



Funktionale Charakterisierung des ABC- Transporters LmrA aus *L. lactis*

Masterarbeit

eingereicht von

Justin Schmitz

aus Hilden

Erstgutachter: Prof. Dr. Lutz Schmitt
Institut für Biochemie, Abteilung für Membrantransport
Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf

Zweitgutachter: PD Dr. Ulrich Schulte
Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe Mitochondrienbiogenese
Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf

Düsseldorf 2007

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis | 2 |
| 1 Zusammenfassung | 4 |
| 2 Einleitung | 6 |
| 2.1 Transport und Transporter | 6 |
| 2.1.1 Die ABC-Transporter | 7 |
| 2.1.2 „Multidrug resistance“ | 10 |
| 2.1.3 LmrA | 11 |
| 2.2 Unnatürliche Aminosäuren | 11 |
| 2.3 Ziel der Arbeit | 15 |
| 3 Material und Methoden | 16 |
| 3.1 Materialien | 16 |
| 3.1.1 Biologische Materialien, Plasmide und Oligodesoxynukleotide | 16 |
| 3.1.2 Enzyme und sonstige Proteine | 18 |
| 3.1.3 Chemikalien, Standards und Kits | 19 |
| 3.1.4 Medien, Puffer und sonstige Stammlösungen | 19 |
| 3.2 Bioinformatische Methoden | 22 |
| 3.2.1 Software | 22 |
| 3.2.2 Generierung von Homologiemodellen | 22 |
| 3.2.3 Bioinformatische Analyse von LmrA | 22 |
| 3.3 Molekularbiologische Arbeiten | 23 |
| 3.3.1 Transfer der für LmrA codierenden Sequenz vom <i>L. lactis</i> Vektor pNHLmrA in die <i>E. coli</i> Vectorsystems pET16, pET28 und pBad | 23 |
| 3.3.2 Erstellung der Expressionsstämme | 25 |
| 3.3.3 Mutagenese mit Hilfe des QuikChange [®] II XL Site-Directed Mutagenesis Kits | 27 |
| 3.3.4 Allgemeine Methoden | 28 |
| 3.4 Proteinchemische Methoden | 29 |
| 3.4.1 Expression von LmrA in <i>E. coli</i> | 29 |
| 3.4.2 Zellernte und Präparation der Cytoplasmamembran | 30 |
| 3.4.3 Reinigung von LmrA aus Cytoplasmamembranen | 30 |
| 3.4.4 Quantitative und qualitative Analysen von Proteinen | 31 |
| 4 Ergebnisse | 34 |
| 4.1 Homologiemodell von LmrA | 34 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.2 | Verifizierung des Modells mit biochemischen Daten | 39 |
| 4.3 | Selektion erfolgversprechender Mutanten zur Untersuchung der Substratbindungsstelle von LmrA..... | 41 |
| 4.4 | Etablierung der heterologen Expression von LmrA in <i>E. coli</i> | 42 |
| 4.5 | Generierung der LmrA Mutanten und ihre Expression | 43 |
| 4.6 | Aufreinigung von LmrA aus <i>E. coli</i> | 45 |
| 5 | Diskussion | 47 |
| 5.1 | Das Homologiemodell von LmrA..... | 47 |
| 5.2 | Auswahl weiterer Aminosäure-Reste zur Lokalisation der Substratbindungsstelle | 50 |
| 5.3 | Heterologe Expression von LmrA und Einbau unnatürlicher Aminosäuren | 51 |
| 5.4 | Reinigung von LmrA aus <i>E. coli</i> | 53 |
| 6 | Ausblick | 55 |
| 7 | Anhang..... | 56 |
| 7.1 | Plasmid Karten | 56 |
| 7.1.1 | pBadLmrA | 56 |
| 7.1.2 | pEt16aLmrA | 57 |
| 7.1.3 | pET28bLmrA..... | 58 |
| 7.2 | Modellerskripte | 59 |
| 7.2.1 | make_model.py..... | 59 |
| 7.3 | Referenzen..... | 60 |

1 Zusammenfassung

ABC-Transporter sind primär aktive Transporter, deren Aufgabe in der Regel darin besteht, unter dem Transport unterschiedlicher Substrate über biologische Membranen zu kanalisieren. Für die ATP-Bindung und Hydrolyse liegen überzeugende Modelle vor die durch strukturelle und funktionelle Daten gestützt werden. Der Transport hingegen ist weitgehend unverstanden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher ein System etabliert werden, um der Substratbindungsstelle des MDR-Exporters LmrA aus *L. lactis* zu charakterisieren, wodurch tiefergehende Einblicke in den Transportprozess möglich wäre.

Die vorliegende Arbeit unterteilt sich in zwei wesentliche Bereiche. Zum Einen die Homologiemodellierung von LmrA auf Basis der Struktur des ABC-Transporters Sav1866. Zum Anderen die Etablierung der Expression von LmrA, welches mit unnatürlichen Aminosäuren markiert ist. Hierzu wurde ein von der Gruppe von Professor Schultz (Scripps Research Institute, La Jolla, California USA) entwickeltes System zur Erweiterung des genetischen Kodes verwendet.

Auf Grundlage der signifikanten Homologie der beiden ABC-Transporter LmrA und Sav1866 wurde ein Homologiemodell für LmrA erstellt, welches biochemische Daten bezüglich Topologie und Funktion schlüssig erklären kann. Die in der Literatur wichtigsten Aminosäuren für die Transportfunktion von LmrA, aber auch seines humanen Homologen P-gp (ABCB1), liegen in der Transmembranhelix 6. Die TM6 ragt im Homologiemodell in den Hohlraum zwischen den beiden Hälften des Transporters. Diese exponierte Lage unterstreicht die Bedeutung für den Transportprozess von LmrA. Auf Grund dessen wurde die Suche nach der Substratbindungsstelle von LmrA in der TM6 begonnen. Hierzu wurden entlang der gesamten Helix 16 Positionen für Mutanten gewählt, die helfen sollten die Substratbindungsstelle mit spektroskopischen Verfahren zu lokalisieren.

Für die Untersuchungen der Substratbindungsstelle von LmrA sollte das Protein spezifisch mit unnatürlichen Aminosäuren modifiziert werden. Um dies zu realisieren, wurde die Expression von LmrA in *E. coli* etabliert, da nur für diesen Organismus das System zum Einbau unnatürlicher Aminosäuren durch Amber Stopp Kodons zur Verfügung stand. Im Anschluss wurden die Mutanten in der TM6 erzeugt und ihr Expression gezeigt. Abschließend wurden die Grundzüge einer Reinigung des modifizierten Proteins etabliert.

Zusammenfassend hat diese Arbeit die Grundlagen für die gezielte Untersuchung der Substratbindungsstelle des ABC-Transporters LmrA aus *L. lactis* geschaffen und stellt die Basis für eine Vielzahl von Experimenten zum Verständnis des Transportprozesses von LmrA dar.

2 Einleitung

Membranen grenzen Zellen von ihrer Umgebung ab und ermöglichen so erst die Entstehung biologischen Lebens, wie wir es heute kennen. Durch ihre Funktion als Diffusionsbarriere, werden Substanzen lokal in so hohen Konzentrationen angereichert, dass enthalpisch benachteiligte Reaktionen ablaufen können. Die Kompartimentierung führt zu unterschiedlichen Milieus zwischen der Zelle und ihrer Umgebung oder zwischen einzelnen Zellkompartimenten und kann zur Energiegewinnung oder für die Trennung katabolischer Vorgänge verwendet werden. Als hydrophobe Barrieren stellen Membranen eine massive Permeabilitätsgrenze dar. Nur wenige Stoffe, wie z.B. Sauerstoff sind in der Lage frei von einem Kompartiment ins nächste zu diffundieren. Für viele andere biologisch wichtige Substanzen wie Salze oder Zucker, aber auch Biopolymere wie Proteine, stellen sie eine fast unüberwindliche Barriere dar. Gerade dies wird jedoch ausgenutzt um Energie in Form von Gradienten zu speichern und diese für metabolische Prozesse, aber auch die selektive Aufnahme bestimmter Substanzen in die Zelle, bereit zu stellen. Um diese Gradienten zu erzeugen, existieren in allen Reichen des Lebens eine Vielzahl an Transportern.

2.1 Transport und Transporter

Transporter sind ubiquitäre Membranproteine mit einer großen Variabilität in Bezug auf ihre Struktur und Funktion. Ein Teil von ihnen ist in der Lage Substanzen entgegen eines Konzentrationsgradienten zu transportieren. Da dies unter Verbrauch von Energie, wie z.B. Adenosintriphosphat (ATP) geschieht, werden sie auch aktive Transporter genannt. Dies unterscheidet sie grundlegend von Kanälen und Poren. Die Funktion, dieser auch passive Transporter genannten Membranproteine, beruht allein auf qualitativer und quantitativer Selektion/Regelung der Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten.

Aktive Transporter lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die Erste, die so genannten sekundär aktiven Transporter, nutzen den Fluss von Substanzen entlang eines Konzentrationsgradienten aus, indem sie diesen an den Transport von anderen Substanzen entgegen ihres Konzentrationsgefälles koppeln. Die Energie für diesen Transport steckt in dem Konzentrationsgradienten der diesem folgenden Substanz. Die Erzeugung solcher energiereichen Konzentrationsgefälle durch Einsatz der

allgemeinen Energiewährung ATP, ist eine der Aufgaben der primär aktiven Transporter. Primär aktive Transporter nutzen die im ATP gespeicherte Energie um Transportprozesse entgegen eines Konzentrationsgefälle zu ermöglichen. Ihre Transportsubstrate reichen von kleinen Ionen, über polare Substanzen wie Zucker oder hydrophobe wie Lipide, bis hin zu Proteinen von 800kDa.

Eine der größten Familien der primär aktiven Transporter sind die ABC- (ATP-binding-casste) Transporter (Higgins 2003).

2.1.1 Die ABC-Transporter

ABC-Transporter sind integrale Membranproteine und von Bakterien bis zum Menschen in allen Bereichen des Lebens zu finden. So weit verbreitet sie sind, so variabel sind auch ihre Aufgaben. Sie reichen von der Aufnahme von Ionen, Nährstoffen oder Osmoprotektoren, über den Export von Xenobiotika (MDR) bis zum Transport ganzer Proteine über Membranen (Holland und Blight 1999; Holland et al. 2005). Allerdings gibt es auch Beispiele, in denen für sie eine regulatorische anstelle einer transportierenden Funktion diskutiert wird (Hanrahan et al. 2002; Matsuo et al. 2003).

Man kann ABC-Transporter in zwei Unterklassen unterteilen, in Importer und Exporter (Abbildung 2). ABC-Exporter kommen in allen Reichen des Lebens vor, wohingegen Importer bis jetzt nur in Bakterien und Archaeen beschrieben wurden.

Der Grundbauplan eines ABC-Transportes ist jedoch unabhängig von der Transportrichtung immer gleich. Er besteht aus einem membranständigen Teil, der Transmembrandomäne (TMD) und einem cytosolischen Teil, der Nucleotidbindedomäne (NBD). Ein funktionaler ABC-Transporter besteht aus vier Domänen (je zwei NBDs und zwei TMDs), deren Domänen auf verschiedenste Weisen kombiniert werden können. Wichtige Kombinationen bilden sogenannte Halfsize-Transporter (z.B. LmrA, van Veen et al. 1996), bei dem jeweils eine TMD und eine NBD in einer Polypeptidkette fusioniert sind, so wie sogenannte Fullsize-Transporter (z.B. MDR1, Juliano und Ling 1976) bei denen der komplette Transporter auf einer Polypeptidkette lokalisiert ist. Jedoch wurde bei ABC-Transportern auch jede andere Kombination der Verknüpfung der Domänen gefunden (siehe Abbildung 1).

