatur-ESR-Spektroskopie bestimmte Pulverspektren (2.5.1.3) liefern eine Aussage über die Umgebungspolarität des Spinlabels. Bei all diesen Ansätzen kommt das „Site Directed Spin Labeling“ zum Tragen, wobei eine durch ein Cystein substituierte Aminosäure an der Sulfhydrylgruppe mit einem paramagnetischen Spinlabel markiert wird. In dieser Arbeit wurde ein Nitroxid-Spinlabel (MTSSL [1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-3-methyl] Methanthiosulfonat) eingesetzt, das durch seinen stabilen Radikalcharakter zu den wichtigsten Klassen von ESR-Sonden gehört (Abb. 3.21).

### 3.4.1 Spinlabelmarkierung während der Nickelaffinitätschromatographie von VaKtrB im gebundenen Zustand

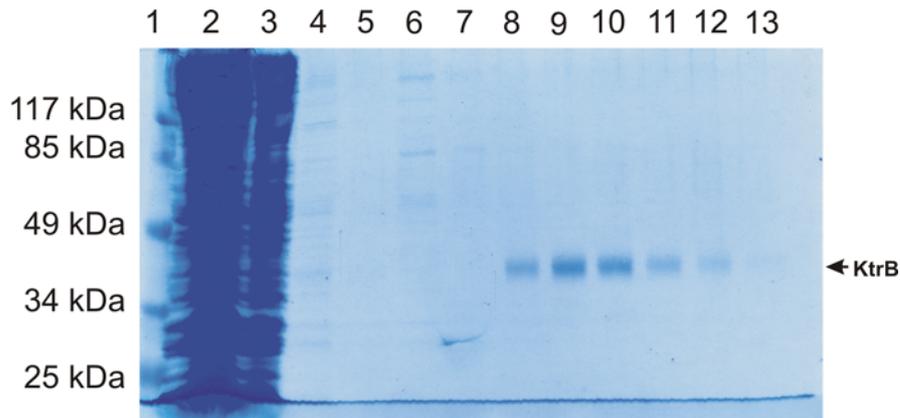
Im folgenden Teil dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Markierung von KtrB-Cysteinvarianten mit MTSSL im Nickel-NTA-gebundenen Zustand große Vorteile mit sich bringt. Die Reaktion des Nitroxid-Spinlabels findet nach folgendem Reaktionsmechanismus statt (Abb. 3.21). Es handelt sich dabei um eine Cystein-spezifische kovalente Bindung.



**Abb. 3.21: Reaktionsmechanismus des MTSSL mit einem Cystein.** (Steinhoff *et al.*, 1999). Die Nitroxid-Gruppe (N-O) verleiht dieser Verbindung den paramagnetischen Charakter.

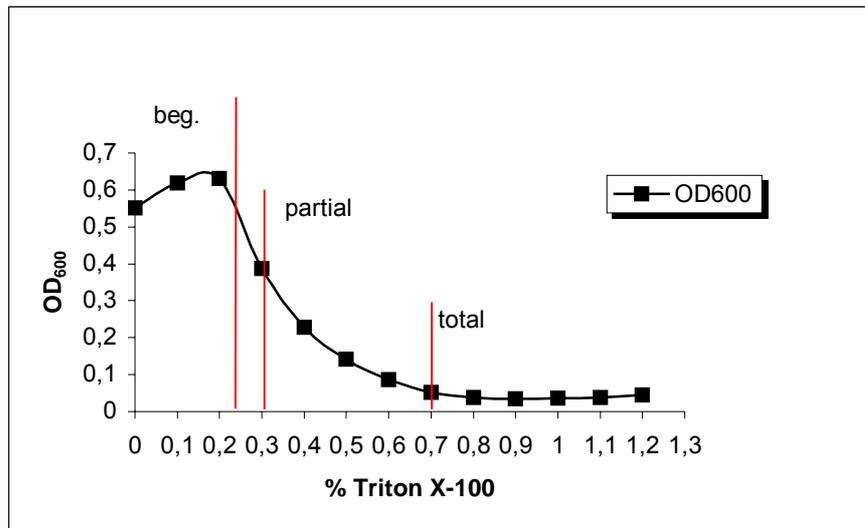
Im Folgenden wird bewiesen, dass die Abwandlung des von Nancy Tholema erarbeiteten (2002) Überproduktionsprotokolls keine nachteiligen Auswirkung auf die Reinigungseffizienz sowie die gewonnene Menge an KtrB-Protein hat. Das bestehende Protokoll musste abgeändert werden, da unter diesen Bedingungen einerseits die Markierungsraten zu niedrig waren und andererseits unspezifische Hintergrundmarkierungen im cysteinfreien Protein auftraten. In Abbildung 3.22 sind die einzelnen Reinigungsschritte in einer SDS-Page-Gelelektrophorese festgehalten (2.4.8.). Besonders zu beachten sind hierbei die Spuren 4-7. Diese dokumentieren die abgewandelten Schritte im Vergleich zum Standardprotokoll. Es zeigt sich, dass noch kleinere Spuren von Verunreinigungen bei der Inkubation über Nacht von der Säule abgelöst werden (siehe Spur 6). Die Änderung von einem Tris/HCl-Puffer pH 8.0 auf einen Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 wirkt sich anscheinend nicht nachteilig aus. Die Verschiebung des pH-Wertes sowie die Substitution der Puffersubstanz musste durchgeführt werden, da im Tris/HCl-Puffer pH 8.0 ein zu starker Hintergrund durch unspezifische Bindungen zu detektieren war. Diese Tests wurden an einer cysteinfreien Variante von KtrB durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass das Waschvolumen annähernd beliebig variiert werden kann, um so den ungebundenen Spinlabel (hier MTSSL) nach der Markierungsprozedur problemlos entfernen zu können, weil dieser die

nachfolgenden ESR-Messungen in starkem Maße beeinflussen würde. Da es sich bei diesen Untersuchungen nur um Topologiestudien an isolierten KtrB-Proben handelt, war die Erkenntnis wichtig, dass KtrB alleine aktiv bleibt (Tholema *et al.*, 2005). Allerdings ändert sich hierbei die Ionenspezifität während der Km-Wert für  $K^+$ -Transport unverändert niedrig bleibt (Tholema *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Befunde schließe ich, dass die Topologie von KtrB alleine im Vergleich mit KtrB im KtrAB-Komplex nicht wesentlich anders ist.

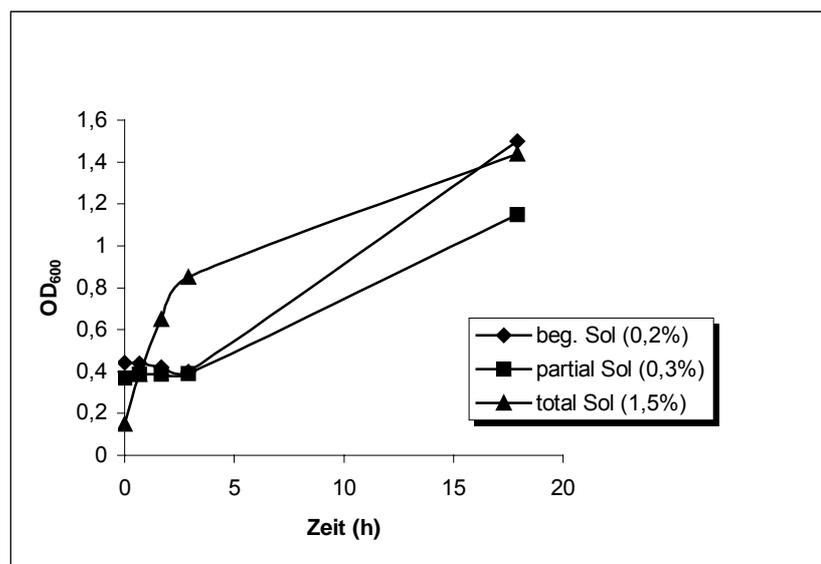


**Abb. 3.22: Exemplarische MTSSL-Markierung einer KtrB6His-Einzelcysteinvariante während der Nickel-affinitätschromatischen Reinigung.** 1:peq Standard 3; 2:Durchlauf; 3: W30.1; 4: K50.2 entgast ; 5: Durchlauf K50.2 MTSSL vor Markierung ; 6: Durchlauf nach MTSSL Inkubation (über Nacht); 7: K50.2 zur überschüssigen MTSSL-Entfernung; 8: W100.1; 9: W100.2; 10: W150.1; 11: W150.2 ; 12: W250.1; 13: W250.2 (aufgetragen 15  $\mu$ l die mit 5x Probenpuffer angesetzt wurden)

Einige ausgewählte und markierte Einzelcysteinvarianten wurden in polare *E.coli* Lipide (Avanti) rekonstituiert, um sie so in der ESR-Spektroskopie zu messen. Die Rekonstitution wurde entsprechend des Material und Methoden-Teils (2.4.5) durchgeführt. Die Lipide wurden vor der Rekonstitution total solubilisiert (siehe Abb. 3.23), wobei diese Vorbereitung der Lipide im Vorfeld als beste Variante ausgetestet wurde. Die Intensität der ESR-Signale der Proben konnte in einem dreifach geteilten Ansatz (beginnende Solubilisierung, partielle Solubilisierung und totale Solubilisierung) nach der erfolgten Rekonstitution bestimmt werden. Die höchste ESR-Signalstärke zeigte sich bei dem Ansatz mit den total solubilisierten Lipiden (Daten nicht gezeigt). Allerdings mussten bei Ansätzen, in denen solubiliertes KtrB enthalten war, 1,5 % Triton-X100 (f.c.) eingesetzt werden, um den Zustand der Totalsolubilisierung zu erreichen. Diese Bedingungen wurden bei allen weiteren Rekonstitutionen mit anschließender ESR-Messung verwendet.



**Abb. 3.23: Lipidsolubilisierungskurve mit Triton-X100.** Dargestellt ist die OD<sub>600</sub> Entwicklung unter sukzessiver Triton-X100-Zugabe zu extrudierten (400 nm) polaren *E. coli* Lipiden bei einer Konzentration von 5 mg/ml (Lasch, 1995). Bei Anwesenheit von KtrB-Protein bei einem Lipid zu Protein Verhältnis von 30:1 verschiebt sich die Solubilisierungskurve nach rechts (Daten nicht gezeigt).



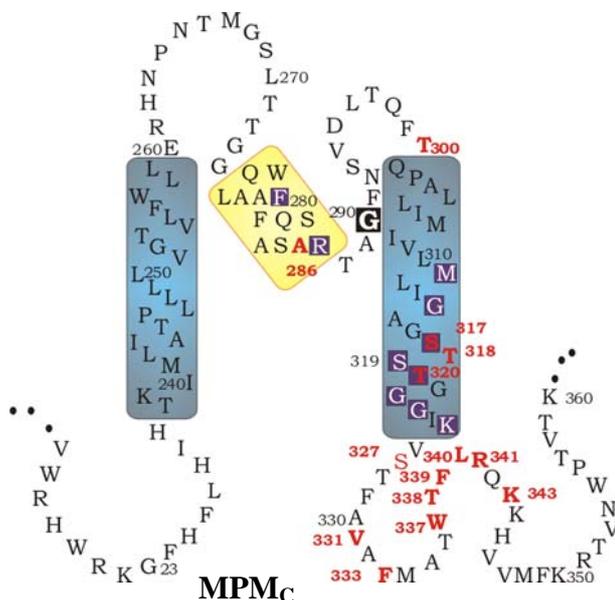
**Abb. 3.24: OD-Entwicklung während der BioBead-Behandlung.** Als Ausgangspunkt sind die drei Stadien dargestellt: Beginnende, partielle und totale Solubilisierung. In Klammern stehen die Endkonzentrationen des Triton-X100 in %. Die Zugabe der SM2-BioBeads erfolgte wie unter 2.4.5.2 und 2.4.5.3 beschrieben.

Die Entfernung der Detergenzien erfolgte wie unter 2.4.5 beschrieben mit SM2-BioBeads der Firma „Biorad“. Die Entwicklung der optischen Dichte bei 600 nm ist für einen Standardansatz in Abbildung 3.24 dokumentiert. Die finalen optischen Dichten variierten von Ansatz zu Ansatz, wobei eine deutliche Zunahme der Trübung jedoch immer zu verzeichnen war. Die Ansätze wurden im Anschluss gewaschen und in möglichst kleinen Volumina resuspendiert und für die ESR-Spektroskopie eingesetzt.

Im Fall der total solubilisierten Lipide zeigte sich eine schnelle Zunahme der  $OD_{600nm}$  in den ersten Stunden, wohingegen die optische Dichte der anderen Proben erst im Laufe der Inkubation über Nacht deutlich anstieg.

### 3.4.2 ESR-Spektrenübersicht

Die folgenden ESR-spektroskopischen Untersuchungen zur  $M_{2C}$ -Helix von KtrB aus *Vibrio alginolyticus* wurden in Zusammenarbeit mit Dipl.-Phys. Meike A. Döbber der AG Experimentalphysik Makromolekülstruktur (Prof. Dr. H.-J. Steinhoff, Universität Osnabrück) durchgeführt und ausgewertet. Sämtliche nachfolgenden Untersuchungen wurden mit Gerätschaften der oben genannten AG aufgenommen und dokumentiert. Die Abbildung 3.26 zeigt eine Übersicht der gesammelten ESR-Spektren. Es handelt sich hierbei um die Ergebnisse an spinmarkierten Einzelcysteinvarianten (MTSSL) von KtrB aus *V. alginolyticus* in solubiliertem und rekonstituiertem Zustand, die durch Raum- (293 K) und Tieftemperaturmessungen (160 K) gewonnen wurden. Unter den Punkten 3.4.3 und 3.4.4 sind die aus den Spektren abgeleiteten Mobilitäten und Polaritäten beschrieben. Einige ausgewählte Ansätze, deren Signalstärken ausreichend waren, wurden für Sättigungsmessungen mit  $O_2$  und NiEDDA eingesetzt (3.4.5). Die Abbildung 3.25 zeigt die Positionen der verwendeten Einzelcysteinvarianten von KtrB im 2D-Modell der  $MPM_C$ -Domäne von VaKtrB. Die cysteinfreie KtrB-Variante zeigte bei ESR-Messungen nur einen zu vernachlässigenden Hintergrund unter den unter 3.4.1 beschriebenen Bedingungen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.25: Übersicht der für die ESR-Spektroskopie verwendeten Einzelcysteinvarianten in der C-Domäne von KtrB aus *Vibrio alginolyticus*.** Entsprechende Positionen sind rot markiert. 2D-Modell nach Durell *et al.* (1999) modifiziert von N. Tholema (2002).

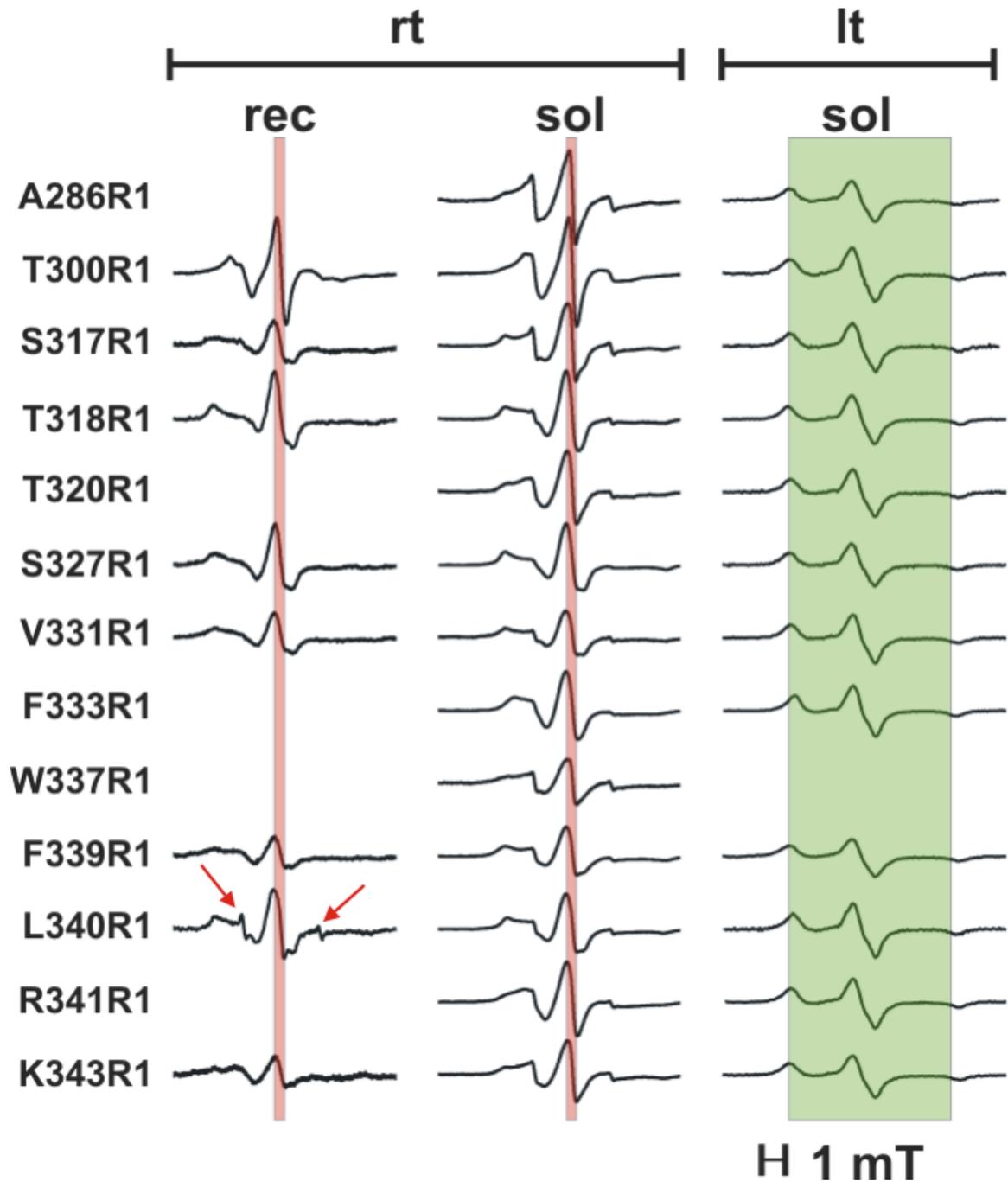
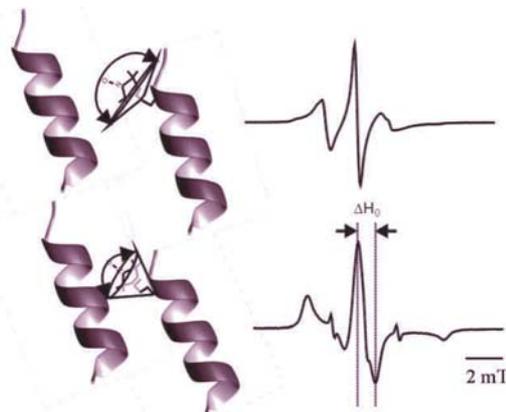


Abb. 3.26: Übersicht über Raumtemperatur (rt) X-Band-ESR-Spektren in rekonstituiertem (*E.coli* Polar Lipids) und solubilisiertem Zustand, sowie Tieftemperatur(lt)-ESR-Spektren (160 K) der solubilisierten Einzylcysteinvarianten von KtrB aus *Vibrio alginolyticus*. Die einzelnen Positionen sind nach der gegen ein Cystein ausgetauschten Aminosäure und ihrer Position benannt. R1 bedeutet in diesem Fall, dass an dieser Aminosäure der Spinlabel gebunden hat. Die Einheit ist mit 1 mT angegeben.

Anmerkung: In der rekonstituierten Probe L340R1 sind noch Reste freien Spinlabels zu finden (scharfe Spitzen; siehe Pfeile). Die roten Balken dienen zum Vergleich der  $\Delta H_0$ -Abstände in den Spektren. Der grüne Balken ist zum Vergleich der Pulverspektren und zeigt ungefähr den Bereich von  $2 A_{zz}$ .

### 3.4.3 Mobilitätsanalysen spinmarkierter Einzelcysteinvarianten im solubilisierten und rekonstituierten Zustand von KtrB (2.5.1.1)

Für die Mobilitätsanalysen wurde gereinigtes KtrB-Protein solubilisiert und rekonstituiert eingesetzt. In Abbildung 3.28 wird eine Übersicht der reziproken Linienbreite  $\Delta H_{pp}^{-1}$  der Mittelfeldlinie für die einzelnen Cysteinvarianten dargestellt, welche einen Wert für die Mobilität der markierten Seitenkette angibt. Befindet sich die markierte Seitenkette in einem cytoplasmatischen Loop oder auf einer Helixoberfläche und hat damit nur eine schwache Interaktion mit dem restlichen Protein, so ist der Wert für  $\Delta H_{pp}^{-1}$  hoch. Ist hingegen der Bereich durch sekundäre und tertiäre Interaktionen mit anderen Proteinstrukturen eingeschränkt, so verbreitert sich das Spektrum und der Mobilitätswert wird kleiner (Abb. 3.27, Steinhoff [2002]).

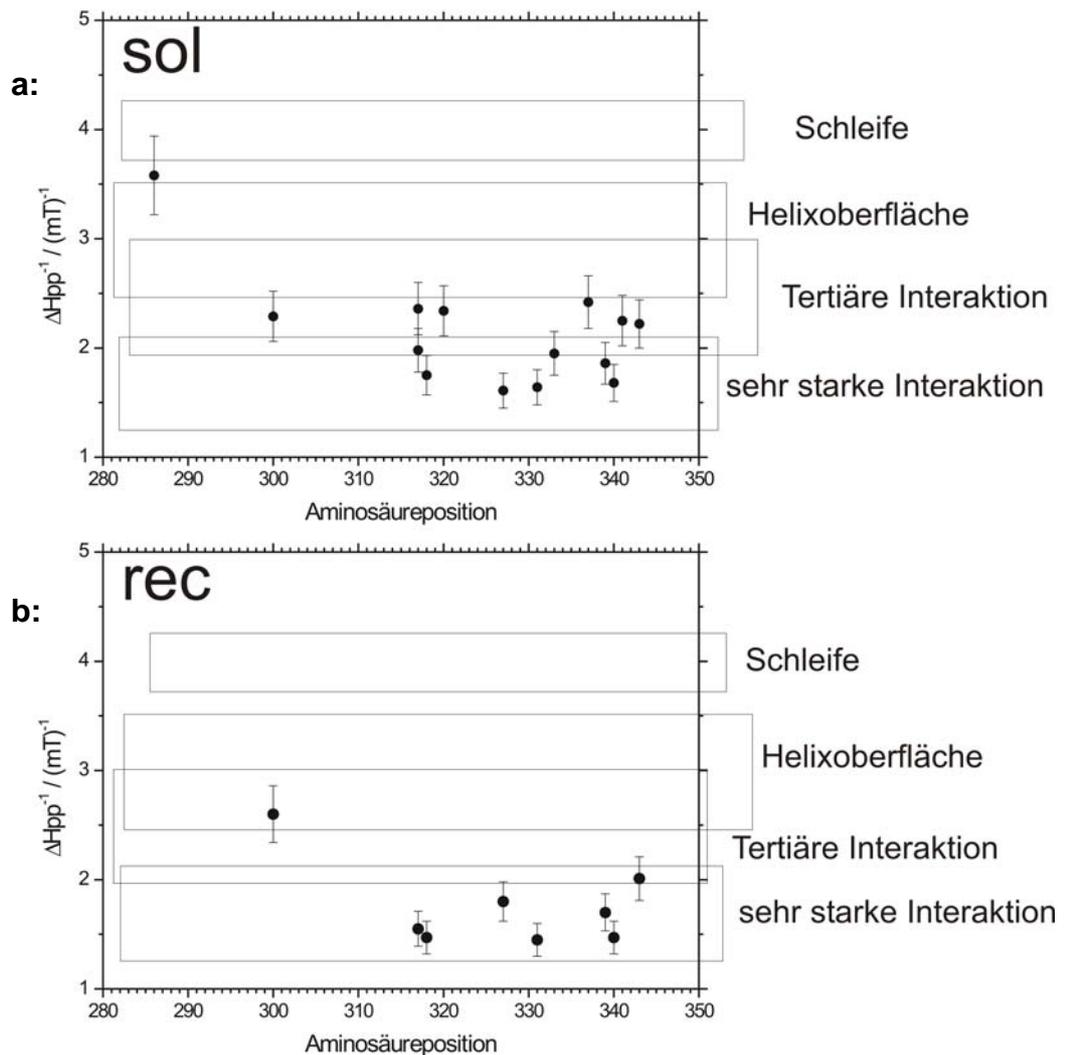


**Abb. 3.27: Tertiäre Strukturelemente mit einer niedrigen (oben) und einer hohen (unten) Einschränkung der Spinlabelseitenkettenmobilität durch Interaktion mit benachbarten Seitenkette.**

H.-J. Steinhoff (2002)

In Abb. 3.28 a sind die aus Abbildung 3.26 abgeleiteten Mobilitätswerte für die solubilisierten Proben und in 3.28 b die der rekonstituierten Ansätze gegen die Aminosäureposition aufgetragen. Beim Vergleich der Mobilitätswerte der solubilisierten und rekonstituierten Proben fällt auf, dass die der solubilisierten durchschnittlich höher sind als die der rekonstituierten. Dies deutet darauf hin, dass die Faltung von VaKtrB im solubilierten Zustand lockerer ist als im rekonstituierten. Ein weiterer interessanter Punkt ist, dass fast alle markierten Positionen ein sehr immobiles Verhalten aufweisen. Die Ausnahmen hierbei sind an den Positionen A286R1 sol und T300R1 rec zu finden. Diese markierten Cysteinseitenketten weisen eine deutlich höhere Mobilität auf als der Rest der bestimmten Werte. Dies würde bedeuten, dass ein Großteil der untersuchten Bereiche starke Interaktionen mit dem restlichen Protein aufweist. Die Klassifizierung der Mobilitätswerte in Bezug auf sekundäre und tertiäre Strukturen erfolgte nach Mchaourab *et al.* (1996) und Hubbel

*et al.* (1996). Im solubilisierten Zustand verhalten sich die Mobilitäten wie folgt: Die Position im putativen P-Loop (A286) weist eine sehr hohe Mobilität auf, die auf eine relativ freie bzw. exponierte Lage hindeuten würde, wie sie an einer Helixoberfläche im Übergang zu einer Schleife vorkommen dürfte. Die Positionen T300R1, S317R1, T320R1, W337R1, R341R1 und K343R1 sind in ihrer Mobilität eingeschränkt. Dies weist auf eine Interaktion der markierten Cysteinseitenkette mit tertiären Strukturen im Protein hin. Die Aminosäureposition F333 ist von ihrem Mobilitätswert zwischen V331R1 (immobiler) und W337R1 (mobiler) einzuordnen, was auf jeden Fall auch für eine deutliche Interaktion mit anderen Proteinstrukturen spricht. Die spinmarkierten KtrB-Einzelsysteinvarianten für die Positionen T318R1, S327R1, V331R1, F339R1 und L340R1 hingegen sind sehr stark durch ihre Umgebung in ihrer Mobilität eingeschränkt. Die rekonstituierten spinmarkierten KtrB-Proben (Abb. 3.28 b) scheinen grundsätzlich herabgesetzte Mobilitätswerte im Vergleich zu den solubilisierten Proben aufzuweisen. Lediglich die Positionen T300R1 und K343R1 bilden eine Ausnahme, da sie ein wenig in der Mobilität ihrer Seitenkette zunehmen. Grundsätzlich muss aus diesem Datensatz gefolgert werden, dass praktische alle untersuchten Seitenketten in eine kompakte Struktur eingebettet sind (Ausnahme T300R1).

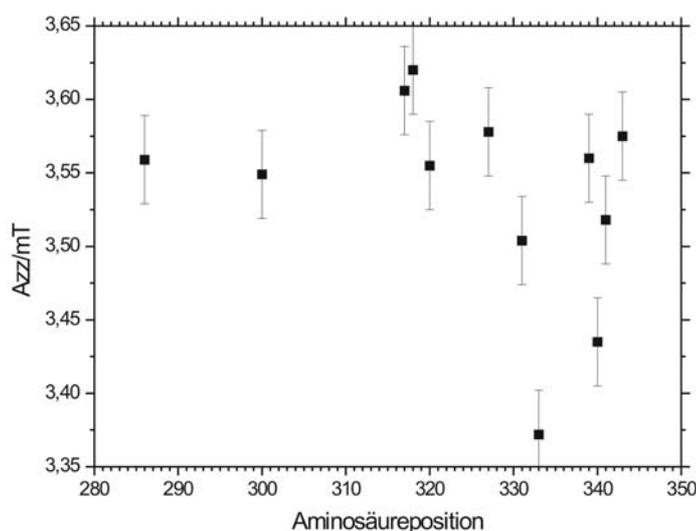


**Abb. 3.28: Mobilitätswertanalyse der ESR-Spektren aus Abbildung 3.27.** Dargestellt sind die Mobilitäten der einzelnen Aminosäurepositionen solubilisiert (**sol**) (**a:**) und rekonstituiert (**rec**) (**b:**) gegen  $\Delta H_{pp}^{-1} / (\text{mT})^{-1}$ . Es erfolgt eine Klassifizierung nach Mchaourab *et al.* (1996) und Hubbel *et al.* (1996).

### 3.4.4 Charakterisierung der Umgebungspolarität des gebundenen Spinlabels in KtrB-Einzelcysteinvarianten (2.5.3)

Für die  $A_{zz}$ -Wert-Bestimmung durch Tieftemperaturmessungen wurden in dieser Arbeit nur MTSSL markierte, in DDM solubilisierte KtrB-Einzelcysteinvarianten verwendet. Hierbei wird die Probe in einem glasartigen Charakter eingefroren (160K), was die spinmarkierte Seitenkette praktisch völlig immobilisiert. Es entstehen dabei sehr breite Spektren, die auch Pulverspektren (=Festkörperspektren) genannt

werden. Diese können zur Bestimmung der Umgebungspolarität genutzt werden. Der  $A_{zz}$ -Wert wird durch die B-Feld-Differenz zwischen den Extrema der Niedrig- und der Hochfeldlinie, die  $2 A_{zz}$  entspricht, bestimmt. Der  $A_{zz}$ -Wert ist dabei ein Maß für die Wasserdichte in der Mikroumgebung des Spinlabels. Ein hoher  $A_{zz}$ -Wert deutet auf eine polare Umgebung des Spinlabels hin, ein niedriger hingegen auf eine apolare (Steinhoff *et al.*, 1999). Die mit dieser Methode gewonnenen Pulverspektren sind in Abbildung 3.26 dokumentiert und die davon abgeleiteten  $A_{zz}$ -Werte in Abbildung 3.29 gegen die Aminosäurepositionen aufgetragen. Die gemessenen Polaritäten liegen im Bereich von 3,6 mT an Position S317R1, wobei die Umgebung dieser spinmarkierten Seitenkette sehr polar ist, und F333R1, die mit 3,37 mT eine sehr apolare Umgebung aufweist. Auffällig in diesen Messungen stellt sich die Region der Reste S327R1, V331R1 und F333R1 (apolar) dar. Hier ist ein starker Abfall der Polarität der Nitroxid-Umgebung zu verzeichnen. Im Bereich der Positionen F339R1, L340R1, R341R1 und K343R1 zeichnet sich ein weiterer Abfall der Polarität an Position L340R1 ab. Der Beginn dieser Sequenz an Aminosäureposition F339R1 weist eine polare Umgebung auf (3,56  $A_{zz}/mT$ ), die im Bereich der Seitenkette von L340R1 apolarer wird (3,43  $A_{zz}/mT$ ). Die Umgebungspolarität des Nitroxids zeigt danach wieder einen Anstieg über Position R341R1 (3,51  $A_{zz}/mT$ ) zu K343R1 (3,57  $A_{zz}/mT$ ) und erreicht damit wieder den Wert der Position F339R1. In Referenzbestimmungen an der Bakteriorhodopsin Helix F sind  $A_{zz} = 3,7$  mT im Bereich der Membran-/Wassergrenze gemessen worden. Werte im Bereich von  $A_{zz} = 3,3$  mT weisen auf eine Position in der Mitte der Lipiddoppelschicht hin (Savitsky *et al.*, 2004). Bei dieser Einordnung erfolgt dann eine Positionierung für F333R1 mitten in der Membran und für L340R1 zumindest eine in der Lipiddoppelschicht. Da es sich um solubilisierte Proteinproben handelt, kann nur vermutet werden, inwieweit diese beiden Positionen in die von Durell und Guy (Abb. 1.5) vorgestellten Modelle passt. Alle anderen untersuchten Seitenketten müssten im Randbereich der Lipiddoppelschicht oder in wässrigen Bereichen innerhalb des Proteins vorliegen, was grundsätzlich mit den Modellen in Einklang zu bringen ist. Studien am SRII/HtrII-Komplex zeigten nur einen geringen Einfluss auf die Wasserdichte in der Mikroumgebung des Spinlabels im solubilisierten Zustand verglichen mit dem rekonstituierten (Klare *et al.*, 2006). Inwieweit dies auch für KtrB zutrifft, kann nicht beantwortet werden, da Referenzwerte für rekonstituiertes VaKtrB zur Zeit noch fehlen.

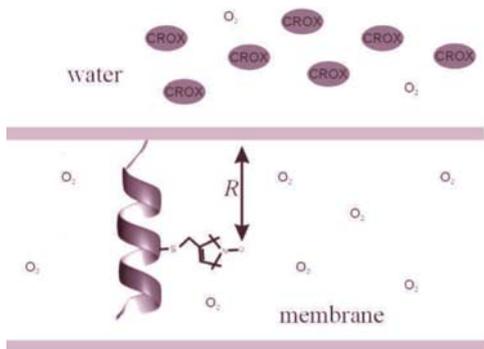


**Abb. 3.29: Umgebungspolarität bestimmt aus Tieftemperaturspektren von gelabelten KtrB-Einzelcysteinvarianten (Abb. 3.26)** Aufgetragen ist  $A_{zz}/mT$  gegen die Aminosäureposition. Ein hoher  $A_{zz}/mT$ -Wert spricht für eine polare Umgebung, ein niedriger hingegen für eine apolare.