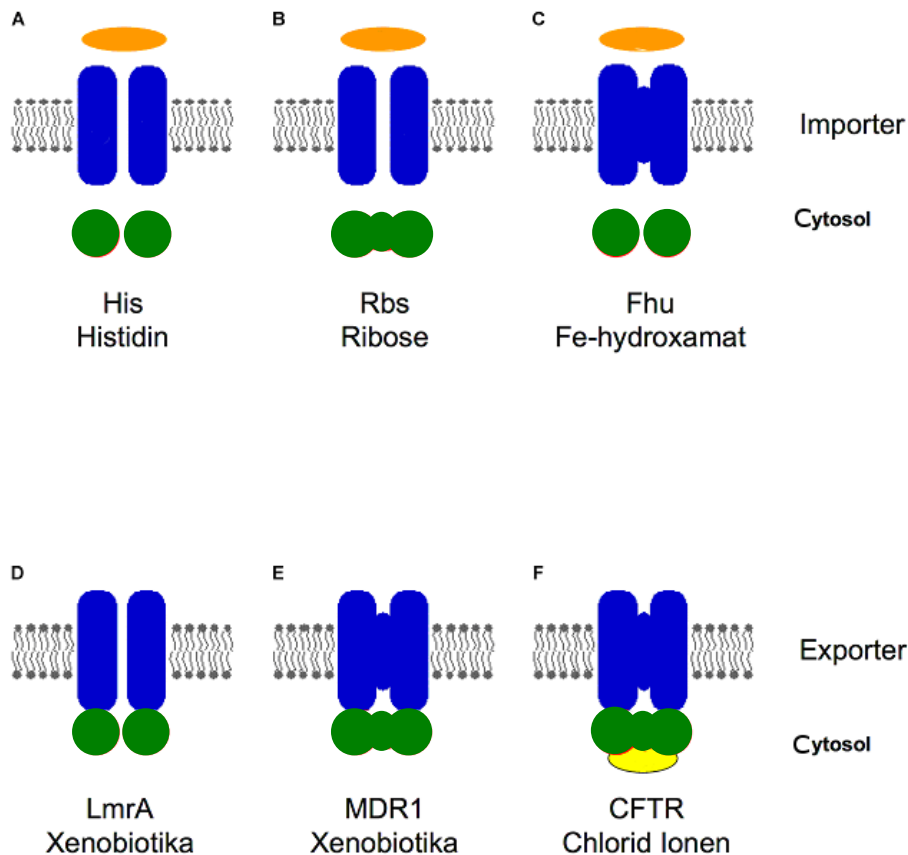


Abbildung 1: Organisation der Domänen von ABC Transportern. In rot eingefärbt die Nucleotid-Binde-Domänen, in blau die Transmembran-Domänen und in orange die Substratbindeproteine. Anhand von folgenden Beispiele ist die variable Organisation der vier Domänen dargestellt. A) Histidin Transporter, B) Ribose Transporter, C) Eisen-Hydroxamat-Transporter, D) MDR ABC-Transporter LmrA, E) MDR1 und F) CFTR mit in gelb eingefärbter regulatorischer Domäne. modifiziert nach (Hanekop 2006)

Trotz der weitgehend gleichen modularen Struktur der ABC-Transporter, sind ihre Primärstrukturen nur in den NBDs homolog. Für die TMDs, welche die Translokationspore bilden, können Homologien nur in Familien von Transportern mit ähnlichem Substratspektrum nachgewiesen werden (Saurin et al. 1999). Dies ist leicht durch die große Vielfalt der Substrate, bei ABC-Transportern zu verstehen. Die TMDs bestehen meist aus 2 mal 4-12 membrandurchspannenden Helices.

Die zweite Einheit der Transporter, die NBDs, hingegen besitzt viele, meist identische Sequenzabfolgen. Mit Hilfe dieser werden die Proteine in die Familie der ABC Proteine eingeordnet. ABC Proteine besitzen 3 charakteristische Sequenzmotive. Dies sind das Walker A (G-X-X-(G)-X-G-K-S-T, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt) und Walker B (Φ - Φ - Φ - Φ -D, wobei Φ eine hydrophobe Aminosäure darstellt) Motiv, sowie die C-Schleife (L-S-G-G-Q). Sie sind wesentlich an der Bindung und Hydrolyse des ATPs beteiligt. Findet sich in ABC-Proteinen zusätzlich noch eine

TMD, so charakterisiert man sie als ABC-Transporter. In ABC Transportern findet die ATP Hydrolyse im Interface zwischen den beiden NBD Monomeren statt, sodass ein sogenannter „Sandwich Dimer“ entsteht. Hier können jeweils zwei ATP gleichzeitig gebunden werden, wobei jeweils die Walker Motive des einen Monomers und die C-Schleife des Anderen die Bindung bewirken. Dies bedingt eine sogenannte „Head-to-Tail“ Anordnung, also eine zweizählige Symmetrie entlang der Längsachse des Transporters. Gebundenes ATP wirkt wie der „Klebstoff“ der Dimerisierung. Weitere Charakteristische Sequenzmotive von ABC-Transportern sind die H-, Q- und D-Schleife, welche ebenfalls an der ATP Hydrolyse beteiligt sind.

Zwischen den beiden Klassen von ABC-Transportern, den Importern und den Exportern, bestehen jedoch zwei grundlegende Unterschiede. Zum Einen benötigen Importer sogenannte Substratbindeproteine (SBP) für ihre Funktion, die die extrazellulären Substrate binden und sie an den Transporter weitergeben. Der andere wesentliche Unterschied ist die Lage der energieliefernden Einheit relativ zur Transportrichtung. In Importern befinden sich das Transportsubstrat und die Energiequelle auf verschiedenen Seiten der Membran, wohin gegen sie bei Exportern auf derselben Seite vorliegen. Dies führt zu strukturellen (siehe Abbildung 2) und wahrscheinlich auch funktionellen Unterschieden.

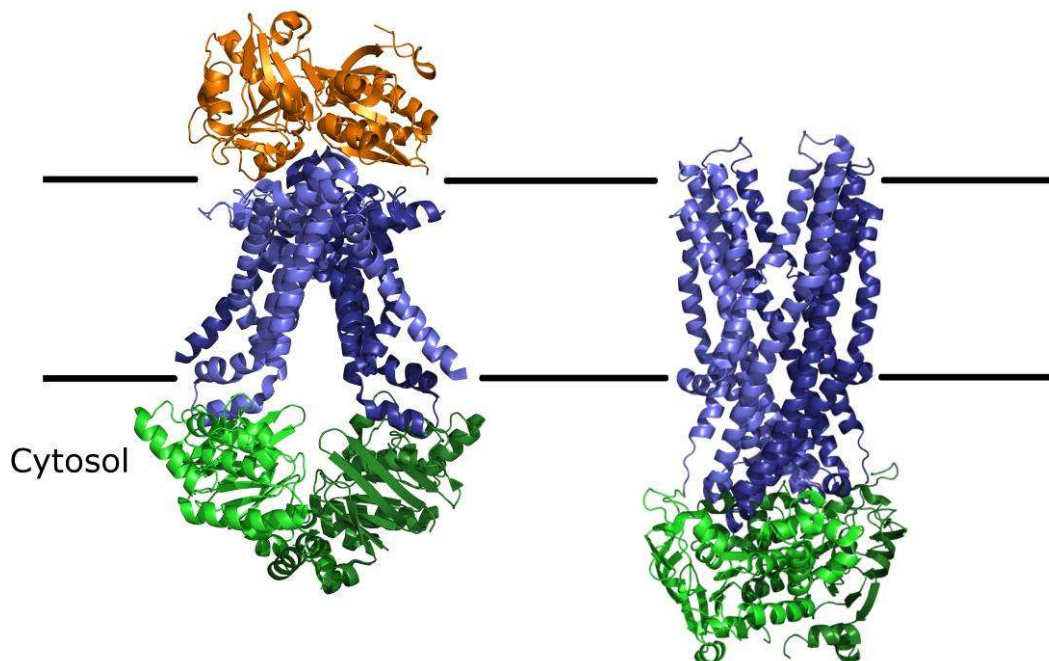


Abbildung 2: Die topologischen Unterschiede von ABC-Importern (links) und Exportern (rechts). In grün dargestellt sind die NBDs, in blau die TMDs und in orange das SBP. (PDB Kode 2onk & 2hyd).

ABC-Transporter können auch mit mehreren Erbkrankheiten in Verbindung gebracht werden. Hierzu gehören die Mukoviszidose, Adrenoleukodystrophie, das Dubin-Johnson Syndrom und die Wegener Granulomatose. Eine weitere Symptomatik, welche im Zusammenhang mit ABC Transportern gebraucht wird, ist die „Multidrug resistance (MDR), die eine Kreuzresistenz von Tumorzellen gegenüber verschiedensten Chemotherapeutika beschreibt.

2.1.2 „Multidrug resistance“

Eine wichtige Klasse der ABC Transporter bilden die MDR-Transporter. Sie gehören zur Gruppe der ABC-Exporter. Diese Transporter stellen für Zellen einen Schutz gegen Xenobiotika dar, da sie sich durch ein breites Substratspektrum auszeichnen. Hierzu gehören natürliche Substanzen wie Steroidhormone und Antibiotika, aber auch künstliche Stoffe wie Ethidiumbromid, Rhodamine und diverse Arzneimittel. Mit Hilfe der Transporter können diese schnell und effektiv gegen ihren passiven Einstrom, aus der Zelle exportiert werden.

Zuerst gefunden wurden sie im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei der Tumorthapie. Der erste humane ABC Transporter, der in diesem Zusammenhang beschrieben wurde, war das P-Glyko-Protein (P-gp auch MDR1 oder ABCB1). Das P-gp wurde in kultivierten Tumorzellen gefunden, die mit einem bedeutenden Chemotherapeutikum inkubiert wurden und dadurch Kreuzresistenzen gegen andere Chemotherapeutika erworben haben (Juliano und Ling 1976).

Der genaue Exportmechanismus von MDR Transportern ist nicht geklärt, jedoch gibt es drei Modelle. Zum Einen der direkte Export durch den Transporter („aqueous pore“, Altenberg et al. 1994). Hierbei wird das Substrat zwischen den beiden TMDs durch die Membran transportiert. Da viele Substrate von MDR Transportern jedoch hydrophob und daher membranlöslich sind, können noch zwei weitere Wege in Betracht gezogen werden. Das „hydrophobic vacuum cleaner“ Modell (Raviv et al. 1990) geht davon aus, dass in der Membran gelösten Moleküle in den Transporter aufgenommen werden und unter Energieverbrauch durch die TMD exportiert werden. Das „flippase“ Modell (Higgins und Gottesman 1992) beruht auf dem „hydrophobic vacuum cleaner“ Modell, jedoch besteht die Aufgabe des Transporters lediglich darin, die Substanzen von der inneren Lipidschicht in die Äußere zu transportieren. Auf beiden Seiten der Membran erfolgt der Austausch passiv durch Diffusion.

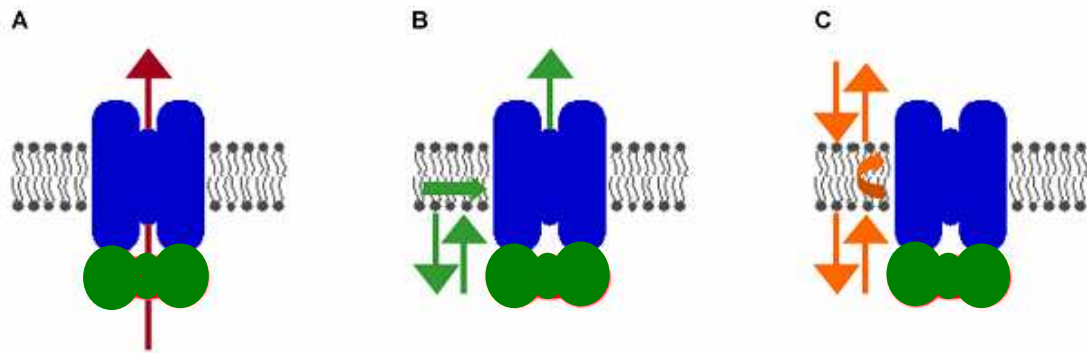


Abbildung 3: Modelle des Transports bei MDR ABC Transportern. A) Das „aqueous pore“ Modell geht von einem direkten Transport zwischen den TMDs durch die Membran aus. Das B) „hydrophobic vacuum cleaner“ Modell und das C) „flippase“ Modell beziehen die Membranlöslichkeit der meisten Substrate mit ein. Somit bringt der Transporter das Substrat aus der Membran durch die TMDs nach draußen bzw. von der inneren in die äußere Lipidschicht.

2.1.3 LmrA

LmrA ist ein Halfsize MDR ABC Transporter aus dem gram positiven Bakterium *Lactococcus lactis*. Er ist ein Homolog des humanen P-gp und besitzt zu letzterem eine Sequenzübereinstimmung mit 16% identischen und 34% homologen Aminosäuren (van Veen et al. 1996). Des Weiteren ist LmrA in der Lage das humane P-gp in Lungenfibroblasten funktional zu ersetzen (van Veen et al. 1998).

LmrA gehört zur Gruppe der Halfsize-Transporter und seine funktionale Einheit ist ein Homodimer. Er besteht aus 590 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ungefähr 65 kDa. Seine N-terminal gelegene TMD besteht aus 6 vorhergesagten Transmembranhelices und bildet etwa die Hälfte des gesamten Proteins.

2.2 Unnatürliche Aminosäuren

Um Information aus lokal begrenzten Bereichen zu erhalten, setzt der Biochemiker Sonden in das zu untersuchende Protein ein. Hierfür gibt es eine Reihe von funktionalen Molekülen, die zumeist auf chemischem Wege mit Thiolchemie an Cysteine im Protein gekoppelt werden. Ein großes Problem hierbei ist die Effizienz der Modifikation, ebenso wie die Zahl der natürlich vorhandenen Cysteine, die ebenfalls modifiziert werden können.

Ein anderer sehr eleganter Weg wurde von Professor Pete Schultz und seinen Mitarbeiter (Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA) beschrieben (Review in Ryu und Schultz 2006)). Sie erweiterten den genetischen Code, sodass sie an definierten Stellen zusätzliche nicht natürliche Aminosäuren einbringen konnten. Proteine bestehen aus 20 in Nucleotidbasentriplets codierten Aminosäuren. Auf

Grund der Redundanz des genetischen Kodes, welcher 64 verschiedenen Kombinationen aus drei Basen erlaubt, werden die meisten der 20 natürlichen Aminosäuren mehrfach codiert. Auch für das Ende eines Proteins, markiert durch ein Stopp-Kodon sind drei Möglichkeiten im genetischen Code vorhanden. Die entsprechenden Kodons sind TAA (Ochre), TGA (Opal) und TAG (Amber). Das Vorkommen der drei Tripletts ist organismusspezifisch sehr verschieden. So werden in *E. coli* nur etwa 8% aller Gene durch das Amber-Stopp-Kodon terminiert, im Gegensatz zu 63% Verwendung des Ochre und 20% des Opal Stopp-Kodons. Daher wählten Schultz und Mitarbeiter das Amber Stopp-Kodon für die Codierung unnatürlicher Aminosäuren.

Im natürlichen System gibt es für jede tRNA, welche die Verknüpfung zwischen der Information des Basentriplets und einer Aminosäure herstellt, eine Synthase. Diese Aminoacylsynthetase erkennt spezifisch eine tRNA anhand des Anti-Kodon und oftmals einem zusätzlichen Loop. Andererseits kann sie sehr genau zwischen den einzelnen Aminosäuren unterscheiden. Sie ist daher in der Lage mit einer sehr geringen Fehlerrate ($\sim 10^4$) (Stryer 2002) eine tRNA mit der richtigen Aminosäure zu beladen. Um nun auf eine zusätzliche tRNA, welche das Amber-Stopp-Kodon trägt, eine Aminosäure zu laden, muss zum Einen bei der tRNA das Anti-Kodon ausgetauscht werden und zum anderen bei der dazugehörigen Aminoacylsynthetase, sowohl die tRNA Erkennung (verändertes Anti-Kodon) wie auch die Bindungsstelle für die gewünschte Aminosäure verändert werden.

Als tRNA/tRNA-Aminoacylsynthetase Paar wurde die tRNA^{Tyr} aus *Methanococcus jannaschii* gewählt (Ryu und Schultz 2006). Hierfür gab es zwei Gründe. Zum Einen konnte das Anti-Kodon ohne großen Verlust an Bindungsspezifität zum Enzym verändert werden (GUA \rightarrow CUA), zum Anderen und das war entscheidender, wird die tRNA^{Tyr} nicht von der Tyrosin-tRNA-Aminoacylsynthetase von *E. coli* dem Zielsystem für die Expression, erkannt. Dies liegt an einer großen Loopregion der *E. coli* tRNA^{Tyr}, die mit für die spezifische Erkennung verantwortlich ist (siehe Abbildung 4).

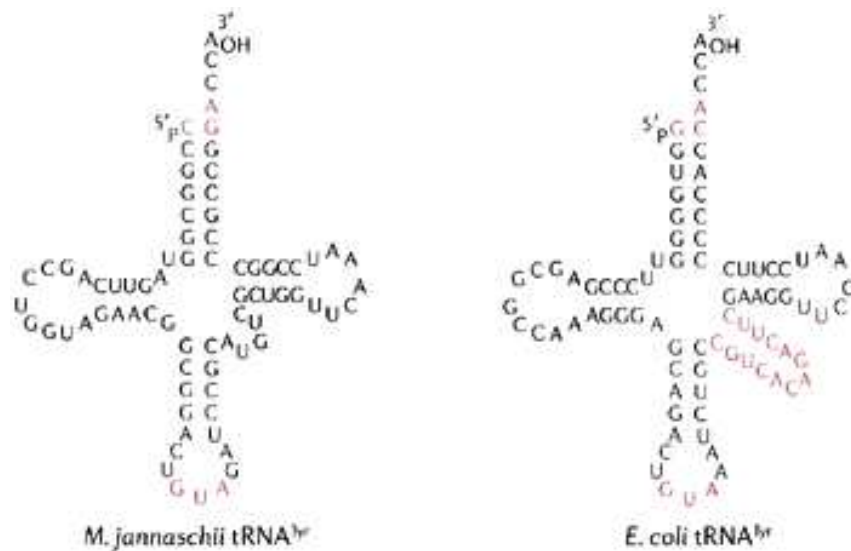


Abbildung 4: tRNA^{Tyr} aus *M. jannaschii* (links) und *E. coli* (rechts). In rot die Erkennungsmotive für die Aminoacylsynthetase der Ursprungsorganismen. (Xie und Schultz 2006)

Durch Zyklen gerichteter Evolution, wurde nun die Bindung der gewünschten Aminosäure zum Enzym optimiert. Durch unspezifische Mutationen in der Bindungstasche wurde das Bindungsverhalten verändert und anschließend durch positive (Amber Stopp Kodon im Antibiotikaresistenzgen) und negative (Amber Stopp Kodon in einem Barnase Gen, jedoch keine Zugabe von artifizieller Aminosäure) Selektion, eine optimale Bindung und Beladung sicher gestellt.

Auf diese Weise wurden über 30 verschiedene tRNA/tRNA-Aminoacylsynthetase Paare kreiert und der Wissenschaft ein Repertoire an verschiedenen Sonden bereit gestellt. Es war nun möglich eine Vielzahl von Aminosäurederivate an spezifischen Stellen in Proteine einzubringen. Zu diesen gehören Aminosäuren mit chemisch oder photochemisch reaktiven Gruppen, Chromophore, sowie glycosilierte oder phosphorylierte Aminosäuren. Auch sind diverse Sonden für biophysikalische Messungen entwickelt worden, darunter iodierter oder bromierter Tyrosine für die Phasenbestimmung in der Proteinkristallisation, NMR- und IR-Sonden oder redoxaktive Spezies. In der vorliegenden Arbeit sollte ein Aminosäurederivat aus der Gruppe der Fluorophore verwendet werden. Dies war das 7-Hydroxy-coumaryl-alanin, ein Alaninderivat mit einer Coumarinfunktion (siehe Abbildung 5). Die Aminosäure kann in einer zweistufigen Synthese hergestellt werden und wird bei der Expression dem Medium zugesetzt. Die Inkorporation in Proteine wurde anhand von Myoglobin gezeigt (Wang et al. 2006).

Da der zu untersuchende Transporter fluoreszierende Substrate, wie z.B. Rhodamine, besitzt, eignet sich die fluoreszierende Aminosäure gut um die Substratbindungsstelle bzw. die Translokationspore zu untersuchen. Hierbei können Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Experimente durchgeführt werden.

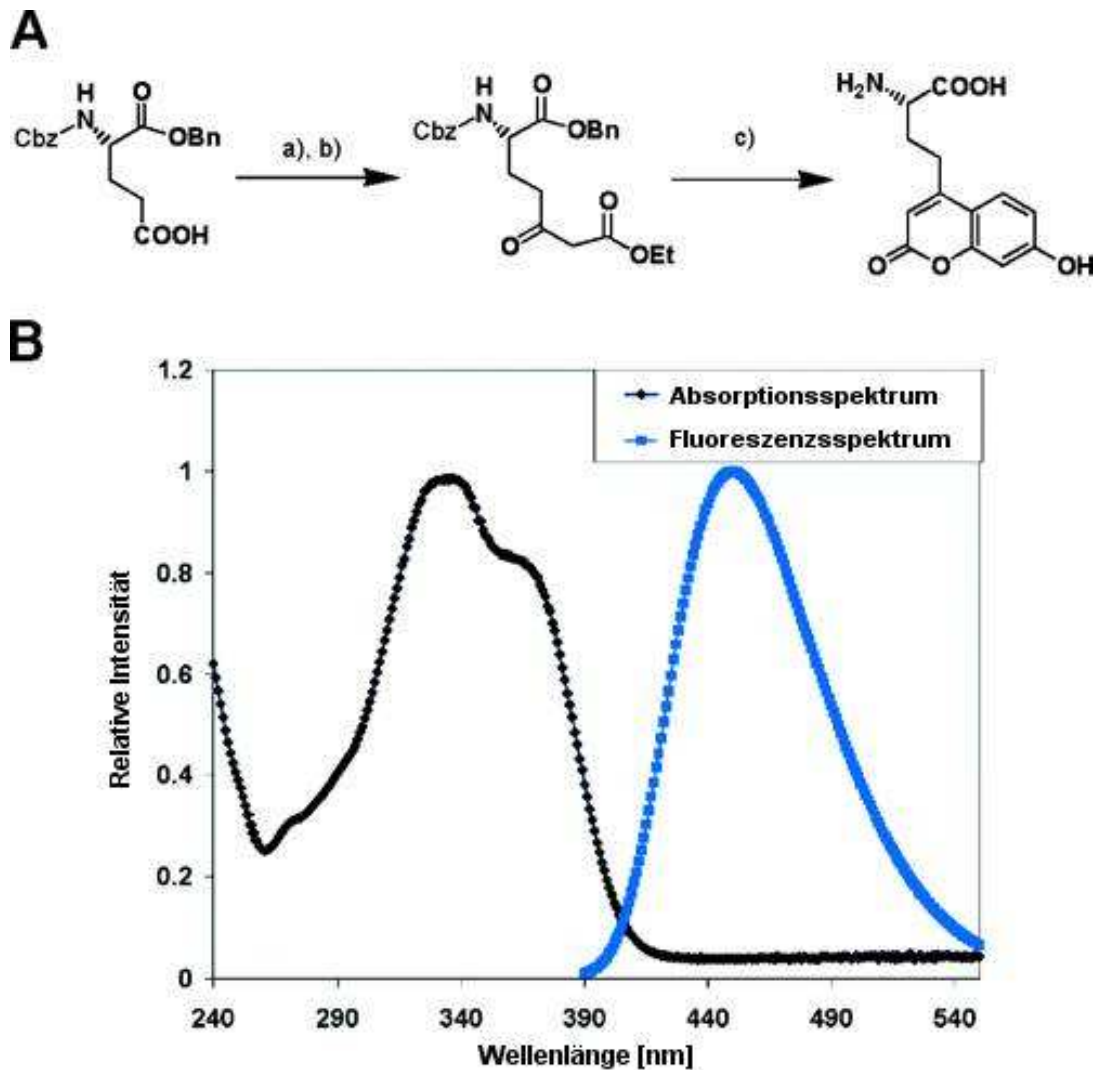


Abbildung 5: 7-Hydroxy-coumaryl-alanin. A) Die Aminosäure kann leicht aus geschütztem Glutamat synthetisiert werden. B) Die Aminosäure zeigt eine breite Absorption von ultraviolettem Licht mit einem Maxima bei 360nm (Phenolat Form) und einem Emissionsmaximum bei 450 nm (blau). modifiziert nach (Wang et al. 2006)

2.3 Ziel der Arbeit

Ziel meiner Arbeit war es, die Grundlagen zur Untersuchung der Substratbindungsstelle von LmrA zu schaffen.

Hierzu sollte zuerst ein Homologiemodell generiert werden, mit Hilfe dessen mögliche wichtige Aminosäuren, die in der Literatur beschrieben wurden, überprüft werden können. Da das System zur Inkorporation von Aminosäure-Derivaten mit Hilfe des erweiterten genetischen Codes für Prokaryoten in *E. coli* erzeugt wurde, war meine Hauptaufgabe eine heterologe Expression von LmrA in *E. coli* zu etablieren. Hierzu gehörten die Klonierung in ein Expressionssystem für *E. coli*, die Wahl eines geeigneten Expressionsstamms, sowie eine Optimierung der Expressionsbedingungen. Nach erfolgreichem Transfer der Expression auf *E. coli*, sollte versucht werden, eine Reinigung des Proteins zu etablieren. Daran anschließend sollten erfolgversprechende Mutanten von LmrA erzeugt und die Expression mit Hilfe des erweiterten genetischen Codes gezeigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Biologische Materialien, Plasmide und Oligodesoxynukleotide

Bakterienstämme

| Organismus | Genotyp | Hersteller |
|-------------------------|---|------------|
| <i>E. coli</i> | | |
| XL1Blue | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^fZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)] | Stratagene |
| XL10 | Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^fZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Tn5 Kan ^r Amy] | Stratagene |
| BL21 | F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) | Invitrogen |
| C41 | Wie BL21 (DE3) modifiziert nach (Miroux und Walker 1996) | |
| C43 | Wie BL21 (DE3) modifiziert nach (Miroux und Walker 1996) | |
| <i>L. lactis</i> | | |
| NZ9000 | (Margolles et al. 1999) | |

Plasmide

| | Genotyp | Hersteller |
|--------------|---|------------|
| pET16b | T7lac ^{p/o} , <i>mcs</i> + penta-His, <i>bla</i> (amp ^r), pBR322 origin, <i>lacI</i> (Studier und Moffatt 1986) | Novagen |
| pET28b | T7lac ^{p/o} , <i>mcs</i> + penta-His, Kan ^r , pBR322 origin, <i>lacI</i> (Studier und Moffatt 1986) | Novagen |
| pBADHisB | <i>araBAD</i> ^{p/o} , <i>AraC</i> , <i>bla</i> (amp ^r), pBR322 origin, <i>mcs</i> | Invitrogen |
| pNHLmrA | <i>PnisA</i> ^{p/o} , <i>cm</i> ^r , <i>mcs</i> (Margolles et al. 1999) | |
| pSup-CouRS | P15A ORI, <i>glnS</i> ['] , Mutant MjTyrRS, <i>proK</i> , <i>tRNA</i> ^{Amber} (Wang et al. 2006) | |
| pSup-MjTyrRS | P15A ORI, <i>glnS</i> ['] , Mutant MjTyrRS, <i>proK</i> , <i>tRNA</i> ^{Amber} (Wang et al. 2001) | |

Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide wurden von MWG Biotech, München synthetisiert und in einer Stammlösung von 100 pmol/μL in Wasser bei -20°C gelagert.