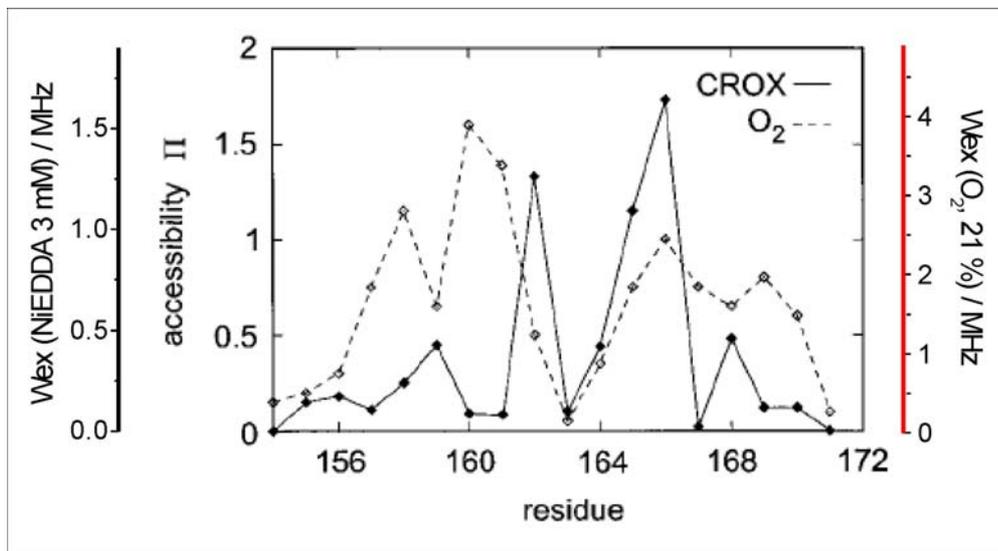
### 3.4.5 Zugänglichkeitsbestimmungen markierter Einzelcysteinvarianten im solubilisierten Zustand sowie ausgewählter rekonstituierter Reste mit Hilfe von Sättigungsmessungen (2.5.1.2)

Im Folgenden werden die Ergebnisse sogenannter Leistungssättigungsmessungen gezeigt. Bei dieser Methode wird die Zugänglichkeit des Spinlabels für paramagnetische Quencher bei Raumtemperatur-ESR-Messungen bestimmt. Bei gleichbleibender Mikrowellenleistung wird die Kollisionshäufigkeit des Quencher-moleküls mit dem Nitroxid-Spinlabel bestimmt. Die hierbei verwendeten Substanzen sind zum Einen der paramagnetische polare Quencher NiEDDA und zum Anderen der apolare Quencher  $O_2$ . Als Referenz dient Stickstoffgas. Sind die Austauschfrequenzen ( $\nu_{ex}/MHz$ ) für NiEDDA hoch, so ist die markierte Seitenkette von der wässrigen Phase her zugänglich, sind sie hingegen für  $O_2$  erhöht, kann von einer lipidorientierten Lokalisation ausgegangen werden. Zeigen sich für keines der beiden Quencher-moleküle Kollisionen, kann angenommen werden, dass diese Aminosäure im Protein verborgen vorliegt (Savitzky *et al.*, 2004; Altenbach *et al.*, 2005, Abb. 3.30). Es wurde in dieser Arbeit NiEDDA als wasserlöslicher Quencher eingesetzt, um möglichen Ladungseffekten zu vorbeugen, was der einzige Unterschied zur Wirkungsweise des geladenen CrOxs sein sollte. Grundsätzlich

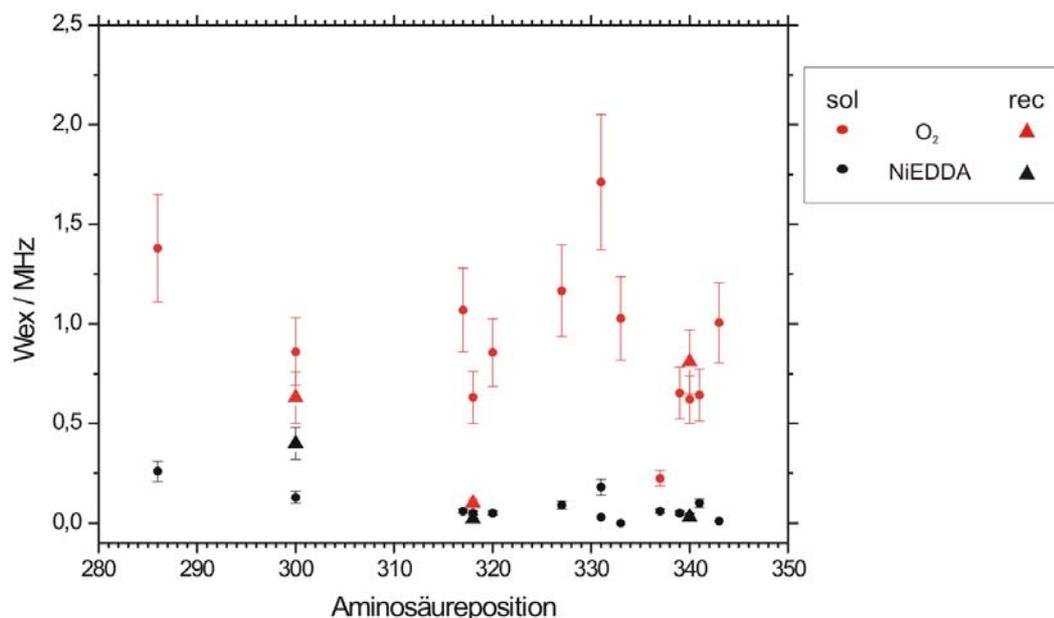
verhält sich NiEDDA aber bei Messungen entsprechend Chromoxalat (siehe Abb. 3.31).



**Abb. 3.30: Kollisionsfrequenz einer in der Membran liegenden Seitenkette mit paramagnetischen Quenchern unterschiedlicher Löslichkeiten für die Lipid- und Wasserphase (hier Chromoxalat und molekularer Sauerstoff).** Es handelt sich hierbei um cw-ESR-Sättigungsmessungen, die den Abstand  $R$  zwischen dem Nitroxid und der Lipid/Wasser-Grenze bestimmen. Abbildung entnommen aus H.-J. Steinhoff (2002).



**Abb. 3.31: Zugänglichkeiten der Bakteriorhodopsin-Mutante (BR) 165(rec) für CrOx (durchgehende Linie, geschlossene Symbole) bzw. O<sub>2</sub> (durchbrochene Linie, offene Symbole) aufgetragen gegen die Aminosäureposition.** Die Abbildung wurde mit Hilfe von Referenzmessungen der Bakteriorhodopsin-Mutante 165 (rekonstituiert) mit zusätzlichen Skalen versehen (Dipl.-Phys. Meike Döbber). Der Vergleich wurde mit 50 mM CrOx, 20 mM NiEDDA (heruntergerechnet auf 3 mM) und O<sub>2</sub> (21%, Luftsauerstoff) durchgeführt. Die Fehlergrenzen liegen bei +/- 20% für die Skalen. Die Abbildung wurde entnommen aus Pfeiffer *et al.* (1999) und entsprechend der obigen Angaben angepasst. Der untersuchte Bereich stellt eine gedrehte Schleife zwischen den  $\alpha$ -Helices E und F sowie ihren Endstücken aus Bakteriorhodopsin dar.



**Abb. 3.32: Ergebnisse der Sättigungsmessungen für Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und NiEDDA im solubilisierten bzw. rekonstituierten Zustand von markierten KtrB-Derivaten.** Aufgetragen ist der Wex/MHz-Wert gegen die Aminosäureposition des gebundenen Spinlabels. Die Ergebnisse der Messungen (rot für O<sub>2</sub>, schwarz NiEDDA) sind mit Kreisen für den solubilisierten und Dreiecken für den rekonstituierten Zustand der Proben markiert. Ist die Zugänglichkeit für NiEDDA erhöht, ist der Rest von der Wasserphase her zugänglich, ist die O<sub>2</sub>-Zugänglichkeit erhöht, ist die markierte Seitenkette zum Lipid hin orientiert. Bei keiner Zugänglichkeit für beide Quencher ist die Position im Proteininnern verborgen.

Die in diesem Ansatz bestimmten Werte für die Zugänglichkeiten sind in Abbildung 3.32 zu sehen. Die Kollisionsfrequenz (Wex/MHz) ist gegen die Aminosäurepositionen aufgetragen. Bei der Betrachtung der Werte fällt auf, dass die spinmarkierten KtrB-Einzelsysteinmutanten praktisch alle un- oder nur in sehr geringem Maß für Ni<sup>2+</sup> zugänglich sind. Die Sauerstoffzugänglichkeit hingegen variiert über die Positionen stark. Diese Auffälligkeit wurde auch durch Klare *et al.* (2006) beschrieben. Die untersuchte KtrB-Variante A286R1 zeigt eine sehr hohe Sauerstoffzugänglichkeit, sowie eine leicht erhöhte Nickelzugänglichkeit. Im Bereich der folgenden Aminosäurepositionen (S327R1, V331R1 [höchste für Sauerstoff bestimmte Zugänglichkeit] und F333R1) zeigt sich eine Spitze in der O<sub>2</sub>-Zugänglichkeit. Dieser Anstieg korreliert mit der Abnahme der Polarität an diesen Positionen. Der Rest W337R1 weist die niedrigste Zugänglichkeit für beide Quencher auf. Die Sauerstoffzugänglichkeit der markierten Seitenketten an den Positionen F339R1, L340R1 und R341R1 liegen auf identischem Niveau. K343R1 weist im Vergleich zu den benachbarten Positionen eine leichte Erhöhung der O<sub>2</sub>-

Zugänglichkeit auf. Bei der Bewertung der solubilisierten Proben im Zusammenhang mit einer Topologievorhersage muss angemerkt werden, dass die Zugänglichkeitsuntersuchungen in der Literatur noch nicht adäquat dokumentiert und somit mit Vorsicht zu betrachten sind. Es scheint, als würde die Detergenzmizelle das Protein in größerem Umfang umschließen, wie an Position T300R1 im Vergleich zwischen solubiliertem und rekonstituiertem Zustand zu sehen ist. Es folgt eine Einordnung der gemessenen Werte nach den in Abbildung 3.31 für Bakteriorhodopsin durchgeführten Referenzmessungen. Allerdings kann die Einteilung nur nach O<sub>2</sub>-Zugänglichkeiten abgeschätzt werden. Eine sehr hohe Zugänglichkeit für O<sub>2</sub> weisen die spinmarkierten Seitenketten an den Mutationsstellen der Aminosäurepositionen A286R1 und V331R1 auf. Diese Werte würden ungefähr mit denen der BR für die Positionen 159, 168 und 171 vergleichbar sein. Diese Positionen sind in BR im Übergang von einer  $\alpha$ -Helix zur wässrigen Phase zu finden. Die markierten Seitenketten T320R1, S327R1, F333R1 und K343R1 zeigen vergleichbare Kollisionsfrequenzen zu den Positionen 162 und 164 der BR-Referenz. Die Mutante BR 164R1 zeigt neben der O<sub>2</sub>-Zugänglichkeit eine hohe Kollisionsfrequenz für den Quencher aus der wässrigen Phase (Helixende, Übergang zur Schleifenregion). Damit sollte diese Seitenkette in ein wässriges Milieu weisen. Für BR 162R1 ist eine der Lipidphase zugewendete Seitenkette vorgeschlagen. Für die untersuchten KtrB-Varianten T318R1, F339R1, L340R1 und R341R1 ist eine Positionierung im Vergleich zu den BR-Referenzen 155R1 und 156R1 vorzuschlagen, die im Endstück der Helix E in Bakteriorhodopsin lokalisiert sind. Ihre Seitenketten sind voraussichtlich in Richtung Proteininnenraum orientiert. Die sehr niedrige Zugänglichkeit für Position W337R1 wäre zu vergleichen mit der BR Position 171R1. Diese Aminosäure liegt im Anfangsbereich der BR-Helix F, ist aber durch ihre Position schon im Proteininnern lokalisiert.

Die rekonstituierten Einzelcysteinvarianten von KtrB zeigen dagegen ein erheblich anderes Bild. Es wurden drei markante Punkte für die nachfolgenden anfänglichen ESR-Spektren im rekonstituierten Zustand ausgewählt, die Position T300R1, die aufgrund von Daten aus zuvor durchgeführten Untersuchungen von der Wasserphase (voraussichtlich Periplasma, Anfang M<sub>2C1</sub>) her zugänglich sein dürfte, und die Position T318R1, die am Anfang von M<sub>2C2</sub> und möglicherweise im Protein verborgen vorliegt. Darüber hinaus wurde Aminosäureposition L340R1 (Ende M<sub>2C3</sub>) ausgewählt, die zuvor als interessant bzw. dem Arbeitsmodell widersprechend bewertet worden ist. Der Rest T300R1 rec ist im Vergleich zum solubilierten

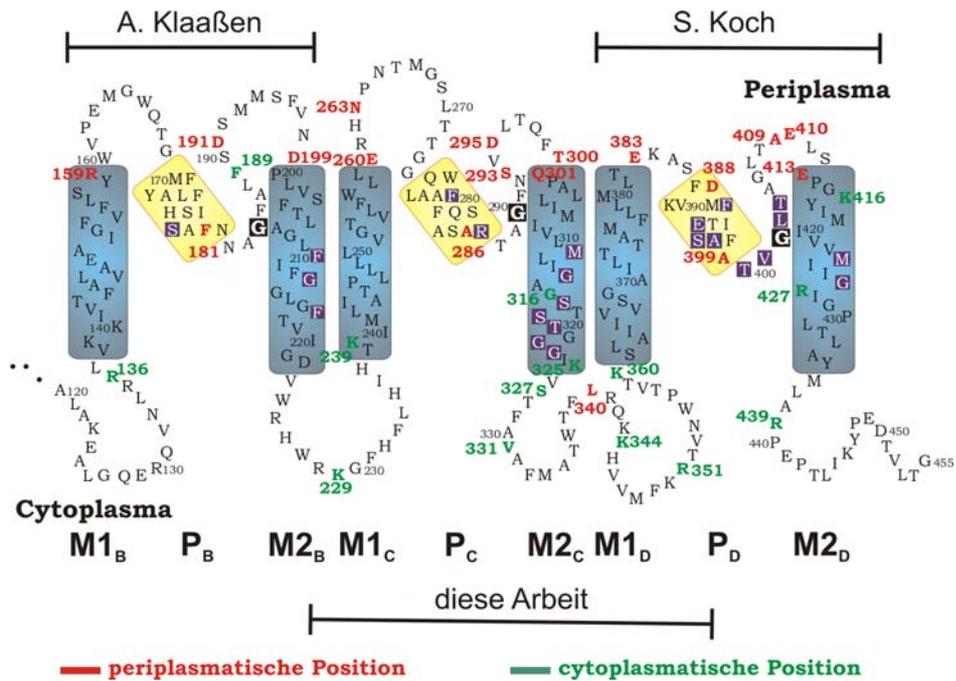
Zustand durch eine erhöhte Nickel- und eine erniedrigte Sauerstoffzugänglichkeit ausgezeichnet. Dies deutet auf eine Zugänglichkeit von der wässrigen Phase her hin. Bei dem Vergleich der Werte mit den Referenzangaben in Abbildung 3.31 würde die Positionierung der an Aminosäureposition 164 entsprechen. Laut Pfeiffer *et al.* (1999) ist diese Aminosäure im Übergang einer gedrehten Schleife zur Helix F in Bakteriorhodopsin zu finden. Diese Schleife stellt den Übergang von Helix E zu F dar und liegt sehr dicht an der Lipidoberfläche. Die Cysteinvariante T318R1 rec ist in diesem Milieu interessanterweise für keinen der beiden Quencher mehr zugänglich und sollte damit im Protein verborgen vorliegen. Eine im Bakteriorhodopsin vorkommende Position zeigt dieses Verhalten. Es handelt sich dabei um Aminosäure 163, die voraussichtlich eine in das Proteininnere gerichtete Seitenkette aufweist (Abb. 3.32). Die Position L340R1 ähnelt in ihrem Sättigungsverhalten der solubilisierten Probe, wobei die O<sub>2</sub>-Zugänglichkeit im Vergleich (rekonstituiert) leicht erhöht ist. Diese O<sub>2</sub>-Zugänglichkeitserhöhung weist auf eine dem Lipid zugewandte Orientierung hin. Ausgeschlossen werden kann, dass sie im Protein verborgen ist oder in die Wasserphase ragt. Damit widerspricht das Ergebnis an Position L340R1 unserem 2D-Arbeitsmodell, die anderen beiden rekonstituierten Positionen stimmen hingegen überein. Der Vergleich der Position L340R1 mit BR-Referenzwerten deutet auf eine Lokalisation in einer  $\alpha$ -Helix hin, wobei die Mobilität der Seitenkette durch Interaktionen mit benachbarten Helices eingeschränkt, diese aber dennoch von der Lipidphase her zugänglich ist.

## 4. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, ein Topologiemodell für die schwer zu modellierende Helix  $M_{2C}$  des KtrB-Proteins zu erstellen. Allerdings möchte ich die Diskussion mit grundlegenden Fragestellungen über die Topologie von VaKtrB beginnen. Aus diesem Grund beschäftigt sich der erste Teil der Diskussion mit der Holoenzymfaltung, wobei im späteren Verlauf die  $M_{2C}$ -Helix im speziellen betrachtet wird.

### 4.1 Hat VaKtrB eine MPM-Domänen-Struktur?

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, basiert die Topologie von VaKtrB zur Zeit praktisch nur auf theoretischen Arbeiten. Aus diesem Grund begann Nancy Tholema mit Cystein zugänglichkeitsuntersuchungen, die diese Fragestellung genauer untersuchen sollten. Allerdings führten diese experimentellen Ansätze zu keinem endgültigen Ergebnis, da nur vereinzelt Austausche im Bereich der  $MPM_C$ -Domäne durchgeführt wurden. Daher wurden während dieser Arbeit Topologiestudien in größerem Umfang durchgeführt, die sich hauptsächlich auf den schwer zu modellierenden Bereich  $MPM_C$  beschränkten. Darüber hinaus wurden im Rahmen der Abschlussarbeiten von Sabrina Koch und Alexandra Klaußen auch die angrenzenden Bereiche ( $MPM_B$  und  $D$ ) von VaKtrB mittels PhoA-Fusionen unter meiner Anleitung untersucht (Abb. 3.8 a /4.1).



**Abb. 4.1 (siehe auch Abb. 3.8 a): Übersicht der PhoA-Aktivitäten im Bereich KtrB-MPM<sub>B</sub> bis MPM<sub>D</sub>.** In der Region MPM<sub>B</sub> wurden die Untersuchungen von A. Klaaßen im Rahmen einer Diplomarbeit (2002) und im Bereich MPM<sub>D</sub> von S. Koch während einer Bachelor-Arbeit (2003) durchgeführt. Die Aktivitätsmessungen der Positionen im Bereich der MPM<sub>C</sub>-Domäne wurden in dieser Arbeit angefertigt. In rot sind Reste mit erhöhter PhoA-Aktivität markiert, inaktive hingegen in grün. Modifiziert nach N. Tholema bzw. Durell *et al.* (1999).