Tabelle 1: Sequenzierprimer

| | |
|--------------|------------------------------|
| pBAD forward | AGATTAGCGGATCCTACCTG |
| pBAD reverse | AGACCGCTTCTGCGTTCTG |
| f4890 | TGAAGCAACAGCCAGTTTAG |
| f4259 | TAATCGGAGTGGTCCCAACAG |
| f3674 | ATTTGCGAACTCGTGTCTGG |
| f4073 | ATGATGTCAATGCCCTTTAC |
| f4487 | TTATTGCCTTTGCTGGTCCT |
| LmrA_r5083 | GGTGAGTTGCCACAAGTTC |
| LmrA_r3388 | TGCGATTGGCCATTTGTGGA |
| s423C_rev | CAAAACCAATTTGGCACCGCCAATTTTC |
| s423C_fwd | GAAAATTGGCGGTGCCAAATTGGTTTTG |

Tabelle 2: Oligodesoxynukleotide für die Mutagenese der Ambermutanten

| | |
|---------------|---|
| t109Amber_fwd | GTGAGTCGGTCGTCAAAAATTTGCGATAGCGTGTCTGGGATAAAATG |
| t109Amber_rev | CATTTTATCCCAGACACGCTATCGCAAATTTTTGACGACCGACTCAC |
| s287Amber_fwd | TCTCATCTCAACGGGGGTTATGTAGCTTGGAACCTTGCTTGGAATG |
| s287Amber_rev | CATTCCAAGCAAAGTTCCAAGCTACATAACCCCGTTGAGATGAGA |
| t290Amber_fwd | GGTTATGAGTCTTGGATAGTTGCTTGGAATGATG |
| t290Amber_rev | CATCATTCCAAGCAACTATCCAAGACTCATAACC |
| l292Amber_fwd | GAGTCTTGGAACCTTTGTAGGGAATGATGATGTA |
| l292Amber_rev | TACATCATCATTCCCTACAAAGTTCCAAGACTC |
| m294Amber_fwd | GGAACCTTTGCTTGGATAGATGATGTATTTG |
| m294Amber_rev | CAAATACATCATCTATCCAAGCAAAGTTCC |
| m296Amber_fwd | TGCTTGGAATGATGTAGTATTTGATGAATTT |
| m296Amber_rev | AAATTCATCAAATACTACATCATTCCAAGCA |
| m298Amber_fwd | GGAATGATGATGTATTAGATGAATTTAATC |
| m298Amber_rev | GATTAAATTCATCTAATACATCATCATTCC |
| n300Amber_fwd | GATGTATTTGATGTAGTTAATCGGAGTGG |
| n300Amber_rev | CCACTCCGATTAACTACATCAAATACATC |
| i302Amber_fwd | GATGAATTTATAGGGAGTGGTCCCAACAG |
| i302Amber_rev | CTGTTGGGACCACTCCCTATAAATTCATC |
| v304Amber_fwd | GAATTTAATCGGATAGGTCCCAACAGTGG |
| v304Amber_rev | CCACTGTTGGGACCTATCCGATTAATTC |
| p306Amber_fwd | AATCGGAGTGGTCTAGACAGTGGCAACTTTC |
| p306Amber_rev | GAAAGTTGCCACTGTCTAGACCACTCCGATT |
| v308Amber_fwd | GGTCCCAACATAGGCAACTTTCTTTACAG |
| v308Amber_rev | CTGTAAAGAAAGTTGCCTATGTTGGGACC |
| t310Amber_fwd | GGTCCCAACAGTGGCATAGTTCTTTACAG |
| t310Amber_rev | CTGTAAAGAACTATGCCACTGTTGGGACC |
| f312Amber_fwd | CAGTGGCAACTTTCTAGACAGAACTTG |
| f312Amber_rev | CAAGTTCTGTCTAGAAAGTTGCCACTG |
| e314Amber_fwd | GCAACTTTCTTTACATAGCTTGCCAAAGC |
| e314Amber_rev | GCTTTGGCAAGCTATGTAAAGAAAGTTGC |
| a316Amber_fwd | CTTTACAGAACTTTAGAAAGCGTCAGGATC |
| a316Amber_rev | GATCCTGACGCTTTCTAAAGTTCTGTAAAG |
| a318Amber_fwd | CAGAACTTGCCAAATAGTCAGGATCAACTGG |
| a318Amber_rev | CCAGTTGATCCTGACTATTTGGCAAGTTCTG |
| g320Amber_fwd | GCCAAAGCGTCATAGTCAACTGGTCCG |
| g320Amber_rev | CGACCAGTTGACTATGACGCTTTGGC |

3.1.2 Enzyme und sonstige Proteine

Alle verwendeten Enzyme wurden soweit verfügbar von Fermentas bezogen, ansonsten von NEB. Das verwendete Serum Albumin Fraktion V wurde von Roth bezogen.

3.1.3 Chemikalien, Standards und Kits

Chemikalien wurden soweit nicht anders im Text vermerkt von Merck bezogen. Standards und Kits wurden wie im Text vermerkt bezogen.

3.1.4 Medien, Puffer und sonstige Stammlösungen

Alle Medien und Lösungen für die Anzucht von *L. lactis* und *E. coli* wurden mit entmineralisiertem Wasser hergestellt und entweder durch autoklavieren sterilisiert oder sterilfiltriert. Puffer und sonstige Lösungen wurden mit Milli-Q Wasser hergestellt. Antibiotika Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert, Agar-Platten, sowie zur Chromatographie verwendete Puffer bei 4°C und alle anderen Lösungen bei RT.

Antibiotika- und Induktorstammlösungen

| | |
|-----------------|-------------------------------|
| Ampicillin | 100 mg/ml |
| Chloramphenicol | 30 mg/ml in 70% (v/v) Ethanol |
| L(+)-Arabinose | 200 mg/ml |

Medien

| <u>M17-Medium</u> | | <u>Glucose-Lösung</u> | |
|-------------------|----------|-----------------------|---------|
| β-Glycerophosphat | 19,0 g/l | Glucose | 100 g/l |
| Pepton aus Casein | 5,0 g/l | | |
| Pepton aus Soja | 5,0 g/l | | |
| Fleisch-Extrakt | 5,0 g/l | | |
| Hefe-Extrakt | 2,5 g/l | | |
| Ascorbat | 0,5 g/l | | |
| Magnesiumsulfat | 0,25 g/l | | |

Das M17-Medium wurde vor Benutzung auf eine Endkonzentration von 0,5% Glucose mit steriler 10%ger Glucose-Lösung eingestellt. Chloramphenicol wurde 1:6000 aus der Stammlösung zugefügt.

| <u>Luria-Bertani (LB) Medium</u> | | <u>LB-Agar</u> | |
|----------------------------------|--------|----------------|-----------------------|
| Pepton aus Casein | 10 g/l | AGAR-AGAR | 1% (w/v) in LB-Medium |
| Hefe-Extrakt | 5 g/l | | |
| NaCl | 5 g/l | | |

Sowohl LB-Medium, als auch LB-Agar wurden nach dem Autoklavieren je nach Bedarf 1:1000 mit Antibiotikastammlösung versetzt.

| <u>NZY⁺ Broth</u> | | <u>Glucose-Lösung</u> | |
|------------------------------|---------|-----------------------|---------|
| Casein hydrolysate | 10 g/l | Glucose | 200 g/l |
| Hefe Extrakt | 5 g/l | | |
| NaCl | 5 g/l | | |
| MgSO ₄ | 1,5 g/l | | |
| MgCl ₂ | 1,2 g/l | | |

Das NZY⁺-Broth Medium wurde vor Benutzung auf eine Endkonzentration von 0,5% Glucose mit steriler 20%ger Glucose-Lösung eingestellt.

| <u>TSS-Puffer</u> | | <u>PEG/Glucose-Lösung</u> | |
|--------------------|--------|---------------------------|-----------|
| MgSO ₄ | 2,4 g | PEG 4000 | 25% (w/v) |
| Pepton aus Casein | 10 g | Glucose | 5 g/l |
| Hefe-Extrakt | 5 g | | |
| NaCl | 5 g | | |
| H ₂ O | 150 ml | | |
| in 600 ml Glycerol | | | |

Die TSS-Basic Lösung wurde vor Gebrauch mit steriler PEG/Glucose Lösung 1,5:1 vermischt.

Puffer und sonstige Lösungen**Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:**

| <u>TAE-Puffer:</u> | | <u>10-fach Auftragspuffer</u> | |
|--------------------|-------|-------------------------------|------------|
| Tris | 40 mM | Bromphenolblau | 1,0 mg/ml |
| Essigsäure | 20 mM | Xylencyanol | 1,0 mg/ml |
| EDTA | 1 mM | Glycerin | 50 % (v/v) |

Puffer für SDS-PAGE, Elektrotransfer und Western Blot:

| <u>4-fach Trenngelpuffer</u> | | <u>4-fach Sammelgelpuffer</u> | |
|------------------------------|-------------|-------------------------------|-------------|
| Tris-HCl pH 8,85 | 3,0 M | Tris-HCl pH 6,8 | 0,5 M |
| Natriumdodecylsulfat | 0,4 % (w/v) | Natriumdodecylsulfat | 0,4 % (w/v) |

| <u>Laufpuffer</u> | | <u>5-fach Auftragspuffer</u> | |
|----------------------|-------------|------------------------------|--------------|
| Tris | 50 mM | Tris-HCl pH 6,8 | 0,25 M |
| Glycin | 190 mM | Natriumdodecylsulfat | 7,5 % (w/v) |
| Natriumdodecylsulfat | 0,1 % (w/v) | Glycerin | 25 % (v/v) |
| | | Bromphenolblau | 0,25 mg/ml |
| | | (β -Mercaptoethanol) | 12,5 % (v/v) |

| <u>Coomassie-Lösung</u> | | <u>Entfärbelösung</u> | |
|-------------------------------|--------------|-----------------------|------------|
| Essigsäure | 10 % (v/v) | Essigsäure | 10 % (v/v) |
| Methanol | 40 % (v/v) | Methanol | 40 % (v/v) |
| Coomassie Brilliantblau R-250 | 0,25 % (w/v) | | |

| <u>Blotpuffer</u> | | <u>TBST</u> | |
|------------------------------|------------|-----------------|-------------|
| Laufpuffer versetzt mit MeOH | 20 % (v/v) | Tris/HCl pH 8,0 | 20 mM |
| | | NaCl | 250 mM |
| | | Tween@20 | 0,1 % (v/v) |

Puffer für Chromatografie

| <u>Aufschluß Puffer</u> | | <u>Puffer 1</u> | |
|-------------------------|--------|-----------------|------------|
| Tris/Cl pH 7,5 | 100 mM | HEPES pH 8 | 50 mM |
| NaCl | 100 mM | Imidazol | 10 mM |
| | | NaCl | 250 mM |
| | | Glycerin | 10 % (v/v) |

| <u>Puffer 2</u> | | <u>Puffer 3</u> | |
|-----------------|------------|-----------------|------------|
| HEPES pH 7 | 50 mM | HEPES pH 7 | 50 mM |
| Imidazol | 40 mM | Imidazol | 250 mM |
| NaCl | 250 mM | NaCl | 250 mM |
| Glycerin | 10 % (v/v) | Glycerin | 10 % (v/v) |

3.2 Bioinformatische Methoden

3.2.1 Software

- DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** 1.0 (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA. <http://www.pymol.org>
- Modeller 9v1, <http://salilab.org/modeller>, (Sali und Blundell 1993)
- MolProbity 3.1, <http://molprobity.biochem.duke.edu>, (Lovell et al. 2003)
- <http://www.expasy.org>, (Gasteiger et al. 2003)
- <http://www.tcoffee.org>, (Notredame et al. 2000; Poirot et al. 2003)

3.2.2 Generierung von Homologiemodellen

Der Ablauf des Modellierens verlief über die Auswahl der Vorlage, eines Sequenzalignment zwischen der Vorlage und LmrA, Homologiemodellierung der Struktur von LmrA mit dem Programm Modeller und abschließender Evaluation des Homologiemodells. Als Ausgangsmodell wurde auf Grund der höchsten Sequenzhomologie eines Proteins bekannter Struktur der ABC Exporters, Sav1866 gewählt. Für das Sequenzalignment wurden zwei Algorithmen verwendet, zum Einem der im Programm Modeller implementierten „align2d“, zum Anderen der allgemein benutzte des ClustalW Servers (Blossum60). Das erhaltene Alignment wurde auf seine Korrektheit überprüft und gegebenenfalls manuell Korrekturen an der Lage vor allem bei Lücken in sekundärstruktur Elementen korrigiert. Mit Struktur und Alignment als Eingabe wurden mit dem unter 7.2.1 aufgeführten Eingabeskript 100 Homologiemodelle von LmrA berechnet. Die Auswahl des besten Modells wurde mit Hilfe der internen Wertungsfunktion durchgeführt, der „modeller objectiv function“, die sowohl Energie- sowie geometrische Faktoren berücksichtigt. Sollten Schleifen nicht ausreichend verfeinert sein, so konnten diese mit der „modelloop“ Funktion noch verbessert werden. Die abschließende Evaluation des Homologiemodells erfolgte mittels des MolProbity Servers (<http://molprobity.biochem.duke.edu>, Lovell et al. 2003).

3.2.3 Bioinformatische Analyse von LmrA

Die Analyse des Kodon-Nutzung in *E. coli* wurden mittels <http://gcu.schoedl.de> (Fuhrmann et al. 2004) durchgeführt. Hierfür wurde statistisch ermittelt in wie weit

das Vorkommen der einzelnen Kodons im *lmra* Gen vom Gebrauch im *E. coli* Stamm K12 abweicht und somit zu Engpässen während der Proteinbiosynthese führen kann.

3.3 Molekularbiologische Arbeiten

3.3.1 Transfer der für LmrA codierenden Sequenz vom *L. lactis* Vektor pNHLmrA in die *E. coli* Vectorsystems pET16, pET28 und pBAD

Die für das LmrA Protein und den Hexa-Histidin Tag codierende Sequenz wurde enzymatisch mittels NcoI, XhoI aus dem Plasmid pNHLmrA gewonnen und über Agarosegelelektrophorese gereinigt. Die *E. coli* Vectorsysteme wurden ebenfalls enzymatisch mit NcoI, XhoI in der multiplecloningsite (*mcs*) geöffnet, über Agarosegelelektrophorese gereinigt und mit dem Fragment aus pNHLmrA ligiert. Hiernach erfolgte eine Transformation in den Klonierungsstamm XL₁-Blue.

Kultivierung von *L. lactis*

Flüssigkulturen von 100ml M17 Medium mit 5µg/ml Chloramphenicol in einem 200 ml Erlenmeyerkolben, wurden mit *L. lactis* NZ9000 pNHLmrA aus einer Glycerinkultur angeimpft und bei 30°C übernacht inkubiert.

Plasmidisolierung aus *L. lactis*

Die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe des Plasmid Isolierungskits „Mini Prep“ der Firma Qiagen. Dieses beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Birnboim und Doly 1979), gefolgt von einer Immobilisierung der Plasmid-DNA auf einem Anionentauscher mit mehreren Waschschritten und Elution bei niedrigem pH. Auf Grund der dicken Zellwand gram-negativer Bakterien, wurde abweichend vom Standardprotokoll eine Inkubation mit Lysozym durchgeführt. Hierzu wurden Zellen aus 4ml Kulturvolumen einer Übernachtskultur in 250 µl Puffer P1 des Kits resuspendiert und mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt. Der Verdau der Zellwand erfolgte durch 30minütige Inkubation bei RT. Die weitere Isolation erfolgte nach Herstellerprotokoll. Das gewonnene Plasmid wurde bei -20°C gelagert.

Kultivierung von *E. coli* für molekularbiologische Arbeiten

Aus Glycerinkulturen wurden *E. coli* Zellen auf LB-Agar Platten in Anwesenheit der jeweiligen Antibiotika ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen von 5ml LB Medium, sowie 5µl des jeweiligen Antibiotika, in 15 ml Glas-Kulturröhrchen

wurden mit *E. coli* Zellen aus einer Einzelkolonie von der Agar-Platte angeimpft und über Nacht (~16h) bei 220 rpm und 37°C bebrütet.

Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Plasmid DNA aus *E. coli* Übernachtkulturen (ÜNK) wurde mit Hilfe des Plasmid Isolierungskit „Mini Prep“ von Qiagen nach Herstellerprotokoll isoliert.

Restriktionsverdau des Vektors und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Alle drei Zielvektoren besitzen eine *mcs*, welche eine „in frame“ Klonierung mit dem Restriktionsenzym NcoI erlaubten. Als 3'-Restriktionsenzym wurde das Enzym XhoI gewählt. Hierdurch wurden nach dem Stopp Kodon von LmrA ungefähr 340 bp zusätzlich kloniert. Jeder Vektor besaß nur jeweils eine Schnittstelle für NcoI und XhoI, wodurch das einfache Öffnen des Vektors möglich war, sowie Ligation des Vektors mit dem Insert.

Daher wurde das Fragment mit der LmrA codierenden Sequenz aus dem pNHLmrA mit Hilfe einer doppelten Hydrolyse durch die Restriktionsenzyme NcoI und XhoI herausgeschnitten. In einem Restriktionsansatz hydrolysierten jeweils 2U des Restriktionsenzym ungefähr 1µg Plasmid DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 37°C über Nacht.

Die Aufreinigung erfolgte mittels eines 1% Agarosegels und Extraktion der Bande gewünschten Molekulargewichts aus dem Gel. Für das Gel wurden 500 mg Agarose in 50 ml TBE Puffer suspendiert und einer Mikrowelle aufgeköcht. Die Lösung wurde unter Rühren auf Handwärme abgekühlt und in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformer gegossen bis dieser ungefähr 5 mm eintaucht.

Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine mit TBE Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Der gesamte Restriktionsansatz wurde 1:10 (v/v) mit 10fach Auftragspuffer versetzt und in die Taschen gefüllt. Zusätzlich wurden noch 5 µl 1kb Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 160 V für 30 Minuten. Das Anfärben der Banden erfolgte durch Überführen des Gels in ein Färbebad (0,1% Ethidiumbromid (v/v) in Wasser) und 5minütiges schwenken. Die Detektion erfolgte auf einem UV-Tisch und die Banden gewünschter Größe wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die Isolation der DNA aus dem Gel erfolgte nach Protokoll des Gel Extraktion Kits „gel extraction“ der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

Ligation und Transformation im Klonierungsstamm

Die Ligation des getragenen Fragments in die Expressionsvektoren erfolgte mit Hilfe der T4 Ligase. Im gesamten Ansatz wurden zwischen 100 und 200 ng DNA eingesetzt, wobei das molare Verhältnis von Insert zu Vektor bei 3:1 lag. Dies wurde mit 1U T4 Ligase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer bei RT für 12h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erwärmen auf 60°C für 20 Minuten abgestoppt.

Die Selektion von positiven Konstrukten erfolgte durch Transformation in den Klonierungsstamm XL₁Blue und Selektion auf LB-Agar Platten mit entsprechenden Antibiotika.

Diese Transformationen, sowie alle unten beschriebenen, erfolgten in chemisch kompetent *E. coli* Zellen (Hanahan 1983). Die bei -80°C gelagerten Aliquote der Zellsuspensionen wurden auf Eis aufgetaut. 10 µl des Ligationsansatzes wurden auf 50 µl Zellsuspension gegeben und vorsichtig vermischt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis, wurden die Zellen für eine Minute einem Hitzschock von 42°C ausgesetzt, gefolgt von einer 2minütigen Ruhe auf Eis. Zur phänotypischen Expression der neuerworbenen Antibiotikaresistenz wurden die Zellen mit einem zehnfachen Volumen von 37°C warmem LB Medium verdünnt und 1h bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Der Ansatz wurde hiernach auf LB Agar Platten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die erfolgreiche Insertion des *Imra*-tragenden Fragments wurde durch Plasmidisolierung aus einer Flüssigkultur, Restriktionsverdau und Analyse mittels Agarosegelelektrophorese, wie oben beschrieben nachgewiesen. Zur Überprüfung der Korrektheit der genetischen Information, wurden die Plasmide sequenziert.

3.3.2 Erstellung der Expressionsstämme

Transformation des Wildtyps in die Expressionsstämme

Die Transformation in die Expressionsstämme fand nach oben beschriebener Methode mit Hilfe eines Hitzeschocks statt, wobei 50ng Plasmid DNA und 50µl Zellsuspension verwendet wurden. Als Expressionsstämme wurden der *E. coli* Stamm BL₂₁ (Invitrogen), sowie die beiden *E. coli* Stämme C43 und C41 (Miroux und Walker 1996) verwendet.

Transformation der Amber Stopp Kodon tragenden Mutanten in die Expressionsstämme für mit erweitertem genetischen Kode

Um eine Expression von Proteinen mit einer unnatürlichen Aminosäure zu ermöglichen wurden zunächst die Expressionsstämme modifiziert. Zu diesem Zweck wurden Zellen der Expressionsstämme mit dem pSup-CouRS Plasmid, welches das Gen für die Amber-tRNA sowie die tRNA-Amino-Acylsynthetase trägt, transformiert. Dies geschah wie oben beschrieben nach der Hitzeschockmethode. Zur Kontrolle stand die ursprüngliche Aminoacylsynthetase, die jedoch das Amber Kodon erkennt, zur Verfügung. Hier wurde nur das Anti-Kodon ausgetauscht und die Erkennung der tRNA durch die Aminoacyl-Transferase modifiziert. Die Beladung erfolgte jedoch wie im Wildtyp weiterhin mit Tyrosin. Mit dieser war der Kontrolleinbau eines Tyrosins am Amber Stopp Kodon möglich. Für die Transformation des Expressionsvektors in die pSup-CouRS bzw. pSup-MjTyrRS tragenden Zellen, wurden diese kompetent gemacht.

Dies geschah nach zwei verschiedenen Protokollen.

Kompetente Zellen modifiziert nach Chung (1989)

Dieses Protokoll wurde für die schnelle Erstellung kompetenter Zellen benutzt. Der Nachteil beruht auf dem schnellen Verlust der Kompetenz bei Lagerung und der niedrigeren Kompetenz. Das Protokoll wurde modifiziert nach Chung (1989).

Aus einer ÜNK wurden 20ml LB Medium mit 50µg/ml Chloramphenicol in einem 200ml Schikanekolben auf 1% Endkonzentration angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C und 220 rpm bis zu einer 0,6 OD₆₀₀ geschüttelt. Das Medium wurde in sterile 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 6000g und 4°C zentrifugiert. Alle folgenden Arbeiten geschahen möglichst auf Eis. Das Zellpellet wurde in 2ml eiskaltem TSS Puffer resuspendiert und zu 100µl in sterile 1,5ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Nicht sofort verwendete Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Kompetente Zellen nach Hanahan (1983)

Für eine längere Aufbewahrung, wurden die Zellen nach Hanahan (1983) angefertigt. Aus einer ÜNK wurden 250ml 2xYT mit 50µg/ml Chloramphenicol in 2l Schikanekolben auf 1% angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von eins geschüttelt. Das Medium wurde in sterile 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 6000g und 4°C

abzentrifugiert. Alle folgenden Arbeiten geschahen möglichst auf Eis. Die Zellpellets wurden in 43 ml eiskaltem RF1 Puffer resuspendiert und für eine Stunde auf nassem Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen durch erneute Zentrifugation für 15 Minuten bei 6000g und 4°C pelletiert. Die Pellets wurden in 10 ml eiskaltem RF2 Puffer resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu 100µl in sterile 1,5ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Nicht sofort verwendete Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.3 Mutagenese mit Hilfe des QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kits

Die Amber-Stopp-Kodon tragenden Mutanten von *Imra* wurden mit Hilfe des „Quik Change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene hergestellt, wobei das Herstellerprotokoll modifiziert wurde.

Die Funktion des Kits kann in zwei Teile unterteilt werden (siehe Abbildung). Im ersten Schritt wird mit einer Polymerase, die eine hohe Synthesegeschwindigkeit bei geringer Fehlerrate besitzt (Bergseid et al. 1991), und zueinander komplementären Primern, die identisch zu der mutierten Sequenz sind, eine Polymerase Kettenreaktion (Saiki et al. 1988) durchgeführt. Im zweiten Schritt wird die gesamte Ursprungs-DNA von einem Restriktionsenzym hydrolysiert, das zur Erkennung nicht nur eine bestimmte Basenabfolge, sondern zusätzlich noch ein spezifisches Methylierungsmuster benötigt (McClelland und Nelson 1992). Hierdurch erfolgt ein vollständiger Verdau der nicht mutierten DNA, wobei die neu synthetisierte DNA, die keine Methylierungen enthält, erhalten bleibt.