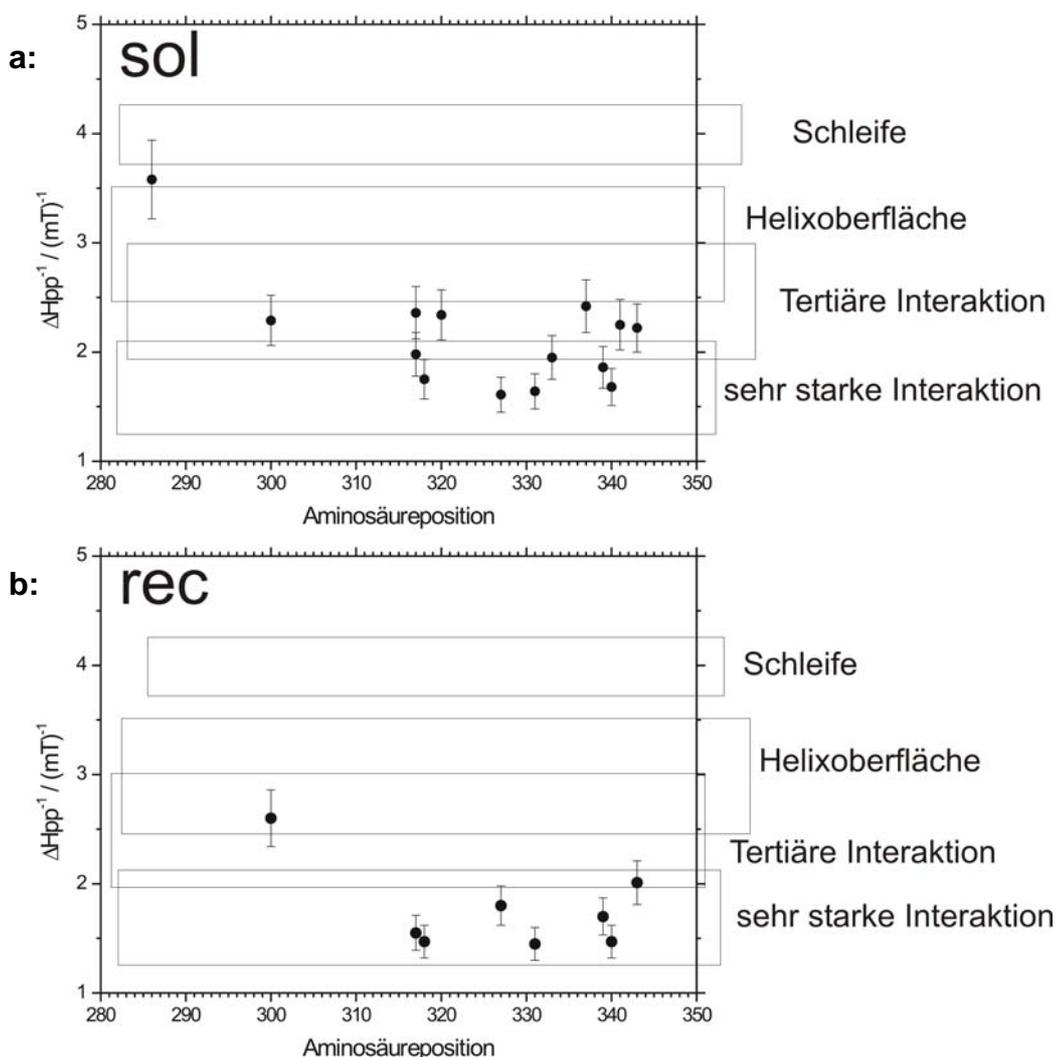
Es fällt bei der Betrachtung des bestehenden 2D-Arbeitsmodells (Abb. 4.1) auf, dass periplasmatisch positionierte Aminosäuren eine erhöhte PhoA-Aktivität zeigen, cytoplasmatische Positionen hingegen nicht. Ausnahmen hierbei stellen die Positionen F189 und L340 dar. Positionen, die in putativen Transmembranhelices vorliegen und keine P-Loop-Regionen darstellen, zeigen keine Aktivität (G316, K416 und R427). Zumindest das Ergebnis für die Fusionspunkte G316 und R427 war nach der Theorie dieser Methode (3.1.1) zu erwarten, da eine ausreichende Membranpassage (laut 2D-Modell, Abb. 4.1) gegeben sein müsste. Die Aminosäureposition K416 widerspricht zwar augenscheinlich diesem Modell, allerdings muss bei der Bewertung dieses Kontextes angeführt werden, dass die Fusionspunkte A409, E410 und E413 zuvor schon eine stark erniedrigte Aktivität aufweisen (Abb. 3.8 b). Wie zu erwarten war, zeigen sich im Bereich der möglichen P-Loop-Regionen schwer zu interpretierende Ergebnisse. Die Fusionsstellen in P<sub>B</sub> und P<sub>C</sub> (F181 und A286, Abb. 3.8 b; Abb. 4.1) weisen niedrige Aktivitäten auf, allerdings heben sie sich deutlich von total inaktiven cytoplasmatischen Resten (z.B. K229) ab. Die Aminosäureposition A399 zeigt hingegen eine deutliche Aktivität. Dies ist ein interessanter Unterschied zu den anderen P-Loop-Resten, da der

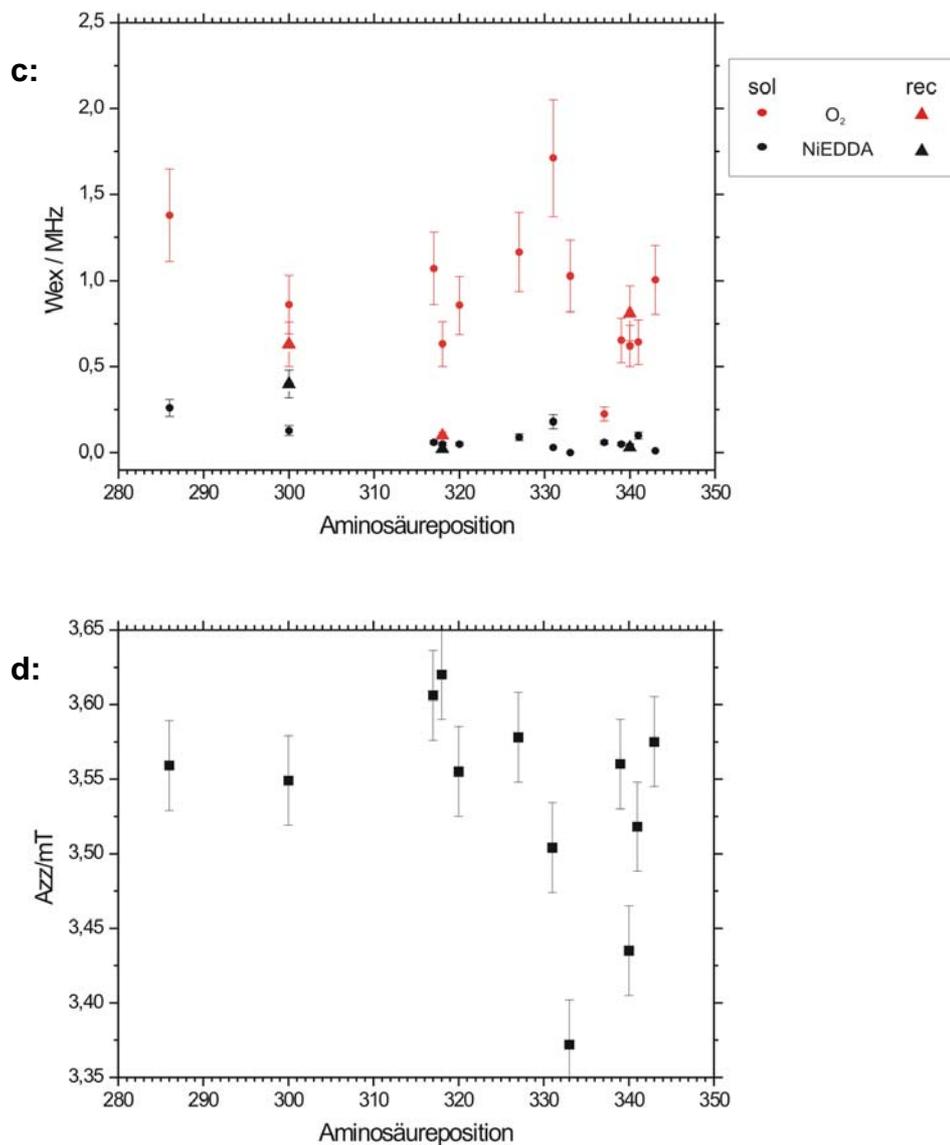
Fusionspunkt A399 strukturell um eine Aminosäureposition im Vergleich zu F181 und A286 in C-terminaler Richtung verschoben ist. Interessant wären PhoA-Fusionsstudien für die Aminosäurepositionen N182, R287 und F398 und die daraus resultierenden Ergebnisse, um strukturelle Ähnlichkeiten in den einzelnen P-Loop-Regionen zu detektieren. Die erniedrigte Aktivität der Positionen in P<sub>B</sub> und P<sub>C</sub> könnte allerdings ein Hinweis auf eine in die Membran zurückgefaltete Topologie der P-Loops sein (Abb. 3.8 b). Die Frage nach der Lokalisation der Aminosäure L340 bleibt ungeklärt. Da alle umgebenden Positionen cytoplasmatisch lokalisiert zu sein scheinen, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesem Ergebnis um ein Artefakt handelt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der spezifischen Position von L340 begründet liegen. Zum Einen ist diese Aminosäure am Ende von M<sub>2C3</sub> (der hydrophoben Teilhelix) und zum Anderen folgen dieser Position direkt ab R341 drei positiv geladene Aminosäuren (K343 und K344) (Abb. 1.4). Da die positiv geladenen Aminosäuren („positive inside rule“) aber methodisch bedingt wegfallen, könnte dies zur Missfaltung des Fusionsproteins führen. 1990 wurde von mehreren Autoren beschrieben, dass positiv geladene Aminosäuren gezielt zur Veränderung von Proteinfaltungen eingesetzt werden können (Boyd & Beckwith, 1990; Dalbey, 1990; von Heijne & Manoil; 1990). Insgesamt muss dieses Ergebnis als methodenbedingtes Artefakt gewertet werden, das allerdings durch die Topologie der M<sub>2C</sub>-Helix begünstigt werden könnte. Interessant bleibt dieses Ergebnis aber weiterhin. Bei der genaueren Betrachtung der Aktivitäten innerhalb eines MPM-Motivs fällt ein Muster auf. Die Aktivitäten vor einer putativen P-Loop-Region sind im Vergleich höher als an Positionen, die hinter einer solchen liegen (Vergleich Fusionspunkte R159 mit D191 und D199; E260, N263 mit S293, D295, T300, Q301; E383, D388 mit A409, E410 und E413; Abbildung 3.8 b). Dieses Ergebnis erweist sich beim Vergleich mit der Topologie des KcsA-Kanals als sehr interessant. So unterstützen diese Daten nachdrücklich, dass auch in VaKtrB eine Art Türmchenstruktur vor dem P-Loop zu finden ist, wohingegen die Schleife hinter dem P-Loop flach an der Membran anliegt (Abb. 1.1; Doyle *et al.*, 1998). Es scheint, als wäre die periplasmatische Topologie von VaKtrB dem KcsA-Kanal sehr ähnlich. Die einzelnen MPM-Motive heben sich dabei durch PhoA-inaktive cytoplasmatische Schleifen voneinander ab. In der Ergebnisübersicht von VaKtrB zeigt sich eine Wiederholung dieses Aktivitätsprofils in den untersuchten Bereichen (MPM<sub>B-C</sub>). Gerade dieses sich wiederholende Muster unterstützt damit die Vorhersage, dass KtrB aus *Vibrio alginolyticus* eine sich vierfach wiederholende MPM-Domänenstruktur

aufweist (Abb. 4.1; Abb. 3.8). Lediglich für den Bereich von  $MPM_A$  sind in dieser Hinsicht noch keine Untersuchungen durchgeführt worden. Allerdings ist dieser Bereich gut anhand der Vorgaben der KcsA-Kristallstruktur zu modellieren und stellt somit keinen kritischen Bereich dar. Folglich scheint die Vorhersage von Durell *et al.* (1999) über die Topologie von KtrB im Fall von *Vibrio alginolyticus* zu stimmen.

## 4.2 Die Ergebnisse im Bereich $MPM_C$

Im Folgenden werden die Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst, die den Bereich  $MPM_C$  betreffen. Daten, die zuvor nicht im Ergebnisteil dargestellt wurden, sind zur Vervollständigung der Übersicht von anderen Personen übernommen worden (Tab. 4.1). Zur besseren Übersicht sind hier noch einmal alle durch ESR gewonnenen Daten untereinander zum direkten Vergleich dargestellt.





**Abb. 4.2: Übersichtsabbildung der ESR-Daten (Abb. 3.26).**  
**a:** Mobilitätswertanalyse spinmarkierter Einzylcysteinvarianten im solubilisierten Zustand (s. Abb. 3.28 a).  
**b:** Mobilitätswertanalyse spinmarkierter Einzylcysteinvarianten im rekonstituierten Zustand (s. Abb. 3.28 b).  
**c:** Zugänglichkeiten spinmarkierter Einzylcysteinvarianten für die paramagnetischen Quencher NiEDDA und Luftsauerstoff im solubilisierten und rekonstituierten Zustand (s. Abb. 3.32).  
**d:** Bestimmung der Umgebungspolaritäten spinmarkierter Einzylcysteinvarianten durch ESR-Tiefemperatur-Spektroskopie im solubilisierten Zustand (s. Abb. 3.29).

Aminosäure- position	Zuordnung	PhoA	Cysteinzugänglichkeit		Komplementation (Cysteinvariante)	Mobilität		ESR-Spektroskopie											
			Biotin- Maleimid	Disulfonat- Maleimid		sol	rec	sol	sol	NIEDDA	Zugänglichkeiten O <sub>2</sub>								
K229	C	-																	
K239	C	-																	
E260	P	h																	
N263	P	h																	
A286	P-Loop	n	-	-	normal	H/S		h	m										h
S293	P	m																	
D295	P	m																	
T300	P	m	+	+		T	H/T	h	n	m	m								m
Q301	M <sub>2C1</sub>	m																	
L313	M <sub>2C1</sub>				normal														
G314	M <sub>2C2</sub>				eingeschränkt														
A315	M <sub>2C2</sub>				eingeschränkt														
G316	M <sub>2C2</sub>	n			normal														
S317	M <sub>2C2</sub>		-	-	normal	T	B	h	n										h
T318	M <sub>2C2</sub>		+	+	normal	B	B	h	n	n	n								m
S319	M <sub>2C2</sub>				eingeschränkt														
T320	M <sub>2C2</sub>		+/-	-	normal	T		h	n										m
G321	M <sub>2C2</sub>				keine/schlecht														
G322	M <sub>2C2</sub>				keine/schlecht														
G323	M <sub>2C2</sub>				keine/schlecht														
I324	M <sub>2C2</sub>				keine/schlecht														
K325	M <sub>2C2</sub>	n			keine/schlecht														
V326	M <sub>2C2</sub>				keine/schlecht														

Aminosäure- position	Zuordnung	PhoA	Cysteinzuganglichkeit		Komplementation (Cysteinvariante)	Mobilität		ESR-Spektroskopie			
			Biotin- Maleimid	Disulfonat- Maleimid		sol	rec	Polarität		Zugänglichkeiten	
								sol	rec	NIEDDA	O <sub>2</sub>
S327	M <sub>2C2</sub>	-	+	+/-	normal	B	B	h	n	h	
F329	M <sub>2C3</sub>				normal						
V331	M <sub>2C3</sub>	-	+	-	normal	B	B	m	n	h	
F333	M <sub>2C3</sub>		+	+	normal	T/B		n	n	h	
W337	M <sub>2C3</sub>		-	-	normal	T		n	n	n	
T338	M <sub>2C3</sub>		+	+/-	normal						
F339	M <sub>2C3</sub>		+/-	-	normal	B	B	h	n	m	
L340	M <sub>2C3</sub>	h	+/-	+	normal	B	B	m	n	m	m
R341	C		+/-	-	normal	T		m	n	m	
K343	C		+	+/-		T	T/B	h	n	h	
K344	C	-									
R351	C	-									
K360	C	.									

**Tab. 4.1: Ergebnisübersicht.** Die Aminosäureposition gibt den untersuchten Rest an. Die Zuordnung gibt die vorgeschlagene Position im Modell nach Durell und Guy (1999) an (Abb.1.4). C: Cytoplasma, P: Periplasma. Die restlichen Abkürzungen entsprechen der Einteilung aus Abbildung 1.4.

**PhoA:** Die PhoA-Aktivität ist in vier Kategorien eingeteilt: -: inaktiv, n: niedrig, m: mittel, h: hoch (Abb. 3.3).

**Cysteinzuganglichkeit:** -: nicht zugänglich, +: gut zugänglich, +/-: schlecht zugänglich für das entsprechende Maleimid (Disulfonat-Maleimid nicht membranpermeant; Abb. 3.18, N. Tholema, 2002).

**Komplementation:** Bezieht sich auf Einzelcysteinvarianten im cysteinfreien Hintergrund verglichen mit dem Wildtyp (s. Abb. 3.15, Inga Hänel, persönliche Mitteilung, N. Tholema, 2002, A. Rose, 2004).

**ESR-Spektroskopie:** Die ESR-spektroskopischen Untersuchungen wurden in solubilisiertem (sol) und rekonstituiertem (rec) Zustand durchgeführt (s. Abb. 3.26).

**Mobilitätswertanalyse** wird nach der Klassifizierung von Mchaourab *et al.* (1996) und Hubbel *et al.* (1996) angegeben. Buch-stabencode: S: Schleife, H: Helixoberfläche, T: tertiäre Interaktion, B: sehr starke Interaktion. (s. Abb. 3.28).

Die **Polarität** ist ein Maß für die Wasserdichte in der Mikroumgebung des Spinlabels. Diese wurden in drei Kategorien eingeteilt. n: niedrig ( $\leq 3,4$  Azz/mT), m: moderat (zwischen 3,4 und 3,55 Azz/mT), h: hoch ( $\geq 3,5$  Azz/mT) (s. Abb. 3.29).

**Zugänglichkeiten spinmarkierter Seitenketten für para-magnetische Quencher: NiEDDA (wässrige Phase) und O<sub>2</sub> (Lipid Phase).** Die Einordnung erfolgte in folgende Kategorien: n: niedrig ( $\leq 0,25$  Wex/Mhz), m: moderat (zwischen 0,25 und 1,0 Wex/Mhz), h: hoch ( $\geq 1,0$  Wex/Mhz) (s. Abb. 3.32).

### 4.3 Vergleich der Topologie von VaKtrB im solubilisierten und rekonstituierten Zustand

In dieser Arbeit wurden viele Daten über VaKtrB sowohl im solubilisierten als auch im rekonstituierten Zustand durch die ESR-Spektroskopie gesammelt (Abb. 3.26, Tab. 4.1, Abb. 4.2). Betrachtet man diese Daten im Vergleich, so zeigen sich einige Auffälligkeiten.