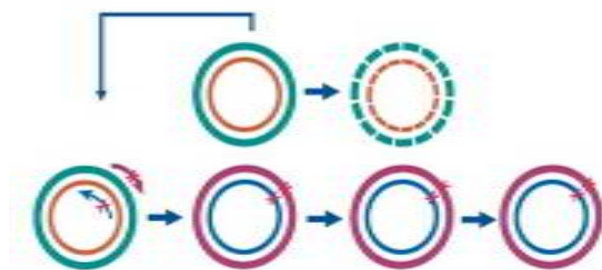


Abbildung 6: Schematischer Ablauf der Einführung einer Punktmutation mit Hilfe des QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene. Mit Hilfe zweier zueinander komplementärer Mutageneseprimern werden von einer Matrize, DNA Einzelstränge mit Mutation erzeugt. Die Matrizen DNA wird in einem zweiten Schritt degradiert, so dass nur noch die neu synthetisierte, mutagenisierte DNA vorliegt (entnommen dem Hersteller Manual)

Die Primer wurden vorzugsweise mit einer Länge von 30 bp \pm 3 mit dem Stopp-Kodon in der Mitte der Sequenz konstruiert. Es wurde hierbei auf einen möglichst hohen GC-Gehalt, sowie terminale Guanidine oder Cytosine geachtet. Dies erhöht die Schmelztemperatur der Enden, sodass ein guter Start der Polymerasereaktion gewährleistet werden kann. Die Synthese erfolgte durch MWG Biotech (München).

Ein Reaktionsansatz enthielt 1,25 μ l des „10x reaction buffer“, 2,5 ng des Wildtyp Plasmids pBADLmrA, je 31,25 ng der beiden Primer, 0,25 μ l dNTP mix, 0,75 μ l QuickSolution und 0,625U der Polymerase in einem Gesamtvolumen von 13,75 μ l.

Die PCR wurde mit einem 60sekündigen Zyklus bei 95°C zur vollständigen Denaturierung der DNA gestartet. Die Replikationszyklen begannen jeweils mit 50s bei 95°C zum vollständigen Schmelzen der DNA. Die Annealingtemperatur bei der sich die Primer anlagern, wurde jeweils 10°C unter der Schmelztemperatur des Primers vom Wildtypgen gewählt und 50s gehalten. Die Polymerasereaktion fand bei 68°C für 390s statt. Es wurden typischerweise 18 Zyklen durchgeführt. Abschließend befand sich eine Inkubation für 420s bei 68°C zur Komplettierung angefangener Syntheseprodukte.

Der Verdau der methylierten DNA erfolgte durch Zugabe von 2,5U DpnI in den Reaktionsansatz und Inkubation für eine Stunde bei 37°C.

Die Transformation erfolgte in XL₁Blue nach oben beschriebener Prozedur. Für die phänische Expression wurde NYZ⁺ Medium eingesetzt.

3.3.4 Allgemeine Methoden

Quantitative und qualitative Analyse von DNA

Die Bestimmung der Konzentration von Plasmid DNA oder gereinigten DNA Fragmenten erfolgte spektroskopisch durch Absorptionsmessung mit Hilfe des ND-1000 (Nanodrop) bei 260 nm, wobei eine OD₂₆₀=1 einer Konzentration von 50 ng/ μ L doppelsträngiger DNA entsprach.

Die qualitative Analyse erfolgte durch automatisierte Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al. 1977).

Sämtliche Sequenzierungen wurden vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Dauerhafte Konservierung von *E. coli* Zellen

Von allen transformierten *E. coli* Zellen wurden zur längeren Lagerung Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 700µl einer ÜNK mit 300µl sterilem Glycerin in einem sterilen Schraubdeckelgefäß gut vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Expression von LmrA in *E. coli*

Die Produktion von LmrA musste auf Grund der Anforderungen des Expressionssystem für unnatürliche Aminosäuren heterolog in *E. coli* statt finden. Die codierende Sequenz für LmrA wurde, wie oben beschrieben, in geeignete Expressionsvektoren überführt. In den von mir durchgeführten Experimenten wurde das pBADLmrA Plasmid eingesetzt.

Expression von Wildtyp LmrA

Aus Glycerinkulturen wurden 100ml LB Medium mit 100µg/ml Ampicillinlösung in 300ml Schikanekolben angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Für die Hauptkulturen wurden 2l LB Medium mit 100µg/ml Ampicillinlösung in 5l Schikanekolben mit einer ÜNK auf 1% angeimpft. Diese wurden bei 37°C und 220rpm geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde die Expression von LmrA durch Zugabe von 20ml steriler 20%ger L-(+)-Arabinose in H₂O (Endkonzentration 0,2%) induziert. Die Kolben wurden weitere 3h geschüttelt.

Expression von LmrA-Ambermutanten

Aus Glycerinkulturen wurden 100ml LB Medium mit 100 µl Ampicillinlösung und 100µl Chloramphenicollösung in 300ml Schikanekolben angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Für die Hauptkulturen wurden 2l 2xYT Medium mit jeweils 100µg/ml Ampicillin und 50µg/ml Chloramphenicol, in 5l Schikanekolben mit einer ÜNK auf 1% angeimpft. Diese wurden bei 37°C und 220rpm geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde die Expression von LmrA durch Zugabe von 20ml steriler 20%ger L-(+)-Arabinose in H₂O (Endkonzentration 0,2%) induziert. Die Kolben wurden weitere 3h geschüttelt.

3.4.2 Zellernte und Präparation der Cytoplasmamembran

Nach der Expression wurden die Kolben für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Kulturen in 1l Zentrifugenbecher überführt und die Zellen bei 4°C für 20min und bei 5.000g sedimentiert. Alle folgenden Schritte wurden soweit wie möglich auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt. Der Überstand wurde dekantiert und die pelletierten Zellen in 7ml kaltem Resuspendierungspuffer je Liter Kultur resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit einer Tablette des Proteaseinhibitors Complete EDTA free und Endkonzentration von 3mM EDTA versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels einer fünfmaligen Passage durch ein auf 4°C gekühltes Basic Z System bei einem Druck von 25 00 bar. Nicht aufgeschlossene Zellen und grobe Zelltrümmer wurden durch 10minütige Zentrifugation bei 4°C und 5.000g sedimentiert. Aus dem Überstand wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 125.000g für 75 min die Cytoplasmamembranen sedimentiert. Die so gewonnen Membranen wurden mit einem Spatel in einen Teflon-in-Glas-Homogenisator überführt und in 4ml Puffer je Liter Kulturvolumen homogenisiert, wobei der Puffer mit einer Tablette des Proteaseinhibitors *Complete EDTA free* (Roche) versetzt wurde.

3.4.3 Reinigung von LmrA aus Cytoplasmamembranen

Die Reinigung ist eine modifizierte Version des Protokolls für die Reinigung vom LmrA aus *L. lactis* Membranen (Hanekop 2006).

Solubilisierung

Die Menge an Detergenz, welche für die Solubilisierung eingesetzt wurde, richtete sich nach der in den Membranen nachweisbaren Proteinmenge. Hierzu wurde eine Proteinbestimmung der Membransuspension mit einem Bradford Plus Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Suspension wurde auf 15 mg/ml Proteinkonzentration verdünnt, mit 1% FOS-Choline 16 versetzt und durch Inkubation bei 4°C und mehrmaligem Schwenken für 30 Minuten so lubilisiert. Nicht solubilierte Membranen wurden durch erneute Zentrifugation bei 4°C und 125.000 g für 30 Minuten sedimentiert.

Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

In dem verwendeten Konstrukt befindet sich N-terminal von LmrA ein Hexa-His-Tag. Dieser wurde für die Aufreinigung mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) genutzt. Hierzu wurden das Solubiliesat der

Membranen auf eine mit Zn^{2+} beladenen und mit Puffer 1 mit 0,001325% FOS-CHOLINE 16 äquilibrierte 1 ml HiTrap Chelating Säulen unter Verwendung eines Aekta Explorer aufgetragen. Die Säule wurde mit 14ml Puffer 2 mit 0,001325% FOS-CHOLINE 16 gewaschen. Das Protein wurde mit Puffer3 mit 0,001325% FOS-CHOLINE 16 eluiert und in 1ml Fraktionen gesammelt.

3.4.4 Quantitative und qualitative Analysen von Proteinen

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte spektroskopisch mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Coomassie Plus Lösung. Die Bestimmung beruht auf einer modifizierten Methode nach Bradford (Bradford 1976). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll in Mikrotiterplatten. Alle Messungen erfolgten mindestens als Doppelbestimmung. Hierbei wurden 10 μ l der Probe mit 300 μ l Coomassie Plus für zehn Minuten bei RT inkubiert. Die Absorption wurde bei 584nm bestimmt. Für die Berechnung der Konzentration wurde eine BSA Standardreihe (für Mikro-Assays) angelegt und vermessen. Anhand der Gleichung der Regressionsgeraden über den linearen Teil der Standardreihe wurde nach folgender Gleichung die Konzentration der Probe bestimmt

$$\text{Konzentration [mg/ml]} = \frac{\text{Probe} * \text{Achsenabschnitt}}{\text{Steigung}}.$$

SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte mit Hilfe der denaturierenden, diskontinuierlichen Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli 1970). Die Detektion der Proteine erfolgte sowohl durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue R250, als auch durch Western Blotting und nachfolgender Immunochemischen Detektion.

Zur Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden 16 gesäuberte Glasplatten (10cm x 8cm) mit Abstandhaltern (Dicke: 1mm) in einem Gießblock aufgeschichtet. Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 75 mL bestand aus 18,75 mL 4fachem Trenngelpuffer und einem der gewünschten Prozentigkeit des Gels entsprechendem Volumen Rotiphorese Lösung. Zur Herstellung von 10%igen Gelen

wurden 30mL Acrylamid-Stammlösung verwendet. Die Lösung wurde mit Wasser auf ein Endvolumen von 75 ml aufgefüllt. Nach dem Polymerisationsstart durch Zugabe von 70µL TEMED und 0,3mL 10% (w/v) APS wurde die Trenngelmischung in den Block mit den Glasplatten pipettiert und mit 1mL Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und 35mL einer 4,5%igen Sammelgelmischung (5,25mL Acrylamid-Stammlösung, 8,75mL 4fachem Sammelgelpuffer und 21mL Wasser) hergestellt. Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 70µL TEMED und 210µL 10% (w/v) APS gestartet. Die Lösung wurde auf das erstarrte Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und ein Taschenformer mit fünfzehn Zähnen eingesetzt. Nach Erstarren des Sammelgels wurden die Gele aus dem Gießblock entfernt, in feuchte Zellstofftücher gewickelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Für gereinigtes Protein wurden 20 µl der Probe mit 5µl 5xProbenpuffer versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei ganzen Zellen wurden 0,3 OD äquivalente Volumina in 20µl Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 98°C inkubiert. Es wurden jeweils 20µl der Ansätze pro Tasche mit einer Hamilton Glasspritze aufgetragen. Zusätzlich wurden in eine Tasche 5µl Größenstandard (*Prestained Proteine Ladder*) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120V bis zum Austritt des Bromphenolblaus aus dem Gel.

Detektion der Proteinbanden

Coomassie Färbung

Das Anfärben der Proteinbanden erfolgte durch 5minütiges Schwenken in heißer Coomassie Lösung, gefolgt von Schwenken in Entfärbelösung bis zur Entfärbung des Hintergrunds.

Western Blot

Die mittels SDS PAGE aufgetrennten Proteingemische wurden durch Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran transferiert und mit einem Antikörper gegen den Hexa-Histidin Tag markiert. Dieser primäre Antikörper wurde mittels eines Konjugats einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) und einem gegen diesen gerichteten Antikörper markiert. Anhand der spezifischen enzymatischen Aktivität der HRP konnten die Banden detektiert werden (Blake et al. 1984).

Der Transfer der Proteine aus dem Gel erfolgte in einer Semi-Dry Blot Apparatur. Hierzu wurde die PVDF Membran fünf Minuten in Methanol inkubiert, in Blotpuffer

gewaschen und auf drei in Blotpuffer getränkte Filtermembranen auf die Kathode der Blot Aperatur gelegt. Auf die Blotmembran wurde das Trenngel gelegt, bedeckt von drei weiteren in Blotpuffer getränkten Filtermembranen. Der Transfer wurde nach Auflegen der zweiten Elektrode für 75 Minuten bei 100mA pro Gel durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Blotmembran für mindestens eine Stunde in 5% BSA in TBST inkubiert, um noch freie Membran mit Protein zu blockieren. Dies dient der Verringerung unspezifischer Bindung an die Membran. Danach wurde der primäre Antikörper (Penta-His-Antikörper) gegen den Hexa-Histidin Tag in 5% BSA/TBST auf die Membran gegeben und eine Stunde geschwenkt. Überschüssiger Antikörper wurde durch 5maliges Waschen für je 5 Minuten mit TBST entfernt. Danach folgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Konjugat von Meerrettich-Peroxidase mit einem Anti-Maus-Antikörper) in 10%Milchpulver/TBST für 1h, gefolgt von nochmaligem Waschen.

Die Bindung des sekundären Antikörpers wurde durch die Chemilumineszenz aus der Reaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid, katalysiert von der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase, nachgewiesen (siehe ECL Kit, Amershan Bioscience).

4 Ergebnisse

4.1 Homologiemodell von LmrA

Eine Voraussetzung für die Generierung eines Homologiemodells ist eine geeignete Struktur als Vorlage. Die Suche in der Protein Struktur Datenbank (www.pdb.org) nach einer Struktur, die sich für die Modellierung von LmrA eignete, ergab zwei Treffer. Zum Einen die Ende letzten Jahres zurückgezogenen Strukturen des Lipopolysaccharid Transporters MsbA (Chang et al. 2006), sowie die des MDR-Exporters Sav1866 (Dawson und Locher 2006). Als einzig mögliche Ausgangsstruktur blieb somit lediglich die Struktur von Sav1866. Sav1866 zeigt auf Primärstruktur Ebene eine für ABC-Transporter vergleichsweise hohe Homologie zu LmrA, die in den TMDs 60% (Aminosäure 1-334), in den NBDs 75% (Aminosäure 335-590) und im gesamten Protein 67% beträgt.

Der erste Schritt für die Erstellung eines Homologiemodells ist ein Sequenzalignment. Hierzu wurden sowohl der allgemein übliche Algorithmus des ClustalW Servers (www.ebi.ac.uk/clustalw/; Blossum60 Matrix), als auch der im Programm Modeller implementierte Algorithmus für Sequenzalignments, der speziell auf Alignments für Homologiemodellierung optimiert ist, verwendet. Eine Analyse der verschiedenen Alignments zeigte, dass LmrA und Sav1866 in weiten Teilen eine hohe Homologie besitzen, jedoch traten Unterschiede in der Lokalisationen der, durch die Längendifferenz der beiden Proteine (12 Aminosäuren) entstehenden, Lücke, auf. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, waren die Alignments im Bereich der TM3 bis TM6 sowie den NBDs fast lückenlos. Der Überhang an Aminosäuren wurde zwischen dem N-Terminus und der TM3 eingefügt. Da alle resultierenden Varianten ähnliche Sequenzhomologie aufwiesen (siehe Abbildung 7), wurde ein weiteres Kriterium für die Auswahl des endgültigen Alignments verwendet. Es wurden mit Hilfe von Hydropatieranalysen die Lagen der TMDs vorhergesagt und die Alignments auf eine Übereinstimmung mit diesen Vorhersagen untersucht. In Abbildung 7 ist eine schematische Darstellung der Alignments gezeigt, welche entsprechend der Vorhersagen eingefärbt sind.

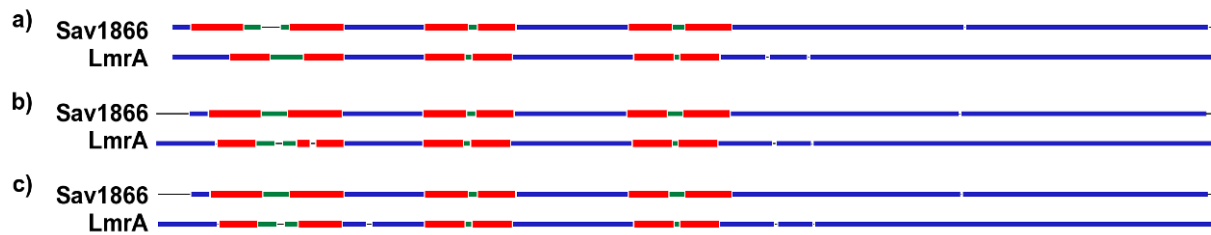


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Sequenzalignments zwischen LmrA und Sav1866. In rot dargestellt sind Transmembrandomänen, in grün extrazelluläre und in blau cytosolische Regionen. Sequenzlücken sind mit dünnen Strichen dargestellt. a) Sequenzalignment mit Modeller Algorithmus, b) ClustalW (Blossum60) und c) manuell bearbeitete endgültige Version.

Abbildung 7 zeigt eindeutig, dass das Alignment mit dem in Modeller implementierten Algorithmus Aminosäuren der TM1 von Sav1866 polaren Resten von LmrA zugeordnet waren, sowie Reste der ersten extrazellulären Schleife von Sav1866 der vorhergesagten TM1 von LmrA. Im Alignment von ClustalW hingegen ist diese Zuordnung wesentlich genauer. Daher wurde es als Grundlage für die Erstellung des Homologiemodells für LmrA gewählt.

Bei der Erstellung eines Homologiemodells sollte darauf geachtet werden, dass die entstehenden Lücken im Alignment nicht ohne experimentelle Grundlage innerhalb von Sekundärstrukturelementen liegen. Unter diesem Gesichtspunkt betrachtet enthält das Alignment eine akzeptable, sowie eine problematische Lücke. Die erste entstandene Lücke liegt günstig in der ersten extrazellulären Schleife. Die zweite entstandene Lücke hingegen liegt innerhalb des Bereichs der TM2. Daher wurde diese drei Aminosäuren große Lücke an das Ende des Sekundärstrukturelements verschoben, in die Mitte der ICD1 zwischen TM2 und TM3. Das auf diese Weise erhaltene Alignment ist in Abbildung 8 gezeigt. In diesem ist eine große Übereinstimmung in den NBDs, aber auch in den TMDs, zu erkennen. Diese für ABC-Transporter untypische Eigenschaft, unterstreicht die Qualität des Alignments und der Vorlage Sav1866 für die Homologiemodellierung von LmrA.

| | | |
|---------|-----|---|
| Sav1866 | 1 | -----MIKRYIQFVKPKYRIFATIIVGIIKFGIPMLIPLLIKYAI |
| LmrA | 1 | MERGPQMANRIEGKAVDKTSIKHFVKLIRAA P -YLFFVIGIVAGIIGTLLIQLOVPKMV |
| Sav1866 | 42 | DGVIINNHALLTTDEKWHHLTIAIGIALFI FVIVRPPIEFIRQYLAQWTSNKILYDIRKKLY |
| LmrA | 60 | QPIINISFG----HGVNGGKVALVIALYIGSAAVSATAAIVLGFVFGESVVKNLNRTRVWDK- |
| Sav1866 | 102 | NHLQALSARFYANNQVGVISRVINDVEQTKDFILTGIMNIWLDCITIIALSIMFFLDV |
| LmrA | 115 | --MIHLPVKYFDEVKTCGEMSSRIANDTTQVKNLIANSIPQAFSTILLVGSIIIFLQMQW |
| Sav1866 | 162 | KLTLAALFIFPFYILTIVYVFFGRLRKLTRERSQALAEVQGF LHERVQGISVVKSAIEDN |
| LmrA | 173 | RITLAMIAVPIVMLIMEPIMTFGQKIGWTRQDSL ANFQGIASESLSEIRLVKSSNAEKQ |
| Sav1866 | 222 | EAKNFDKKNTNFLTRALKHTRVNAYSFAAINTVTDIGPIIVIGVCAYLAISSITVGTLA |
| LmrA | 233 | ASKKAENDVNALYKIGVKEAVDELMSPVMMLSMMLMIFGLLAYGIYLISTGVMSLGTL |
| Sav1866 | 282 | AFVGYLELLFCPIRRIVASFITLTQSFASMDRVFQIIDEYDIKNGVGAQPIETKQGRID |
| LmrA | 293 | GMMYLMNLIQVPTVATFTEELAKASGSTGRITELIDEEQEV LHQGDSLD--LEGKTL |
| Sav1866 | 342 | IDHVSEIQYNDNEAPILKDI NLSIEKGETVAFVGMSSGGKSTLINLIPRFYDVTSGQILID |
| LmrA | 351 | AHVDFAVDSEQ-ILLEDISFEAQPNSTIAFAGPSGGKSTIFSLERFYQPTAGEITIG |
| Sav1866 | 402 | GHNKDFLTGSLRNQIGLVQDNI FSDTVKENILLC-RPTATDEEVVEAAKMANAHDFI |
| LmrA | 410 | GQPIDSVSLENWRSQIGFVSQDSAMAGTIRENTYGLEGNFTDEDLWQVLDLAFARSFV |
| Sav1866 | 461 | MNLPQGYDTEVGERGVKISGGQRQLS IARIFLNPPILILDEATSALDSESESIQEAL |
| LmrA | 470 | ENMPDQLNTEVGERGVKISGGQRQLA IARAF LRNPKILMLDEATASLDSESESMVQRAL |
| Sav1866 | 521 | DVLSKDRITTLVAHRLSTITHADKIVVIENGHIVEITGTHRELIAKQGAYEHLYSIQN--- |
| LmrA | 530 | DSLIMKGRITTLVAHRLSTIVDADKIYFTEKGETTGSCKHNELVATHPLYAKYVSEQLTVG |
| Sav1866 | 578 | L |
| LmrA | 590 | Q |

Abbildung 8: Endgültiges Sequenzalignment zwischen LmrA und Sav1866, für die in silico Modellierung von LmrA. In Dunkel unterlegt sind identische Reste, heller unterlegt sind homologe Reste.

Unter Verwendung des in Abbildung 8 gezeigten Alignments wurden basierend auf der Struktur von Sav1866 (PDB Kode [2HYD](#)) 100 Homologiemodelle von LmrA mit Hilfe des Programms Modeller berechnet. Die Auswahl des besten Modells erfolgte mit Hilfe der internen Wertungsfunktion, der „modeller objective function“, die sowohl Energie- als auch geometrische Faktoren berücksichtigt. Es wurde das Modell mit

dem niedrigsten Wert gewählt. Eine weitere Verfeinerung des Modells in den Bereichen der Lücken im Alignment führte zu keiner weiteren Verbesserung des Modells im Sinne geordneter Sekundärstruktur.

Das so berechnete Modell wurde im Hinblick auf seine Geometrie und Abweichungen von den in Proteinen beobachteten Konformation untersucht und mit dem Ausgangsmodell verglichen. In Abbildung 9 sind die Ramachandranplots der berechneten Struktur von LmrA und der Kristallstruktur von Sav1866 gezeigt. Die Größenordnung der bei LmrA in nicht erlaubten Bereichen liegenden Reste ist mit 1,6% der von Sav1866 mit 0,9% sehr ähnlich.

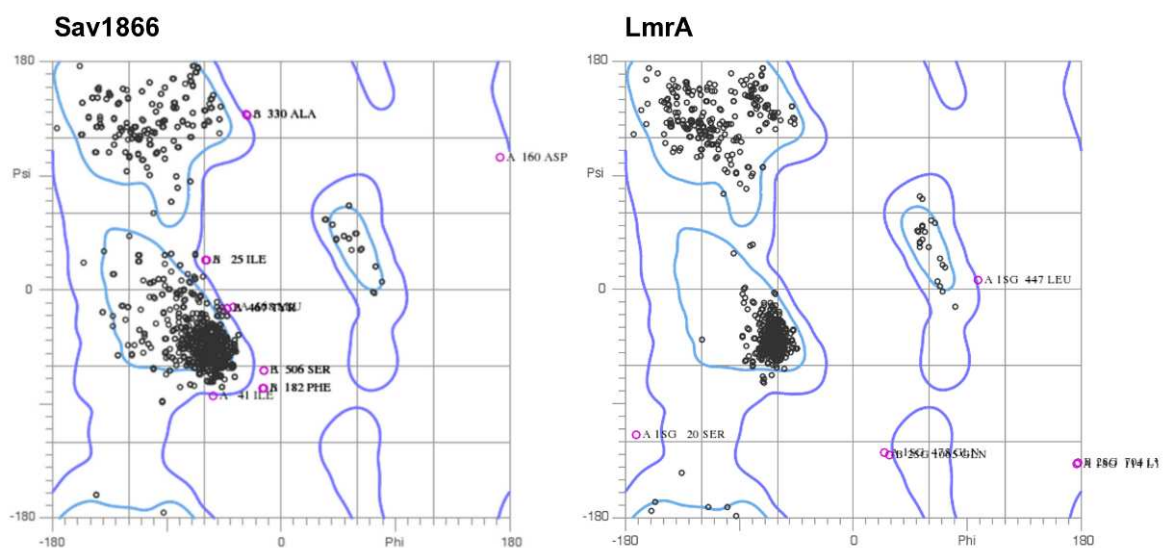


Abbildung 9: Ramachandranplots der Struktur von Sav1866 (links) und des für LmrA erzeugten Homologiemodells (rechts). In hellblau dargestellt die „favoured regions“ der Winkelkombinationen, in dunkelblau die „generously allowed regions“. Mit Kreisen markiert sind in der Struktur gefundenen Winkelkombinationen, wobei magentafarbene Kreise in den „disallowed regions“ liegen.

Abbildung 10 zeigt das berechnete Modell für LmrA.