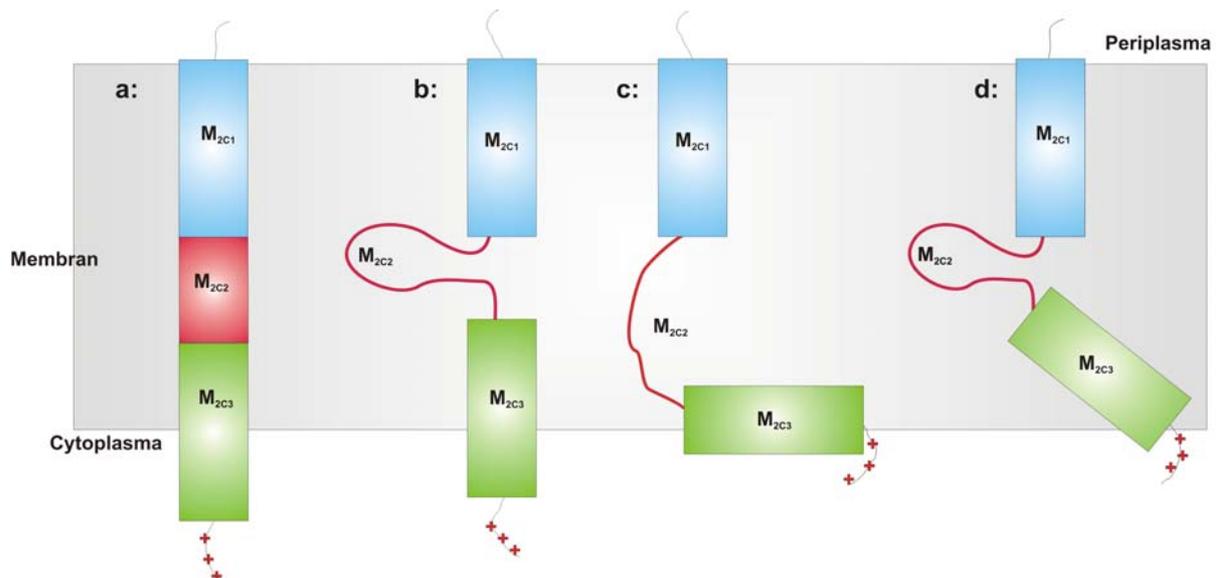
Als erstes weisen die solubilisierten Proben deutlich höhere Seitenkettenmobilitäten auf. Diese Tatsache dürfte grundsätzlich für eine insgesamt aufgelockertere Struktur im Vergleich zum rekonstituierten Protein sprechen (Abb. 3.28, Tab. 4.1, Abb. 4.2). Der Effekt einer erhöhten Mobilität im solubilisierten Zustand wurde schon von Klare *et al.* (2006) dokumentiert, wobei Ausnahmen, wie sie die Seitenkette an Position T300R1 darstellt, nicht ungewöhnlich zu sein scheinen.

In Bezug auf die Bestimmung der Zugänglichkeiten spinmarkierter Seitenketten fielen folgende Fakten auf: Solubilierte, spinmarkierte Proteinproben zeigten praktisch keine Zugänglichkeit für den wasserlöslichen Quencher NiEDDA, wohingegen die O<sub>2</sub>-Zugänglichkeit sehr wohl in Abhängigkeit von der Position variiert (Abb. 3.32, Tab. 4.1, Abb. 4.2). Der Effekt, dass solubiliertes Protein verglichen mit rekonstituiertem ein anderes Verhalten in Bezug auf die Zugänglichkeit der spinmarkierten Seitenkette für CrOx aus der Wasserphase her zeigt, wurde am Beispiel des Photorezeptor/Transducer-Komplex von *Natronomonas pharaonis* beschrieben (sehr stark erniedrigt im solubilierten Protein im Vergleich zu rekonstituiertem) (Klare *et al.*, 2006). Die Daten meiner Arbeit zeigen, dass NiEDDA in solubilierten Proteinproben ein dem CrOx proportionales Verhalten aufweist und dem entsprechend keine der untersuchten Positionen von der Wasserphase her zugänglich zu sein scheint. Hingegen belegen die Studien in dem von Klare *et al.* untersuchten Komplex, dass sich die O<sub>2</sub>-Zugänglichkeit der Aminosäureseitenketten im Vergleich von solubiliertem und rekonstituiertem Proteinzustand nicht signifikant unterscheidet. Dieses konnte nur bedingt im Fall von VaKtrB bestätigt werden. Zum Vergleich müssen die drei in beiden Proteinzuständen untersuchten Positionen T300R1, T318R1 und L340R1 betrachtet werden (Abb. 3.32, Tab. 4.1, Abb. 4.2). Dabei fällt an Position T300R1 eine leichte Verschiebung der NiEDDA- und O<sub>2</sub>-Kollisionsfrequenzen auf, welche insgesamt auf eine großflächigere Umschließung der hydrophoben Bereiche des Proteins durch das Detergenz hindeuten dürfte. Bei einer durchschnittlichen Micellegröße von ca. 50 kDa für DDM (Calbiochem, 2001),

die auch der theoretischen Größe von VaKtrB entspricht, ist dieses zumindest im Bereich des Möglichen. Die starke Erhöhung der Sauerstoffzugänglichkeit im solubilisierten Zustand der Einzelcysteinvariante T318R1 ist ein wichtiger Hinweis auf eine veränderte Faltung von VaKtrB. Diese sollte laut Messungen im rekonstituierten Zustand im Protein verborgen vorliegen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Auflockerung der um eine Pore angeordneten MPM-Motive sein. Eine komplette Entfaltung des Proteins dürfte aber eher unwahrscheinlich sein, da solubiliertes KtrB an KtrA bindet (Kröning *et al.*, 2007). Unter Umständen reicht das Eindringen von Detergenzmolekülen in die Kavität bzw. zwischen die Helices aus, um diese Ergebnisse zu erzielen. Die Aminosäure L340R1 ist im rekonstituierten Zustand eindeutig von der Lipidphase für molekularen Sauerstoff zugänglich. Im direkten Vergleich der Zugänglichkeiten treten hier nur kleine Unterschiede zwischen den zwei Zuständen auf. Daraus kann geschlossen werden, dass gerade die Seitenketten, die im rekonstituierten VaKtrB im Bereich der Lipiddoppelschicht lokalisiert sind, auch im solubilierten Zustand ein ähnliches Verhalten aufweisen, so wie es von Klare *et al.* (2006) beschrieben wurde. Für andere Positionen muss angenommen werden, dass diese für die O<sub>2</sub>-Zugänglichkeit unterschiedliche Ergebnisse erzielen (solubiliert/rekonstituiert). Aminosäure-seitenketten, die im rekonstituierten Zustand in der Wasserphase liegen, scheinen durch Detergenzmoleküle abgedeckt zu sein. Seitenketten, die im Proteininnern liegen, werden hingegen im Fall von VaKtrB zugänglicher für molekularen Sauerstoff. Festzuhalten ist, dass die Faltung von KtrB im solubilierten Zustand nicht mehr komplett der nativen zu entsprechen scheint, was die Interpretation von ESR-Daten, die mit solubiliertem Protein erzielt wurden, erschwert. Zumindest leisten die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen einen weiteren Beitrag für die Methodenentwicklung der ESR-Spektroskopie. Sie ergänzen die von Klare *et al.* (2006) gesammelten Daten und geben neue Anhaltspunkte für die Interpretation von Messergebnissen solubilisierter Proteinproben.

#### 4.4 Die Faltung der M<sub>2C</sub>-Helix

Ziel der Arbeit war es, ein Topologiemodell für die schwer zu modellierende Helix M<sub>2C</sub> des KtrB-Proteins zu erstellen. Zwecks besseren Verständnisses möchte ich zunächst die schematischen Modelle der M<sub>2C</sub>-Helix besprechen. (s. 1.7, Abb. 1.5). In Abbildung 4.3 sind die vorherrschenden Modelle gezeigt.



**Abb. 4.3. Schematische Darstellung von M<sub>2C</sub>-Faltungsmodellen.** Dargestellt sind die einzelnen Bereiche im folgenden Farbkode. blau: M<sub>2C1</sub>, rot: M<sub>2C2</sub>, grün: M<sub>2C3</sub>, rote + Zeichen symbolisieren die positiven Aminosäuren der „positiv inside rule“.

**a:** durchgehende M<sub>2C</sub>-Helix nach KdpA Modellvorstellungen von Durell *et al.* (2000).

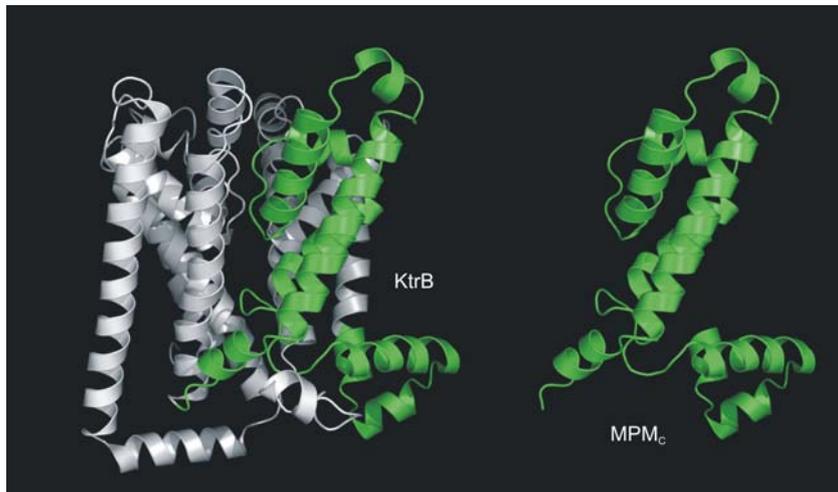
**b:** Modell für die M<sub>2C</sub>-Helix nach Durell und Guy (1999) (Abb. 1.5 C/D). In diesem Modell füllt M<sub>2C2</sub> als Schleife die Kavität, wobei M<sub>2C3</sub> als senkrechte  $\alpha$ -Helix in der Membran steckt.

**c:** Modell für die M<sub>2C</sub>-Helix nach Durell und Guy (1999) (Abb. 1.5 A/B) M<sub>2C2</sub> bildet eine Übergangsstruktur und M<sub>2C3</sub> ist in diesem Modell als  $\alpha$ -Helix an die Membran angelagert.

**d:** Intermediäres Modell zwischen b: und c:.

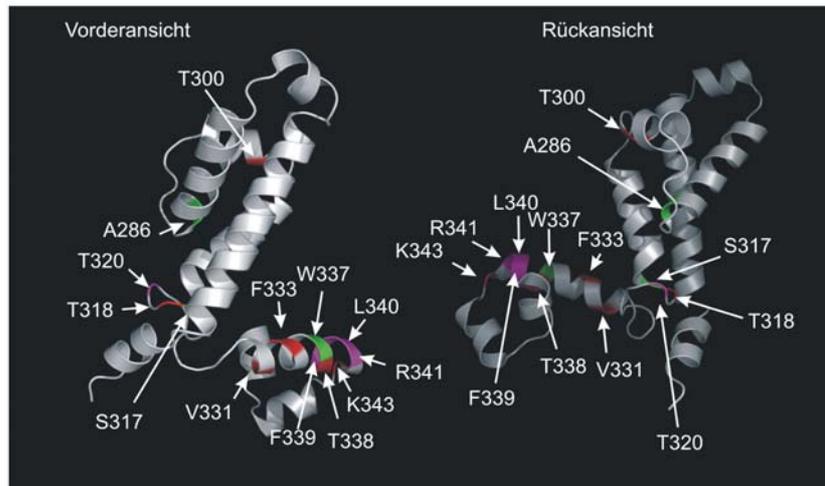
Um das KtrB-Modell von Durell und Guy (1999), das anhand der Aminosäuresequenz des *Aquifex aeolicus* KtrBs erstellt worden ist (Abb. 1.5 A/B, Abb. 4.3 c, Abb. 4.4), mit VaKtrB vergleichen zu können, mussten Sequenzanalysen durchgeführt werden. Diese Sequenzvergleiche (siehe Anhang) verdeutlichen, dass die Sequenzen von *A. aeolicus* und *V. alginolyticus* KtrB einander ähnlich sind. Der Anfang von AaKtrB ist ca. 20 Aminosäuren kürzer als der von VaKtrB. Eine zweite Lücke ist im MPM<sub>D</sub>-Bereich zu finden, die allerdings deutlich weniger Aminosäuren umfasst (siehe Anhang). In Abbildung 4.4 ist eine Vergrößerung des Durell und Guy-Modells aus Abbildung 1.5 A/B zu sehen (siehe auch Abb. 4.3 c). Die Domäne MPM<sub>C</sub> ist grün dargestellt, wohingegen der restliche Teil grau gefärbt ist. Das

vorherrschende 2D-Arbeitsmodell für die untersuchten Regionen ist in Abbildung 4.1 (bzw. Abb. 3.8a) mit den PhoA-Fusionsergebnissen dargestellt.

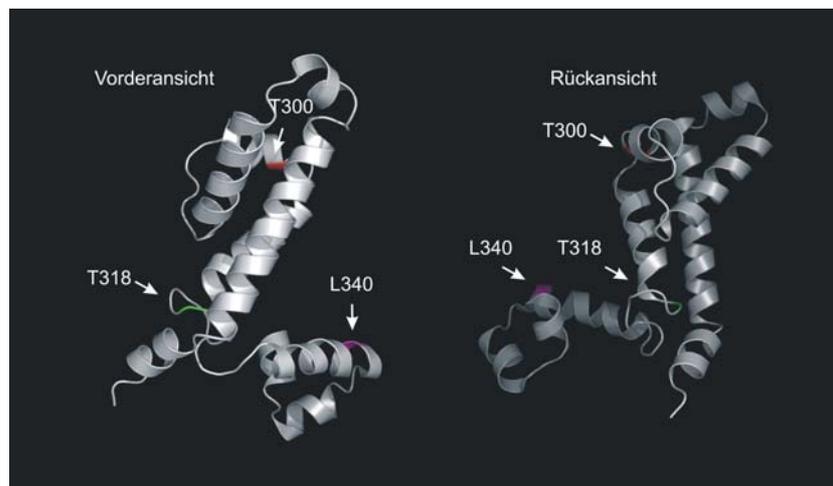


**Abb. 4.4: Modifizierte Abbildung nach Durell und Guy (1999).** Die Abbildung ist eine anders kolorierte Darstellungsweise des in den Abbildungen 1.5 A und B bzw. 4.3 c dargestellten Modells. Die Domäne MPM<sub>c</sub> ist grün eingefärbt, die Domänen A,B und D grau (links). In der rechten Bildhälfte ist MPM<sub>c</sub> isoliert gezeigt. Die Computermodelldaten wurden von Herrn Guy freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Hinzu kommen noch Darstellungen einiger ausgewählter Ergebnisse aus dem von mir favorisierten Modell von Durell und Guy (1999), die eine bessere Übersicht und ein verbessertes Verständnis meiner Argumentation gewährleisten sollen. Es handelt sich dabei um das Modell aus Abbildung 4.4. Die entsprechenden Farbkodes werden in der jeweiligen Abbildung erklärt. Dabei wurden im Fall der Cysteinenzugänglichkeiten (Abb. 4.5) nur Biotinmaleimidzugänglichkeiten berücksichtigt. Schutzreaktionen durch das Stilben-Disulfonat-Schutzreagenz werden in Tabelle 4.1 bzw. im Text erläutert. Davon abgesehen fanden nur Daten aus der ESR-Spektroskopie (Abb. 4.6) Verwendung, die anhand des rekonstituierten KtrB-Proteins erhoben wurden.



**Abb. 4.5: Modifizierte Darstellung der Cysteinzugänglichkeiten im Modell der  $MPM_C$ -Domäne von Durell und Guy (1999).** Die Ergebnisse für das biotinylierte Maleimid sind in folgendem Farbkode dargestellt: Rot markierte Aminosäuren sind zugänglich, magenta gefärbte schwach zugänglich und grün gefärbte unzugänglich. Im linken Bildabschnitt ist die Vorderansicht gezeigt, im rechten eine rückseitige Ansicht. Daten entnommen aus der Abbildung 3.18 bzw. Tabelle 4.1.



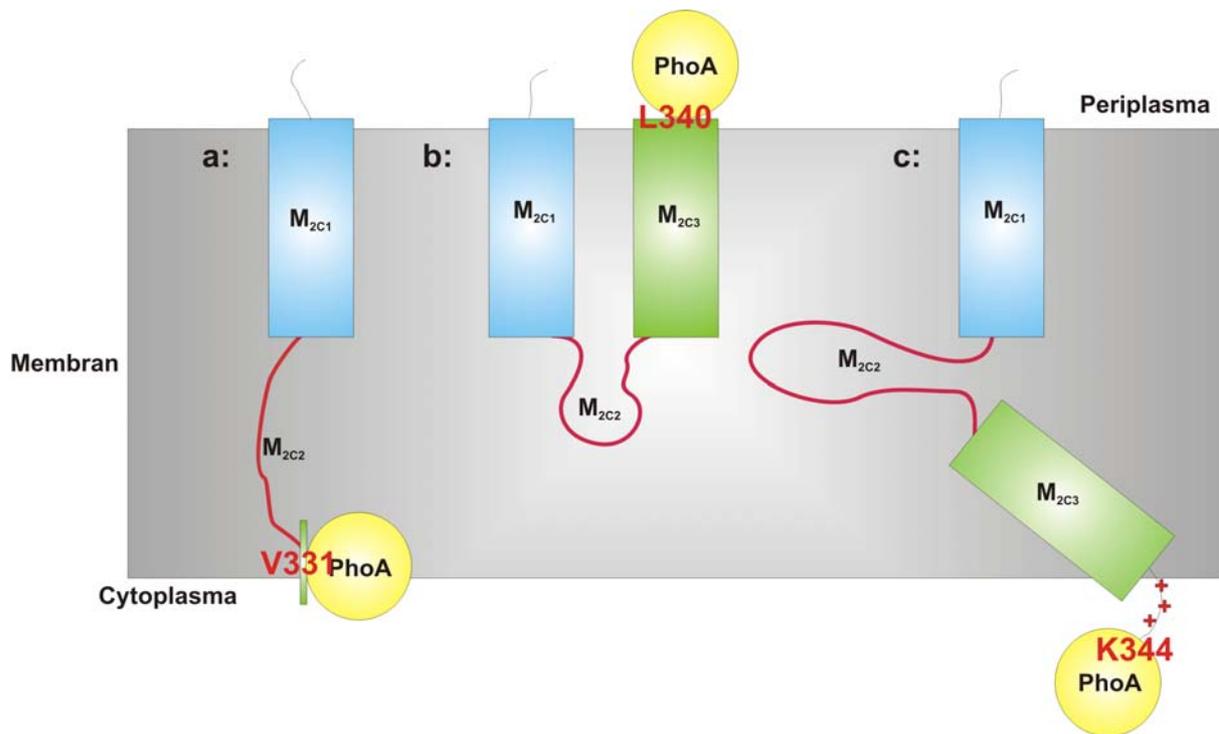
**Abb. 4.6: Darstellung der ESR-Zugänglichkeiten (rekonstituiert) im Modell der  $MPM_C$ -Domäne von Durell und Guy (1999).** Die Ergebnisse sind in folgendem Farbkode dargestellt: Rot markierte Aminosäuren sind von der Wasserphase her zugänglich, magenta gefärbte vom Lipid her und grün gefärbte sind unzugänglich für beide Quencher. Im linken Bildabschnitt ist die Vorderansicht gezeigt, im rechten eine rückseitige Ansicht. Daten entnommen aus Abbildung 3.32 bzw. Abbildung 4.2 und Tabelle 4.1.

Die Bereiche  $P_C$  und  $M_{2C1}$  waren anhand der Kristallstrukturdaten von KcsA gut zu modellieren (Abb. 1.5; Abb. 4.1 bzw. 4.4; Durell und Guy, 1999). Wie schon zuvor erläutert ergaben die PhoA-Fusionen keine dieser Topologie widersprechenden Daten (Abb. 4.1; Tab. 4.1), weshalb in diesem Bereich nur sehr wenige Mutationen eingefügt wurden. Im Bereich  $P_C$  ist nur die Position A286C als nicht zugänglich (Cysteinzugänglichkeit) getestet worden, was der Positionierung in den bestehenden Modellen entspricht. Im Modell von Durell und Guy befindet sich die Position T300C

(M<sub>2C1</sub>; Abb. 4.5, Tab. 4.1) an der Grenzfläche zwischen Membran und Wasser an der Unterseite einer Helix (Abb. 4.5). Die eindeutige Lokalisation dieses Restes im periplasmatischen Übergang einer Helix von der Lipid- zur Wasserphase durch Cysteinzugänglichkeits- und ESR-Ergebnisse (Abb. 3.18; Abb. 3.32, Abb. 4.2, Abb. 4.5, Abb. 4.6 ;Tab. 4.1) entspricht der vorgeschlagenen Position und wird durch den Mobilitätswert für die markierte Seitenkette unterstützt (Abb. 3.28). Allerdings muss die Orientierung der Seitenkette an Position T300C angepasst werden, da die Seitenkette den Ergebnissen entsprechend nicht senkrecht in die Membran ragen darf (Abb. 4.5, Abb. 4.6, Tab. 4.1).

M<sub>2C2</sub> ist ein kritischer Bereich, da zu klären ist, ob diese Sequenz eine Schleifenstruktur bzw. einen flexiblen Linker oder lediglich eine durchgehende Helix innerhalb von KtrB bildet (Abb. 4.3). Grundsätzlich weisen die meisten Ergebnisse, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, auf eine proteininterne Position hin (S317C, T318C, T320C), da die Einzelcysteine schlecht zugänglich sind und ihre Seitenketten stark immobilisiert vorliegen (Tab. 4.1). Auffällig hierbei ist allerdings die Position T318C, die vom Periplasma her für beide Maleimide erreichbar ist (Cysteinzugänglichkeit). Diesem Ergebnis widersprechen die ESR-Daten, die auf eine im Protein verborgene Position hindeuten (Abb. 4.5; Abb. 4.6; Tab. 4.1). Im Kontrast zu den anderen M<sub>2C</sub>-Zugänglichkeiten scheint die Position S327C nicht eindeutig bestimmt zu sein (Tab. 4.1; N. Tholema, 2002). Diese Aminosäure im Übergang von M<sub>2C2</sub> zu M<sub>2C3</sub> scheint einen intermediären Charakter verglichen mit den Aminosäuren V331C und F333C zu besitzen.

Die Frage, welches der Modelle in Abbildung 4.3 für diesen Bereich am wahrscheinlichsten ist, kann nicht direkt beantwortet werden. Indirekt könnte aber das PhoA-Fusions-Ergebnis für Position L340 als Indiz dafür gewertet werden, dass die Region M<sub>2C2</sub> ein flexibles Teilstück innerhalb der Membran bildet. Es geht eindeutig aus den PhoA-Fusionen hervor, dass ohne M<sub>2C3</sub> (Abb. 4.7 a; Konstrukt: V331) die alkalische Phosphatase im Cytoplasma vorliegt. Selbiges ist für das Vorhandensein der positiven Aminosäuren („positive inside rule“) im Konstrukt für die Position K344 gegeben (Abb. 4.7 c). Werden diese entfernt (L340), so scheint der flexible Linker die Umlagerung der M<sub>2C3</sub>-Helix auf die periplasmatische Seite (PhoA erhöhte Affinität) zu vereinfachen (Abb. 4.7 b).



**Abb. 4.7. Schematische Darstellung von  $M_{2C}$ -Faltungsmodellen der PhoA-Fusionen.** Dargestellt sind die einzelnen Bereiche im folgenden Farbkode. blau:  $M_{2C1}$ , rot:  $M_{2C2}$ , grün:  $M_{2C3}$ , rote + Zeichen symbolisieren die positiven Aminosäuren der „positiv inside rule“.

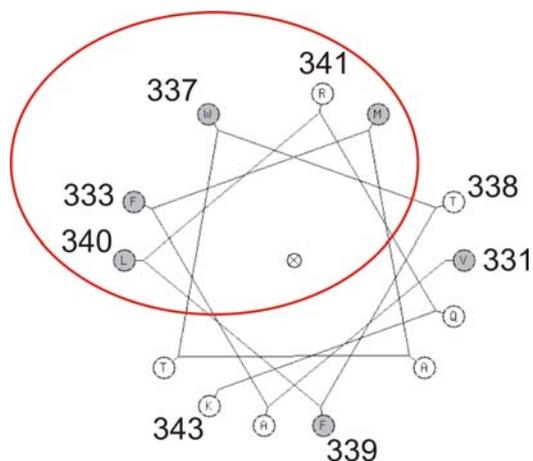
**a:** Darstellung des Faltungsmodells für das PhoA-Fusionsprotein der  $M_{2C}$ -Helix an Position V331.  
**b:** Darstellung des Faltungsmodells für das PhoA-Fusionsprotein der  $M_{2C}$ -Helix an Position L340  
**c:** Darstellung des Faltungsmodells für das PhoA-Fusionsprotein der  $M_{2C}$ -Helix an Position K344

Ein interessanter Aspekt dieser Fragestellung liegt möglicherweise in der Kristallstruktur des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters NhaA aus *E. coli*. In den Helices IV und XI dieses Antiporters sind flexible Helixunterbrechungen bestimmt worden, die maßgeblich an Umlagerungen während des Transportzyklus beteiligt sind. Zumindest in Helix XI scheint der flexible Linker durch zwei bzw. drei Glycine gebildet zu werden (Hunte *et al.*, 2005). Die in  $M_{2C2}$  vorliegenden Glycine (G314, G316, G321, G322, G323) (Abb. 1.3, Tab. 4.1) könnten möglicherweise eine ähnliche Funktion übernehmen und eine Umlagerung der Helices in VaKtrB ermöglichen. Des Weiteren ist auffällig, dass die anderen  $M_2$ -Helices von VaKtrB auch Glycine aufweisen. Allerdings beschränken sich diese eher auf 2-3 Glycine in der cytoplasmatischen Hälfte der Membranhelices, was ungefähr der Verteilung im KcsA-Kanal entspricht. In KcsA bilden diese Glycine einen Knick innerhalb der Helix (Abb. 1.1, Abb. 1.3).

Darüber hinaus zeichnet sich diese Region durch stark veränderte Komplementationsphänotypen von Einzylcysteinvarianten gegenüber dem Wildtyp-KtrB aus (Tab. 4.1). Diese Daten weisen deutlich darauf hin, dass der Abschnitt  $M_{2C2}$  für den aktiven Kaliumtransport wichtiger ist als bislang angenommen wurde (Durell

*et al.*, 2000). Ob diese Region direkt in den aktiven Transport involviert ist oder ob sie nur regulatorische Funktionen ausübt, kann mit den vorliegenden Daten nur indirekt beantwortet werden. Bei der Betrachtung veränderter Komplementationsphänotypen wie z.B. für S319C (Abb. 3.15) scheint es zu einer Disregulation des Transportes zu kommen, nicht jedoch zum Erliegen des aktiven Transports. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass diese Region in beiden Bereichen aktiv ist, da auch komplett inaktive Einzelsysteine vorliegen (Tab. 4.1), die praktisch nicht mehr komplementieren.

Die putative Teilhelix  $M_{2C3}$  wird im Modell von Durell und Guy als  $\alpha$ -Helix interpretiert, die entweder senkrecht zur Membran steht bzw. waagrecht an diese angelagert ist (Abb.1.5, Abb. 4.3). Welche Orientierung hat nun diese putative Helix? Vorherrschend sind neben dem 2D-Arbeitsmodell (Abb. 1.3) die Modelle aus Abbildung 4.3 b und c. In theoretischen Vorarbeiten kann die putative  $M_{2C3}$ -Helix (Abb. 1.4) im „helical wheel“-Modell wiedergegeben (Abb. 4.8) werden. Dabei fällt auf, dass eine eindeutige Verdichtung von hydrophoben Aminosäuren auf einer Seite vorliegt. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass diese Helix mit der lipophilen Seite entweder dem Lipid oder hydrophoben Proteinbereichen zugewandt ist (Abb. 4.8 rote Markierung).



**Abb. 4.8:** „helical wheel“-Modell der putativ an die Membran angelagerten Helix im Bereich von  $M_{2C3}$ . Grau unterlegt sind hydrophobe Aminosäuren. (<http://kael.net/helical.htm>)

In diesem Bereich wurden die Aminosäurepositionen V331C und F333C (N-terminaler Teil von  $M_{2C3}$ ), sowie W337C bis R341C und K343C (C-terminaler Bereich von  $M_{2C3}$ ) untersucht. Die PhoA-Fusionen im Bereich von  $M_{2C3}$ , sowie der nachfolgenden cytoplasmatischen Schleife ergaben für alle Positionen eine Lokalisation im Cytoplasma. Eine Ausnahme stellt, wie schon zuvor erläutert, die Position L340 am Ende von  $M_{2C3}$  dar (Tab. 4.1, Abb. 4.1). Besonders interessant

erweist sich der vordere Bereich dieser putativen Helix, da hier im Abstand von zwei Aminosäuren laut Cysteinzugänglichkeit je eine cytoplasmatische (V331C) und eine periplasmatische (F333C) Position zu finden ist (Abb. 4.5, Tab. 4.1). Bereits der geringe Abstand zwischen den Aminosäuren V331C und F333C wirft die Frage auf, ob und, wenn ja, wie diese Ergebnisse topologisch zu erklären sind. Hinzu kommt noch die starke Einschränkung der Seitenkettenmobilitäten an diesen Positionen (V331R1, F333R1) (Raumtemperatur-ESR-Mobilitätsanalyse rekonstruiert; Abb. 3.28, Tab. 4.1), die auf eine in das Protein eingebundene Struktur hindeuten. Dieses widerspricht der Position V331C im Modell (Abb. 1.5 A, 4.3 c, A, 4.5), in dem diese an einer Helixoberfläche lokalisiert ist, und würde ein Modell, wie es in Abbildung 4.3 b bzw. d zu sehen ist, wahrscheinlicher machen. Zu diskutieren bleibt die Frage, wie die Unstimmigkeiten im Bereich von  $M_{2C2}$  (T318C) und  $M_{2C3}$  (F333C) in dieses Bild passen. Einerseits sind diese Positionen vom Periplasma her zugänglich und andererseits sollte sie laut vorgeschlagener Lokalisation gar nicht oder nur schlecht zugänglich sein. Zudem ist laut PhoA-Fusionstudien zumindest für die Reste G316 (nahe T318) und F333C eine periplasmatische Lokalisation kaum denkbar (Tab. 4.1). Da es unwahrscheinlich ist, dass beide Positionen im Periplasma vorliegen, muss zumindest zeitweise eine wässrige Verbindung zum Periplasma bestehen, um dieses Ergebnis zu erzielen. Daraus ergibt sich die Frage, ob Maleimide in die Kavität des Proteins eindringen können. Die Kavität sollte während des aktiven Transportes für die Maleimide zumindest vom Cytoplasma zugänglich sein, sofern sich die Helices im unteren Bereich aufspannen, wie es im KcsA-Kanal gefunden wurde (Biggin *et al.*, 2002). Die Frage, welches dieser Modelle diese Zugänglichkeiten hervorbringt, kann allerdings nicht mit Gewissheit beantwortet werden (Abb. 1.5 A oder 1.5 C, Abb. 4.3). Dieses würde aber noch nicht erklären, warum eine signifikante Zugänglichkeit vom Periplasma her möglich ist und weshalb die umliegenden Aminosäuren nicht ähnlich auf das Blockierungsmaleimid reagieren. Die Cysteinzugänglichkeiten für die Position V331C (im Vergleich zu F333C und T318C) legen den Schluss nahe, dass nicht die ganze Kavität vom Periplasma her zugänglich ist, da sonst diese nah beieinander liegenden Reste ähnliche Ergebnisse erzielen müssten. Des Weiteren darf das Blockierungsmaleimid nicht in großem Maße aus der Kavität in das Cytoplasma übertreten, da sonst deutlich mehr Positionen signifikant geschützt sein müssten. Das wahrscheinlichste ist, dass das Blockierungsmaleimid durch die Porenregion in die Kavität eindringen kann oder hier während des Reaktionszyklus eine wässrige Verbindung zum Proteininnenraum vom Periplasma aus geschaffen

wird. Da die Struktur der Porenregion ebenfalls nicht aufgeklärt ist, wurden auch für diesen Bereich mehrere Modelle von Durell und Guy (1999) erstellt. Es gibt zwei Ansätze für die Transportwege dieser möglichen Symporter: Entweder erfolgt der Transport durch eine zentrale Pore (Kalium/Natrium bzw.  $H^+$ ), durch die etwaige andere Ionen im Symport aufgenommen werden, oder es gibt neben der zentralen Pore (Kalium) eine sekundäre (Natrium/ $H^+$ ), die den Übergang für ein weiteres Substrat ermöglicht. Als Fazit dieser Ergebnisse muss irgendeine wässrige Verbindung (zumindest zeitweise) vom Periplasma zu begrenzten Teilen des KtrB-Proteininnenraums postuliert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre ein intermediäres Faltungsmodell für  $M_{2C}$ , wie es in Schema d (Abb. 4.3 d) dargestellt ist. Vermutlich würden hierdurch die Aminosäureseitenketten V331C und F333C deutlich stärkeren Interaktionen ausgesetzt sein als im Modell von Durell und Guy (Abb. 1.5 A, Abb. 4.3 c). Fraglich bleibt dennoch, warum die ESR-Zugänglichkeiten ein der Cysteinzugänglichkeit widersprechendes Ergebnis liefern.

Der C-terminale Bereich dieser putativen Helix zeichnet sich durch eine einseitig eingeschränkte Zugänglichkeit für das biotinylierte Maleimid (W337C bis R341C; Tab. 4.1) aus. Diese Sequenz wird durch die zwei sehr gut zugänglichen Positionen T338C und K343C unterbrochen, wobei alles darauf hindeutet, dass letztere das Ende der Helix darstellt, da auch die Mobilität der Aminosäureseitenkette K343R1 ansteigt (vergleiche Abb. 1.5 B zur Lage in der Membran; Abb. 4.3, Abb. 4.5, Abb. 4.8, Tab. 4.1). Gerade in diesem Bereich sind nur unzulängliche Ergebnisse für die Schutzreaktionen in den Cysteinzugänglichkeiten erzielt worden (Abb. 3.18, Abb. 4.5, Tab. 4.1), die nur schwer zu interpretieren waren. Dabei traten in fast allen Fällen moderate Schutzreaktionen auf, bei denen es schwierig zu bestimmen war, ob sie eine Hintergrundreaktion darstellten oder, bedingt durch mangelnde Signalstärke, als signifikant eingestuft wurden. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden wurden diese Daten nicht weiter in die Bewertung aufgenommen. Zusätzlich weisen die ESR-spektroskopischen Ergebnisse darauf hin, dass die Aminosäureseitenkette L340R1 eine im Lipid lokalisierte Position einnimmt (Abb. 3.32, Abb. 4.2; Tab. 4.1). Insgesamt passen die gewonnenen Ergebnisse sehr gut in das Bild einer an die Membran angelagerten Helix. Die eingeschränkten Seitenkettenmobilitäten deuten allerdings auf eine kompaktere Struktur hin (Abb. 3.28, Abb. 4.2, Tab. 4.1) und unterstützen den Vorschlag, dass im Modell die waagerechte Helix näher zum Porenmittelpunkt verschoben liegt und somit deutlich stärkere Interaktionen mit dem restlichen Protein aufweisen dürfte. Wahlweise könnte dieses auch durch ein intermediäres Modell

erreicht werden, wie es in Abbildung 4.3 d gezeigt ist, wobei die Zugänglichkeiten im vorderen Bereich dieser Teilhelix durch die Kavität gewährleistet werden dürften. Die Daten meiner Arbeit zeigen eindeutig, dass es sich nicht um das in Abbildung 4.1 C/1.5C (siehe auch Abb. 4.3 b) dargestellte Modell handeln kann, da das C-terminale Ende von  $M_{2C3}$  nicht in wässriger Umgebung vorliegt. Diese Daten widersprechen darüberhinaus auch einer durchgehenden  $M_{2C}$ -Helix, da diese so lang wäre, dass ihr Ende unter diesen Umständen im Cytoplasma exponiert vorliegen müsste (ähnlicher Effekt wie im Modell Abb. 1.5/4.1 C; Abb. 4.3 a). Es muss aber für alle möglichen Modelle beachtet werden, dass die Position L340 noch Zugang zum Lipid haben muss (ESR, Tab. 4.1), da bei einer vergleichbaren Faltung zum KcsA-Kanal die  $M_2$ -Helices von den  $M_1$  umschlossen werden (Doyle *et al.*, 1998). Für die Untereinheit KdpA der P-Type ATPase wurde ein Modell für die  $M_{2C}$ -Helix vorgeschlagen (Durell *et al.*, 2000), das eine geknickte  $M_{2C1}$ -Helix, die im oberen Teil an die Membran angelagert ist, zeigt.  $M_{2C2}$  und  $M_{2C3}$  bilden in diesem Modell eine durchgehende Helix, die eine Fortführung der  $M_{2C1}$ -Helix darstellt. Dass es sich tatsächlich um eine derartige Konformation handelt, kann nur indirekt widerlegt werden, da die meisten Ergebnisse im periplasmatischen Bereich auf eine dem KcsA-Kanal ähnliche Topologie hindeuten und die  $M_{2C}$ -Helix aller Voraussicht nach keine durchgehende Helix bildet (Abb. 4.7).

Da es sich bei der  $M_{2C}$ -Helix um einen Bereich handelt, der nicht im KcsA-Kanal bzw. in anderen 2TM-Kanälen zu finden ist (Durell und Guy, 1999), könnte dies eine Struktur sein, die den aktiven Transport katalysiert oder die Rolle eines Regulators einnimmt. Durch statistische Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass alle Mitglieder der SKT-Transporterfamilie eine entsprechend konservierte  $M_{2C}$ -Helix haben (Durell und Guy bzw. Durell *et al.*, 1999, 2000). Möglicherweise beruhen die Unterschiede für T318C auf einem Reaktionszyklus und/oder auf verschiedenen Konformationen, die KtrB alleine oder im Komplex einnimmt, da die Cysteinzugänglichkeiten unter anderen Bedingungen durchgeführt wurden als die ESR-Studien. Es wurden für die Cysteinzugänglichkeiten Derivate des von T. Nakamura hergestellten Plasmids pETKtrABH verwendet, welches hinter dem Gen *ktrB* auch das Gen *ktrA* trägt. Frau Nadine Kröning war in der Lage, mit dem von ihr hergestellten anti-VaKtrA-Antikörper nach Expression von KtrB im Stamm C43/pETKtrABH KtrA zu detektieren (persönliche Mitteilung). In der ESR-Spektroskopie hingegen wurde allein KtrB (pEL903-Derivate) für die Untersuchungen eingesetzt. Es ist möglich, dass unterschiedliche Konformationen, die in Abbildung

1.5 bzw. 4.3 b-d vorgestellt wurden, auftreten und damit Teil einer Konformationskaskade sind. Hieraus könnte geschlossen werden, dass die membranständige Untereinheit KtrB alleine eine geringfügig veränderte Konformation (im Vergleich zum Komplex KtrAB) aufweist. Transportversuche von Tholema *et al.* (2005) zeigten, dass isoliertes KtrB Transportgeschwindigkeit verliert und darüber hinaus anfängt, Natrium zu transportieren, was auf einer veränderten Konformation beruhen könnte. Es ist weiter anzunehmen, dass beim Vorhandensein von KtrA gerade in diesen kritischen Bereichen Konformationsänderungen stattfinden, die die unterschiedlichen Aktivitätszustände charakterisieren. Darüber hinaus ist noch nicht geklärt, wie und wo die A-Untereinheit an die B-Untereinheit bindet. Erste Hinweise, die von Inga Hänelt während ihrer Diplomarbeit (2006) gewonnen wurden, weisen darauf hin, dass die Interaktionsstelle im C-terminalen Bereich von KtrB zu finden ist. Des Weiteren schlug Nadine Kröning (Dissertation, 2006) im cytoplasmatischen Bereich hinter  $M_{2D}$  von VaKtrB eine KtrA-Bindestelle vor. Diese könnte möglicherweise von den Aminosäuren E449 und D450 gebildet werden. Betrachtet man die räumliche Nähe des C-Terminus von KtrB zur  $M_{2C}$ -Helix (Abb. 1.5) (im besonderen  $M_{2C3}$ ), so ist eine Interaktion dieser interessanten Region mit dem oktameren KtrA-Ring wahrscheinlich (Abb. 1.5/4.1). Gerade eine mechanische Interaktion, die der für KtrA postulierte „conformational switch“-Mechanismus bereitstellt, könnte an der  $M_{2C}$ -Helix eine Konformationsänderung hervorrufen und so den Transporter aktivieren. Dieses würde wiederum bedeuten, dass  $M_{2C2}$  ein möglicher flexibler Linker ist, der die Bedingungen in der Kavität verändert und so die Aktivität und Transporteigenschaften moduliert. Dabei könnte die  $M_{2C2}$ -Schleife eine mechanische Barriere in der Kavität bilden (Abb. 1.5 C, 4.3 b) und möglicherweise die eingeschränkt aktive Form (ohne KtrA) darstellen. Eine Interaktion von  $M_{2C3}$  mit der RCK/KTN-Domäne könnte einen Konformationswechsel (zu Abb. 1.5 A, Abb. 4.3 b) herbeiführen. Dabei würde die Schleife ( $M_{2C2}$ ) gestreckt werden, wenn die  $M_{2C3}$ -Helix aus einer senkrechten Position in die waagerechte überführt wird. Dies würde die Kavität freigeben und möglicherweise so den Transport vereinfachen, da die Behinderung des Kaliumflusses durch die  $M_{2C2}$ -Struktur aufgehoben wird. Dies dürfte nun die vollständig aktive Konformation darstellen, was wiederum erklären würde, warum bei den einzelnen Ansätzen unterschiedliche Ergebnisse erzielt worden sind. Hinzu kommt, dass beide Modelle energetisch optimiert vorliegen und somit topologisch durchaus vorstellbar sind. Des Weiteren dürfte die Umlagerung der  $M_{2C3}$ -Helix nicht sehr energieaufwendig sein. Eine salzabhängige Topologiedynamik im

Bereich von A286C und T300C wurde in dieser Arbeit untersucht; allerdings zeigen sich keine Effekte. Dies beweist zwar nicht, dass es sie nicht gibt, allerdings ist der periplasmatische Bereich von KtrB vermutlich nur geringen Veränderungen unterlegen (Abb. 3.19 und Abb. 3.20). Grundsätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Faltung der M<sub>2C</sub>-Helix anders ist als alle bisher postulierten Konformationen. Um die Frage nach einer Involvierung der M<sub>2C</sub>-Helix in einen Transport-/Regulationsmechanismus zu klären, wären ESR-spektroskopische Untersuchungen das Mittel der Wahl. Diese Methode bietet durch die kaum invasive Art der Untersuchungen die Möglichkeit, eine Bindung von A an B durch Abstandsmessungen (intermolekular) zu detektieren, sowie mögliche Konformationsänderungen im Kontext dieser Interaktion zu klären (Abstandsmessungen intramolekular: Verschiebung der Helices zueinander). Hierbei könnten Änderungen der Struktur nach Zugabe von KtrA zu rekonstituiertem B direkt verfolgt und dabei Mobilitäten und Zugänglichkeiten für Quenchersubstanzen bestimmt werden. Gerade der Bereich der Transportdynamik ist ein sehr interessanter Ansatzpunkt für die weitere Forschung. Da für keinen der SKT-Transporter ein Transport-/Regulationsmechanismusmodell vorliegt (abgesehen von dem Modell von Durell *et al.*, 2000), besteht hier die Chance, einen großen Beitrag zu leisten. Dass die Region von M<sub>2C</sub> neben ihrer ungewöhnlichen Topologie noch weitere interessante Forschungsfelder bereithält, zeigen die Daten dieser Arbeit deutlich. Selbst eine Kristallstruktur würde u.U. nur eine Momentaufnahme dieser Helix liefern. Und sofern keine Kristallisation im Komplex mit KtrA erfolgt, wäre dieses auch nicht aussagekräftig in Bezug auf die Frage nach der *in vivo* Faltung von KtrB (M<sub>2C</sub>). Die genaue Topologie der M<sub>2C</sub>-Helix in VaKtrB wird durch die Daten dieser Arbeit nur vage bestimmt. Einzelne Hinweise deuten auf eine Topologie, wie sie in Abbildung 1.5 A beschrieben wird, hin. Allerdings legen einige der Daten nahe, dass zum Einen die Modellvorstellungen noch nicht vollständig korrekt sind und zum Anderen die Konformation von KtrB durch KtrA beeinflusst wird. Es ist durchaus möglich, dass die Ergebnisse durch eine vollkommen andere Faltung dieser Helix zustande kommen. Somit bedarf es noch weiterer Topologiestudien in diesem Bereich, die durch Kristallisation und ESR-Spektroskopie erfolgen sollten. Zu den verwendeten Methoden sollte abschließend angemerkt werden, dass die Fusionstechniken wie auch die Cysteinzugänglichkeiten zu ungenau und fehleranfällig sind, um für die Beantwortung der bestehenden Fragestellungen von größerem Nutzen zu sein.

## 5 Literaturverzeichnis

**Albright, R. A.; Vazquez Ibar, J.-L.; Kim, C. U.; Gruner, S. M. and Morais-Cabral, J. H. (2006).** The RCK Domain of the KtrAB K<sup>+</sup> Transporter: Multiple Conformations of an Octameric Ring. *Cell*, 126: 1147-1159

**Altenbach, C.; Froncisz, W.; Hemker, R.; Mchaourab, H. and Hubbell, W. L. (2005).** Accessibility of Nitroxide Side Chains: Absolute Heisenberg Exchange Rates from Power Saturation EPR. *Biophys. J.*, 89: 2103-2112

**Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. (1987, updated 1991).** *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, John Wiley and Sons, New York

**Bakker, E. P. & Mangerich, W. E. (1981).** Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J. Bacteriol.*, 147: 820-826.

**Bakker, E. P. (1993).** Cell K<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport systems in prokaryotes. In: Bakker, E. P. (ed.), Alkali cation transport systems in prokaryotes. *CRC Press, Boca Raton, USA*, 205-276.

**Biggin, P. C. and Sansom, M. S. P. (2002).** Open-State Models of a Potassium Channel. *Biophys. J.*, 83: 1867-1876

**Booth, I. R. (1985).** Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 49: 359-378.

**Boyd, D. & Beckwith, J. (1990).** The role of charged amino acids in the localization of secreted and membrane proteins. *Cell*, 62: 1031-1033

**Bullock, W.; Fernandez, J.; Short, J. (1987).** XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *BioTechniques*, 5: 376-379.

**Buurman, E. T.; Kim, K.-T.; Epstein, W. (1995).** Genetic Evidence for Two Sequentially Occupied K<sup>+</sup> Binding Sites in the Kdp Transport ATPase. *J. Biol. Chem.*, 270: 12, 6678-6685

**Calamia, J.; Manoil, C. (1990).** Lac Permease of Escherichia coli: Topology and Sequence Elements Promoting Membrane Insertion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 87: No. 13, pp. 4937-4941

**Calbiochem (2001).** A Guide to the Properties and uses of Detergents in Biology and Biochemistry

**Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1974).** Conformational parameters for amino acid in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry*, 13: 211-222

**Csonka, L. N. & Epstein, W. (1996).** Osmoregulation. In: Neidhardt, E. C. (ed.). *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology.* ASM Press, 2<sup>nd</sup> ed. Washington DC, 1210-1223.

**Dalbey, R. E. (1990).** Positively charged residues are important determinants of membrane protein topology. *Trends Biochem. Sci.*, 15: 253-257

**Derman, A. I. and Beckwith, J. (1991).** Escherichia coli Alkaline Phosphatase Fails To Acquire Disulfide Bonds When Retained in the Cytoplasm. *J. Bacteriol.*, 173:, No. 23, 7719-7722

**Dinnbier, U.; Limpinsel, E.; Schmid, R.; Bakker, E. P. (1988).** Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.*, 150: 348-357.

**Doyle, D. A. ; Morais-Cabral, J. H.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A. ; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. (1998).** The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, 280: 69-77.

- Dong, J.; Shi, N.; Berke, I.; Chen, L.; and Jiang, Y. (2005).** Structure of the MthK RCK Domain and the Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on Gating Ring Stability. *J. Biol. Chem.*, 280: No. 50, 41716-41724
- Durell, S. R.; Hao, Y.; Nakamura, T.; Bakker, E. P. and Guy, H. R. (1999).** Evolutionary Relationship between  $\text{K}^+$  Channels and Symporters. *Biophys. J.*, 77: 775-778
- Durell, S. R. and Guy, H. R. (1999).** Structural Models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 Symporters Based on the Structure of the KcsA  $\text{K}^+$  Channel. *Biophys. J.*, 77: 789-807
- Durell, S. R.; Bakker, E. P. and Guy, H. R. (2000).** Does the KdpA Subunit from the High Affinity  $\text{K}^+$ -Translocating P-Type KDP-ATPase have a Structure Similar to That of  $\text{K}^+$  Channels? *Biophys. J.*, 78: 188-199
- Epstein, W.; Kim, B. S. (1971).** Potassium transport in loci in Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.*, 108: No. 2, 639-644
- Guzman, L.-M.; Belin, D.; Carson, M. J. and Beckwith, J. (1995).** Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose  $\text{P}_{\text{BAD}}$  Promoter. *J. Bacteriol.*, 177: No. 14, 4121-4130
- Holloway, P.W. (1973).** A Simple Procedure for Removal of Triton X-100 from Protein Samples. *Analytical Biochemistry*, 53: 304-308
- Hubbell, W. L.; Mchaourab, H. S.; Altenbach, C.; Lietzow, M. A. (1996).** Watching proteins move using site-directed spin labeling. *Structure*, 15;4(7):779-783
- Hunte, C.; Screpanti, E.; Venturi, M.; Rimon, A.; Padan, E.; & Michel, H. (2005).** Structure of a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature*, 435, 30: 1197-1202
- Jiang, Y.; Pico, A.; Cadene, M.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. (2001).** Structure of the RCK domain from the *E. coli*  $\text{K}^+$  channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron*, 29: 593-601.

**Jiang, Y.; Lee, A.; Chen, J.; Cadene, M.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. (2002).** Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, 417: 515-522.

**Jung, H.; Rübenhagen, R.; Tebbe, S.; Leifker, K.; Tholema, N.; Quick, M.; Schmid, R. (1998).** Topology of the Na<sup>+</sup>/proline transporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 273: 26400-26407

**Kato, Y.; Sakaguchi, M.; Mori, Y.; Saito, K.; Nakamura, T.; Bakker, E. P.; Sato, Y.; Goshima, S. and Uozumi, N. (2001).** Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the Arabidopsis thaliana Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K<sup>+</sup> transporters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 98: No. 11, 6488-6493

**Klaaßen, A. (2002)** Diplomarbeit: Topologiestudien zu der Domäne MPM<sub>B</sub> des Kaliumtransportsystems KtrB aus *Vibrio alginolyticus*. (Universität Osnabrück)

**Klare, J. P.; Bordignon, E.; Doebber, M.; Fitter, J.; Kriegsmann, J.; Chizhov, I.; Steinhoff, H.-J. and Engelhard, M. (2006).** Effects of Solubilization on the Structure and Function of the Sensory Rhodopsin II/Transducer Complex. *J. Mol. Biol.*, 356: 1207-1221

**Koch, S. (2003)** Bachelorarbeit: Topologiestudien der Domäne MPM<sub>D</sub> der B-Untereinheit des Kaliumtransporters KtrAB aus *Vibrio alginolyticus* (Universität Osnabrück)

**Kröning, N.; Willenborg, M.; Tholema, N.; Hänel, I.; Schmid, R. and Bakker, E. P. (2007).** ATP Binding to the KTN/RCK Subunit KtrA from the K<sup>+</sup>-uptake System KtrAB of *Vibrio alginolyticus*: ITS ROLE IN THE FORMATION OF THE KtrAB COMPLEX AND ITS REQUIREMENT IN VIVO. *J.B.C.*, in press.

**Kröning, N. (2006)** Dissertation: Nukleotidbindung an KtrA, der cytoplasmatischen Untereinheit des K<sup>+</sup>-Aufnahmesystems KtrAB aus *Vibrio alginolyticus* (Universität Osnabrück)

**Krulwich, T.; Guffanti, A.; Seto-Young, D. (1990).** pH homeostasis and bioenergetic work in alcalophiles. *FEMS Microbiol. Rev.*, 75: 271-278.

**Kyte, J. and Doolittle, R. (1982).** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.

**Larsen, P. I.; Sydnnes, L. K.; Landfald, B.; Strom, A.R. (1987).** Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acids and trehalose. *Arch. Microbiol.*, 147(3): 1-7

**Lasch, J. (1995).** Interactions of detergents with lipid vesicles. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1241: 269-292

**Lévy, D.; Bluzat, A.; Seigneuret, M. and Rigaud, J.-L. (1990).** A systematic study of liposome and proteoliposome reconstitution involving Bio-Bead-mediated Triton X-100 removal. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1025: 179-190

**Lévy, D.; Gulik, A. ; Seigneuret, M. and Rigaud, J.-L. (1990).** Phospholipid Vesicles Solubilization and Reconstitution by Detergents. Symmetrical Analysis of the Two Processes Using Octaethylene Glycol Mono-n-dodecyl Ether. *Biochemistry*, 29: 9480-9488

**Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. (1989).** Molecular Cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.

**Mäser, P.; Hosoo, Y.; Goshima, S.; Horie, T.; Eckelman, B.; Yamada, K.; Yoshida, K.; Bakker, E. P.; Shinmyo, A.; Oiki, S.; Schroeder, J. I.; Uozumi, N. (2002).** Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 6428-6433

**Mayer, L. D.; Hope, M. J.; Cullis, P.R. (1986).** Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. et Biophys. Acta*, 13:858(1),161-168

**Mchaourab, H.S.; Lietzow, M.A.; Hideg, K.; Hubbel, W. L. (1996).** Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme. Correlation with protein structure and dynamics. *Biochemistry*, 18: 35(24),7692-7704

**McLaggan, D.; Naprstek, J.; Buurman, E. T.; Epstein, W. (1994).** Interdependence of K<sup>+</sup> and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 269: 1911-1917.

**Meerman, H. J. and Georgiou, G. (1994).** Construction and characterization of a set of *E. coli* strains defective in all known loci effecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Bio/Technology*, 12: 1107-1110

**Meury, J.; Robin, A.; Monnier-Champeix, P. (1985).** Turgor-controlled K<sup>+</sup> fluxes and their pathways in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 151: 613-619

**Michaelis, S.; Inouye, H.; Oliver, D. and Beckwith, J. (1983).** Mutations That Alter the Signal Sequence of Alkaline Phosphatase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 154: No.1, 366-374

**Miller, J.H. (1992):** A short course in bacterial genetics, *CSHL Press*

**Miroux, B.; Walker, J. E. (1996).** Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.*, 19: No. 260(3), 289-98.

**Nakamura, T.; Tokuda, H. and Unemoto, T. (1984).** K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> antiporter functions as a regulator of cytoplasmic pH in a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 776: 330-336

**Nakamura T.; Kawasaki, S.; Unemoto, T. (1992).** Roles of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in pH homeostasis and growth of the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 1271-1276.

- Nakamura, T.; Matsuba, Y.; Yamamuro, N.; Booth, I. R.; Unemoto, T. (1994).** Cloning and sequencing of a K<sup>+</sup> transport gene (*trkA*) from the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1219: 701-705
- Nakamura, T.; Yuda, R.; Unemoto, T. and Bakker, E. P. (1998).** KtrB, a New Type of Bacterial K<sup>+</sup>-Uptake System from *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.*, 180: No. 13, 3491-3494
- Novy, R.; Drott, D.; Yaeger, K.; Mierendorf, R. (2001).** Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Innovations*
- Pfeiffer, M.; Rink, T.; Gerwert, K.; Oesterhelt, D. and Steinhoff, H.-J. (1999).** Site-directed Spin-labeling Reveals the Orientation of the Amino Acid Side-chains in the E-F Loop of Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.*, 287, 163-171
- Pi, J. and Pittard, A. J. (1996).** Topology of the Phenylalanine-Specific Permease of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 178: No.9, 2650-2655
- Pyka, J.; Illnicki, J.; Altenbach, C.; Hubbell, W. L. and Froncisz, W. (2005).** Accessibility and Dynamics of Nitroxide Side Chains in T4 Lysozyme Measured by Saturation and Recovery EPR. *Biophys. J.*, 89: 2059-2068
- Rigaud, J.-L.; Pitard, B.; Levy, D. (1995).** Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application energy-transducing membrane proteins. *Biochim. et Biophys. Acta*, 231: 223-246
- Roosild T. P.; Miller, S.; Booth, I. R.; Choe, S. (2002).** A mechanism of regulating transmembrane potassium flux through a ligand-mediated conformational switch. *Cell*, 109: 781-791.
- Rose, A. (2004)** Diplomarbeit: Topologie-Untersuchungen der C-Domäne von Untereinheit KtrB des Kaliumtransporters Ktr aus *Vibrio alginolyticus* (Universität Osnabrück)

**Sambrook J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, Cold Spring Harbour, New York, USA.

**Savitsky, A.; Kühn, M.; Duché, D.; Möbius, K. and Steinhoff, H.-J. (2004).** Spontaneous Refolding of the Pore-Forming Colicin A Toxin upon Membrane Association As Studied by X-Band and W-Band High-Field Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.*, 108: 9541-9548

**Schlösser A.; Hamann, A.; Bossemeyer, D.; Schneider, E.; Bakker, E. P. (1993).** NAD<sup>+</sup> binding to the *Escherichia coli* K<sup>+</sup>-uptake protein TrkA and sequence similarity between TrkA and domains of a family of dehydrogenases suggest a role for NAD<sup>+</sup> in bacterial transport. *Mol. Microbiol.*, 9: 533-543.

**Schmidt, U.; Chmel, H. and Cobbs, C. (1979).** *Vibrio alginolyticus* Infections in Humans. *J. of Clinical Microbiol.*, 10: No. 5, 666-668

**Schrempf, H.; Schmidt, O.; Kümmerlen, R.; Hinnah, S.; Müller, D.; Betzler, M.; Steinkamp, T. and Wagner, R. (1995).** A prokaryotic potassium ion channel from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.*, 14: No. 21, 5170-5178

**Steinhoff, H.-J.; Pfeiffer, M.; Rink, T.; Burlon, O.; Kurz, M.; Riesle, J.; Heuberger, E.; Gerwert, K. and Oesterhelt, D. (1999).** Azide Reduces the Hydrophobic Barrier of the Bacteriorhodopsin Protein Channel. *Biophys. J.*, 76: 2702-2710

**Steinhoff, H.-J. (2002).** Methods for study of Protein Dynamics and Protein-Protein Interaction in Protein Ubiquitination by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Frontiers in Bioscience*, 7: C97-110

**Stewart, G. S.; Lubinsky-Mink, S.; Jackson, C. G.; Cassel, A. and Kuhn, J. (1986).** pHG165:A pBR322 Copy Number Derivative of pUC8 for Cloning and Expression. *Acad. Press PLASMID*, 15: 172-181

**Stumpe, S.; Schlösser, A.; Schleyer, M.; Bakker, E. P. (1996).** K<sup>+</sup> circulation across the prokaryotic cell membrane: K<sup>+</sup> uptake systems. In: Konings, W.N.,

---

Kaback, H.R. and Lolkema, J.S., (eds.), *Handbook of biological physics*, 2: 473-499, Elsevier Science, Amsterdam.

**Stumpe, S.; Bakker, E. P. (1997).** Requirement of a large K<sup>+</sup>-uptake capacity and of extracytoplasmic protease activity for protamine resistance of *Escherichia coli*.

*Biomedical and Life Sciences*, 167: 2-3, 126-136

**Tholema, N.; Uozumi, N.; Mäser, P.; Nakamura, T.; Schroeder, J. I.; Kobayashi, H.; Bakker, E. P. (2002).** All four putative selectivity filter glycine residues in KtrB are essential for high affinity and selective K<sup>+</sup>- uptake via the KtrAB system from *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.*, 280(50): 41146-41154

**Tholema, N. (2002)** Dissertation: KtrB, die K<sup>+</sup>-translozierende Untereinheit des K<sup>+</sup>-Aufnahmesystems KtrAB aus *Vibrio alginolyticus*: Analyse der Selektivitätsfilter-Glycinreste und der Topologie. (Universität Osnabrück)

**Tholema, N.; Vor der Brüggen, M.; Mäser, P.; Nakamura, T.; Schroeder, J. I.; Kobayashi, H.; Uozumi, N. and Bakker, E. P. (2005).** All Four Putative Selectivity Filter Glycine Residues in KtrB Are Essential for High Affinity and Selective K<sup>+</sup> Uptake by the KtrAB System from *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.*, 280: No. 50, 41146-41154

**Thompson, F. L.; Iida, T. and Swings, J. (2004).** Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 68: No. 3, 403-431

**Tokuda, H.; Nakamura, T.; Unemoto, T. (1981).** Potassium ion is required for the generation of pH-dependent membrane potential and pH by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Biochemistry*, 20: 4198-4203.

**UH, Y.; Park, J.-S.; Hwang, G.-Y.; Jan, I.-H.; Yoon, K.-J.; Park, H.-C.; Hwang, S.-O. (2001).** *Vibrio alginolyticus* acute gastroenteritis: Report of two cases. *Clin. Microbiol. Infect.*, 7 (2): 103-106

**Unemoto, T.; Tokuda, H.; Hayashi, M. (1990).** In: Krulwich, T. A., (ed.), *Bacterial Energetics*, 33-54 Academic Press, San Diego, CA.

**Uozumi, N.; Nakamura, T.; Schroeder, J. I. and Muto, S. (1998).** Determination of transmembrane topology of an inward-rectifying potassium channel from *Arabidopsis thaliana* based on the functional expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 9773-9778

**von Heijne, G. (1986).** The Distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J.*, 5: No. 11, 3021-3027

**von Heijne, G. (1992).** Membrane Protein Structure Prediction: Hydrophobicity Analysis and the Positive-inside Rule. *J. Mol. Biol.*, 225: 487-494

**von Heijne, G. & Manoil, C. (1990).** Membrane proteins – from sequence to structure. *Protein Eng.*, 4, 109-112

**Willenborg, M. (2003).** Diplomarbeit: Die Untereinheit KtrA des K<sup>+</sup>-Aufnahmesystems KtrAB aus *Vibrio alginolyticus*. (Universität Osnabrück)

**Zeng, G.-F.; Pypaert, M. and Slayman, C. L. (2004).** Epitope Tagging of the Yeast K<sup>+</sup> Carrier Trk2p Demonstrates Folding That Is Consistent with a Channel-like Structure. *J. Biol. Chem.*, 279: No. 4, 3003-3013

**Zeppenfeld, T.; Larisch, C.; Lengeler, J. W.; Jahreis, K. (2000).** Glucose Transporter Mutants of *Escherichia coli* K-12 with Changes in Substrate Recognition of IICB<sup>Glc</sup> and Induction Behavior of the *ptsG* Gene. *J. Bacteriol.*, 182: No. 16, 4443-4452

**Zhou, Y.; Morais-Cabral, J. H.; Kaufman, A. & MacKinnon, R. (2001).** Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, 414, 43-48

**Zulkifli, L. and Uozumi, N. (2006).** Mutation of His-157 in the Second Pore Loop Drastically reduces the Activity of the *Synechocystis* Ktr-Type Transporter. *J. Bacteriol.*, 188: No. 22, 7985-7987

## 6 Publikationen

**Tholema, N.; Vor der Brüggen, M.; Mäser, P.; Nakamura, T.; Schroeder, J. I.; Kobayashi, H.; Uozumi, N. and Bakker, E. P. (2005).** All Four Putative Selectivity Filter Glycine Residues in KtrB Are Essential for High Affinity and Selective K<sup>+</sup> Uptake by the KtrAB System from *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.*, 280: No. 50, 41146-41154

## Anhang

Alignment von KtrB aus *Vibrio alginolyticus* und *Aquifex aeolicus*: Erstellt mit Multalign und dargestellt mit Genedoc.

```

                *           20           *           40           *           60           *
VaKtrB   : MTQFHQRGVFVYVDPGKRDKAKGCEPRILLLSFLGLVLLSAVLLTLPVFSVSGLSITDALFTATSAISVTGLGVVDTG : 77
Aaaq1504 : -----MVKKLNPSRLLLESFSLILLVGALLLYLPISTTRFISEDDALFTATSAVTVTGLAVLDTY : 60
Consensus : -----dkaKgnepRiilLlSFlgllLpgALLLELl!fstrgisilDALFTATSA!sVTGLavlDTg : 58
                dkaKgnepRi6LlSFlg66LpgA6LlLlP f3trg68ilDALFTATSA 3VTGLav6DTg

                80           *           100          *           120          *           140          *
VaKtrB   : QHFTLAGKILLMCLMQLGGLGQMTLSVLLLYMEGVRLSLRQQAALAKEALGOERCVNLRRLVKKIVTFALVAEATGFV : 154
Aaaq1504 : SDFTLFGKLVILFLIQVGLGMYMTLSTEFLVLLGRRIGLKERLLLABSLEYPSMHGLIRFLKRVFSEFVEITELTCAI : 137
Consensus : qdFTLaGKiliScliQVGLGQMTLSafllySlCrRiGLr#raiaaaEaLeqerqhnLrRllKr!fsFal!aEaiGal : 128
                qdFTLaGK666 cL6Q GGLGQMTLSaflly lGrR6gL4 ra6aaBaLeqerqhnLrRl6K4 f3Fal aEaiGa

                160          *           180          *           200          *           220          *
VaKtrB   : FLSYRWVPEMGNCTGMFYALFHSISAFNNAGFALFSDSMMSFVNDPLVSTFLAGLFLPGLGLFTVIGDWRHWKRGF : 231
Aaaq1504 : LLSI-YFSLKGVEDPVFNGIFHSVSAPNNAGFSTFKNGLLDFEGDLFVNLVISELIIIGGIGFVVDNDIYLWYTKKV : 213
Consensus : lLSi-wfpekGw#dgmFnaiFHS!SAFNNAGFAlFk#g$$dfrndllVnltiagLilIGGiGFV!nd!wrhwKgf : 197
                lLSi 5fpekGw dg6Fna6FHS SAFNNAGFAlFk g dFrndllVnl6agLilIGG6GFV nd 5rh5rKgf

                240          *           260          *           280          *           300
VaKtrB   : HFLHHHTKIMLIATELLLLVGTVLFWLLERHNPNMTGSIITTCGQWLAAEFQSSASARTAGFNSVDLTQETOPALIM : 308
Aaaq1504 : PRLSVHTKLVNITSVLLLLGLTVGLIFTEFGNYKGLWQYDWYERILSSMFMSVSSRTAGFSTVDLIDWSESSQFLLM : 290
Consensus : hrLh!HTKim$IaspLLlLlLGTVglillErgNpng$gqldtgeriLaa%FqSaSaRTAGFnsVDLi#ms#paqli$ : 267
                hrLh HTK66 Ia3pLL6L6GTVglillErgNpng gqldtgeriLaa FqSaSaRTAGFn3VDLi m3 paql6 6

                *           320          *           340          *           360          *           380
VaKtrB   : VMLLIGAGSTSTGGGIRVSTFAVAFMATWTFLRQKKHVVMFKRTVNWPTVTRSLAIIVWSGAILTTAMFLMLTEKA : 385
Aaaq1504 : ILMFIGASPGGTGGGIKTTFVWILLIAYYSFVRGREQSVIFERSVPESTIKKALVILSLSIFEFNFVNLMLDKENK : 367
Consensus : lMLLIGAgpggTGGGIKtsTFaValiAtwsFlRgreqsViFeRsVnepT!kKaLaIislSgailinfanl$LDlFEna : 341
                LmLIGAgpggTGGGIKt3TFaVal6At53F6Rq4eqsV6FeR3VnepT kKaLaI6s6Sgai6nfanl LdlfEna

                *           400          *           420          *           440          *           460
VaKtrB   : SFDKVMFETISAFATVGLTAG-----LTABELSEPGRYIMIVMIIIGRIGPLTAYMLA-RPEETLIKYPEDTVLTG : 455
Aaaq1504 : DFLYTMFEVVSARSTVGLSIGNPEGLSECADRSSELGRVVIITMLVGRGLLGFALALTRSEWQRIKYPEARILV- : 443
Consensus : dFdktMFEt!SAFaTVGL3ag-----lca#lSelGKlilitmi!GRiGlgLAlaLa-RpEpqriKYPEarLl- : 404
                dFdktMFEt SAFaTVGL3ag lca lselGKi 6I tm6 GR6GiLg1AlaLa RpEpqriKYPEar Lt

```

---

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Evert P. Bakker bedanken, da er es mir ermöglichte, meine Dissertation in seinem Labor durchzuführen. Ich danke auch sehr herzlich dafür, dass ich viele Tagungen besuchen durfte und seine Tür für mich immer offen stand.

Prof. Dr. Heinrich Jung möchte ich für die Übernahme des Co-Referats herzlich danken sowie für die Mühen, die er auf sich genommen hat, um meiner Verteidigung beizuwohnen (und für die hilfreichen Tips, die von ihm oder aus seinem Labor kamen).

Herrn Prof. Dr. K. Altendorf danke ich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meine Promotion durchführen zu können.

Ich möchte mich herzlich bei Eva für die tiefen Einblicke in die Geheimnisse der Fermentation, die tiefschürfenden Diskussionen über „Gott und die Welt“ und die vielen vielen Auskünfte während meiner Dissertation bedanken.

Natürlich sind hier noch Nadine und Corinna zu erwähnen, die doch eine lange Zeit in Labor 118 mit mir zusammen die Bürde der Promotion getragen haben. Danke Euch beiden. Habe sehr viel mit Euch gelacht und diskutiert (und werde das hoffentlich auch weiterhin tun). Dabei darf ich natürlich auch Inga nicht vergessen, die sozusagen zumindest im groben meine Nachfolgerin wird. (Danke)

Ich danke sämtlichen Mitgliedern in Labor 118 (aktuelle und ehemalige), die ich vor und während meiner Promotion kennenlernen durfte, für die witzige Zeit.

Liebe Meike, Dir möchte ich ganz besonders für Deine Einsatzbereitschaft und die Motivation, für meine Dissertation Überstunden zu machen, danken. Ohne Dich hätte ich diese Promotion wahrscheinlich nicht fertiggestellt. Bleib wie du bist!

Herrn Prof. Dr. H.-J. Steinhoff schulde ich zum Einen herzlichen Dank dafür, dass sämtliche ESR-Messungen in seiner Arbeitsgruppe Makromolekülstruktur durchgeführt werden durften und zum Anderen für die aufschlussreichen Diskussionen über die ESR-Spektroskopie und über meine Ergebnisse.

Henrik (Der Finne) hat meinen Dank verdient, da er im Geiste einer der wenigen in der Mikrobiologie ist, der meinen Musikgeschmack teilte! Äh und für die Hilfe in Bezug auf Modellierungsfragen natürlich auch.

Und diese Leute dürfen nicht fehlen: Alex, Sabrina und Ödel (Axel)! Danke für die gute Zusammenarbeit. Eure Arbeiten haben meine erst abgerundet!

Ein besonderer Dank fällt noch den Korrekturen meiner Arbeit zu, da sie meine BWS ertragen mussten. Heiko, Inga (hier hätte noch was anderes gestanden, aber Inga wollte nicht!), Meike und Gizi.

Danke an alle Mitarbeiter (natürlich auch ehemalige) der Arbeitsgruppe Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft, die witzigen Jahre und den großen Spaß, den ich während meiner Dissertation und den Mikrobiologieexkursionen hatte.

Ein Dank geht noch in die Tierphysiologie, die Arbeitsgruppe, in der ich meine Diplomarbeit gemacht habe. Hier wurde ich immer mit offenen Armen empfangen.

Ich möchte meinen vielen Freunden und Bekannten danken, die mein Leben so sehr bereichert haben. Hier Namen aufzuzählen wäre eine schwierige und langwierige Aufgabe, da ich immer irgendjemanden vergessen oder nicht gerecht würde. Danke Euch allen! Ihr wisst schon, was ich meine!

Meinen Eltern Inge und Günter danke ich besonders herzlich, da Sie mir diese Promotion ermöglicht und mit dem Rest meiner Familie (meinem Bruderherz und Gizi) den Rückhalt gegeben haben, den ich benötigt habe, diese Promotion fertigstellen zu können.

Ich danke auch Epic Games für das Veröffentlichen der Spiele Unreal Tournament, UT2k3 und 2k4 und die vielen Bekanntschaften/Freundschaften, die ich durch dieses Computerspiel gewonnen habe (und nein, ich bin noch nicht Amok gelaufen).

Aber wenn ich Goethe zitieren darf:

**Leider läßt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.**

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832), dt. Dichter

## Lebenslauf

Name: **Vor der Brüggen**

Vorname: **Marc**

Geburtsdatum: 18.10.1975

Geburtsort: Osnabrück

Familienstand: ledig

### Schulischer Werdegang:

1982-1986 Grundschule Hesepe

1986-1988 Orientierungsstufe Innenstadt Bramsche

1988-1995 Greselius Gymnasium Bramsche

Mai 1995 **Allgemeine Hochschulreife/Abitur**

### Studium:

1995 Beginn des Studienganges **Diplom-Biologie** an der  
Universität Osnabrück zum Wintersemester

August 1997 Diplom-Vorprüfung

Juni 2001 Abschluss des Studiums ⇒ **Diplom-Biologe**  
(Diplomarbeit in der Abteilung **Tierphysiologie** bei  
Herrn Prof. Dr. H. Wiczorek) mit dem Titel:  
**“Gewebspezifische Expression von V-ATPase Untereinheiten“**

Januar 2002 Beginn der **Promotion** in der Abteilung **Mikrobiologie** von  
Herrn Prof. Dr. K.H. Altendorf bei Herrn Prof. Dr. E.P. Bakker  
(Finanziert durch den SFB431)

---

**Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise entgeltlich/unentgeltlich geholfen.

Die ESR-spektroskopischen Messungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-J. Steinhoff „Experimentalphysik Makromolekülstruktur“, Fachbereich Physik der Universität Osnabrück von Dipl.-Phys. Meike A. Döbber durchgeführt. Alle in dieser Arbeit gezeigten Spektren wurden mit Gerätschaften der AG Steinhoff aufgenommen, dokumentiert und anschließend in erster Instanz unentgeltlich bewertet. (Involvierte Personen: Prof. Dr. H.-J. Steinhoff und Dipl.-Phys. Meike A. Döbber)

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

(Ort, Datum)

---

(Marc Vor der Brüggen)