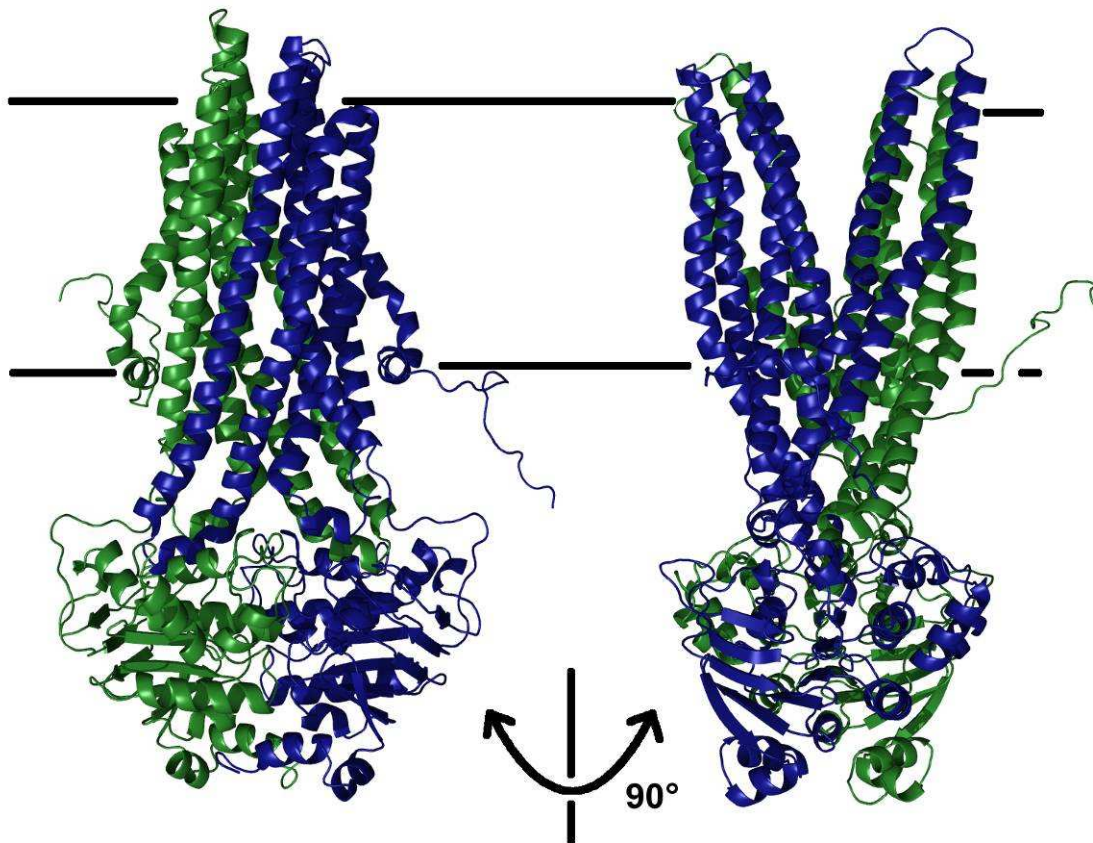


Abbildung 10: Endgültiges Homologiemodell von LmrA. In grün und blau sind die beiden Monomere von LmrA dargestellt. Die Lage der Membranen ist durch eine Linie angedeutet

Als eine Folge der 30%igen Sequenzidentität zwischen LmrA und Sav1866 lassen sich die Strukturen fast komplett überlagern. Die Abweichung der C_{α} -Atome zwischen der Struktur von Sav1866 und dem Modell von LmrA im Bereich der TMDs und ICDs (323 Atome) liegt bei $0,7\text{\AA}$, für die NBDs (254 Atome) bei $0,5\text{\AA}$ und für die gesamte Struktur (578 Atome) bei $0,6\text{\AA}$ (siehe Abb. 11).

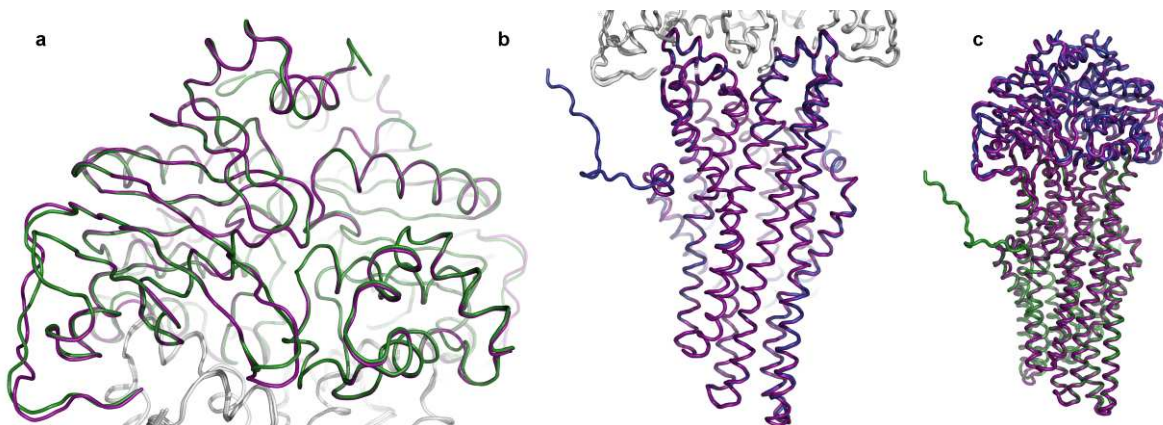


Abbildung 11: Überlagerungen a) der NBD (grün), b) der TMD (blau) und c) des gesamten Homologiemodells von LmrA mit der Struktur von Sav1866 (violett).

4.2 Verifizierung des Modells mit biochemischen Daten

Die Aussagekraft eines Homologiemodells lässt sich durch die Übereinstimmung mit biochemischen Daten untermauern. Für LmrA sind eine Vielzahl von Untersuchungen sowohl zur Funktion als auch zur Struktur gemacht worden. Im Folgenden ist ein Vergleich der Ergebnisse der Arbeit von Poelarends und Konings (2002) mit dem im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Homologiemodell für LmrA dargestellt. In Poelarends und Konings (2002) wurden Einzelcysteinmutanten erstellt und mit einem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff (Fluoresceinmaleimid) über Thiolchemie markiert. Auf diese Weise konnten die Lösungsmittelzugänglichkeiten, sowie funktionelle Daten im unmarkierten und markierten Zustand gewonnen werden. In Abbildung 12 sind links die topologisch relevanten Vorhersagen farblich am Homologiemodell von LmrA hervorgehoben. Rechts sind die Cysteinmutanten dargestellt, die die Funktion von LmrA beeinflussen. Bei den Topologievorhersagen sind Reste mit intrazellulärer Vorhersage in grün dargestellt, extrazelluläre in rot und Reste in den TMDs in ocker. Reste, innerhalb der TMDs, die sich als zugänglich erwiesen haben, sind hellblau eingefärbt. Abbildung 12 zeigt, dass die Topologievorhersagen größtenteils mit dem Modell erklärt werden können. So liegen die intrazellulären Reste (grün) an Positionen in den ICDs, alle nicht zugänglichen Aminosäuren (ocker) in einem Block von ungefähr 50Å Ausdehnung darunter und die extrazellulär lokalisierten Aminosäuren (rot) auf der Außenseite des Transporters. Gut erklären lässt sich die symmetrische Verteilung der Zugänglichkeit in TM6 (siehe Helixrad). Die nicht markierbaren Reste sind dabei in das Protein hineingerichtet, wohingegen die markierbaren Reste sich auf der, dem Interface bzw. dem von den beiden Monomeren gebildeten Hohlraum zugewandten Seite befinden. Eine Ausnahme macht die extrazellulär zugängliche Aminosäure Leucin174 (Poelarends und Konings 2002), welche nach dem Modell in direkter Nachbarschaft zu nicht zugänglichen Aminosäuren (291 und 294) lokalisiert ist.

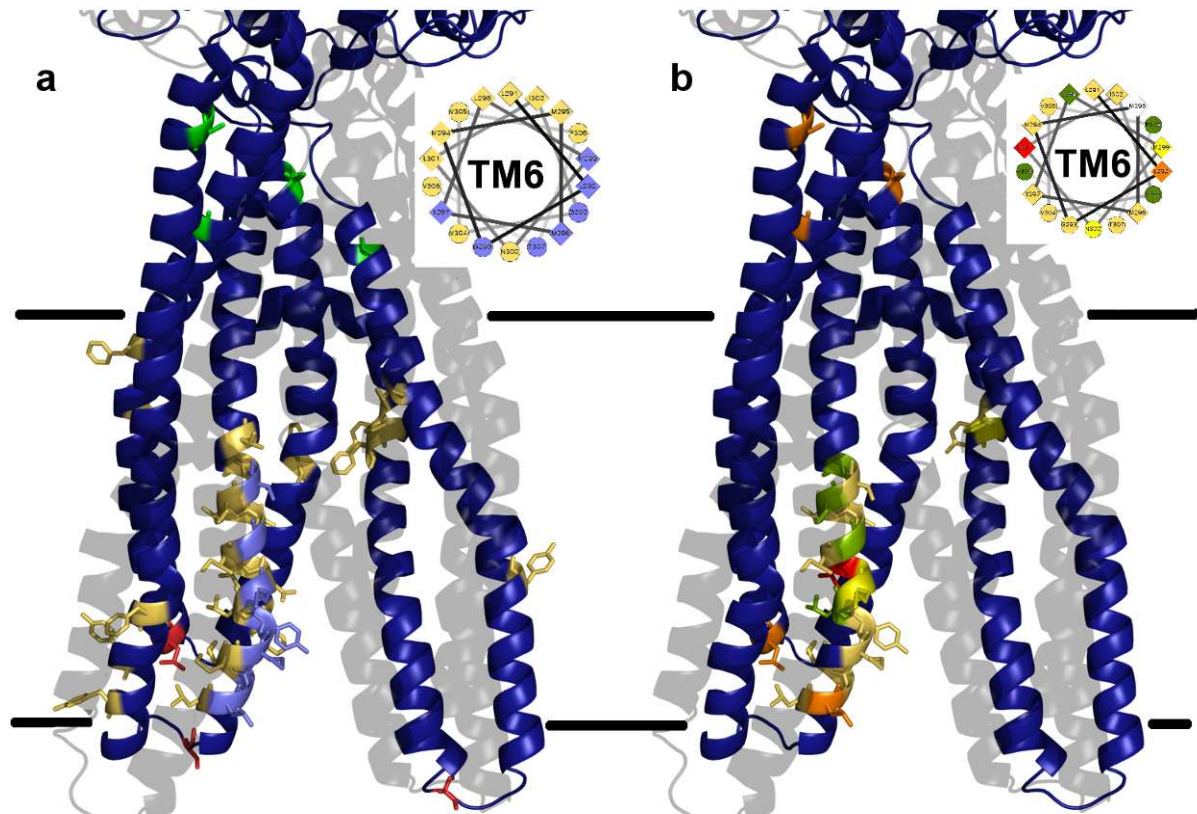


Abbildung 12: Projektion der von Poelarends und Konings (2002) erhaltenen Ergebnisse auf das Homologiemodell von LmrA. a) zeigt die topologischen Ergebnisse. In Rot dargestellt sind extrazelluläre und in grün die cytoplasmatische Reste. In ocker sind nicht lösungsmittelzugängliche Reste in der TMD gezeigt, während in hellblau lösungsmittelzugängliche Reste in der TMD dargestellt sind. Die kleine Abbildung zeigt das Helixrad der TM6 mit entsprechender Einfärbung. b) zeigt die funktionalen Ergebnisse der Studie. Eingefärbt sind Reste, die nach Mutation oder Markierung die Funktion (Expressionsrate oder Inhibition) veränderten oder die Expression in toto verhinderten. In orange dargestellt sind Reste, die im markierten Zustand den Transport blockierten, in rot Reste, die die Expression verhinderten, in grün, die die Inhibition des Transporters mit Verapamil verhinderten, in ocker Reste, die die Transportrate auf mindestens 40% erniedrigten, sowie in gelb die Reste, bei denen kein Transport mehr zu messen war. Die kleine Abbildung zeigt wieder entsprechend eingefärbt das Helixrad der TM6.

In Abbildung 12 b sind Reste eingefärbt, die die Funktionen von LmrA beeinflussen. Wie schon in anderen Untersuchungen, sowohl an LmrA als auch P-gp gezeigt haben, ist TM6 von großer funktionaler Bedeutung für den Transporter. Die meisten der untersuchten Aminosäure, die den Transport beeinflussen, sind in dieser Helix lokalisiert. Weiterhin wichtig sind drei Reste in der ICD („intra cellular domain“), die im markierten Zustand, wahrscheinlich auf Grund der Größenänderung den Transport blockieren. Betrachtet man hier das Helixrad der TM6 so lässt sich keine Vorzugsrichtung erkennen.

4.3 Selektion erfolversprechender Mutanten zur Untersuchung der Substratbindungsstelle von LmrA

Anhand des Homologiemodells sowie weiterer biochemischer Untersuchungen (Poelarends und Konings 2002; Alqawi et al. 2003) wurden gezielt Mutanten für eine Markierung mit unnatürlicher Aminosäure gewählt. Hierzu wurden zuerst 2 Positionen bestimmt, an denen das System zur Markierung mit unnatürlichen Aminosäuren etabliert werden konnte, die jedoch auch Informationen über die Topologie enthielten. Hierzu wurden die Positionen Threonin109 und Serin287 gewählt, wobei die erste in der ICD zwischen TM2 und TM3 liegt, während die letztere in der extrazellulären Schleife zwischen TM5 und TM6 lokalisiert ist.

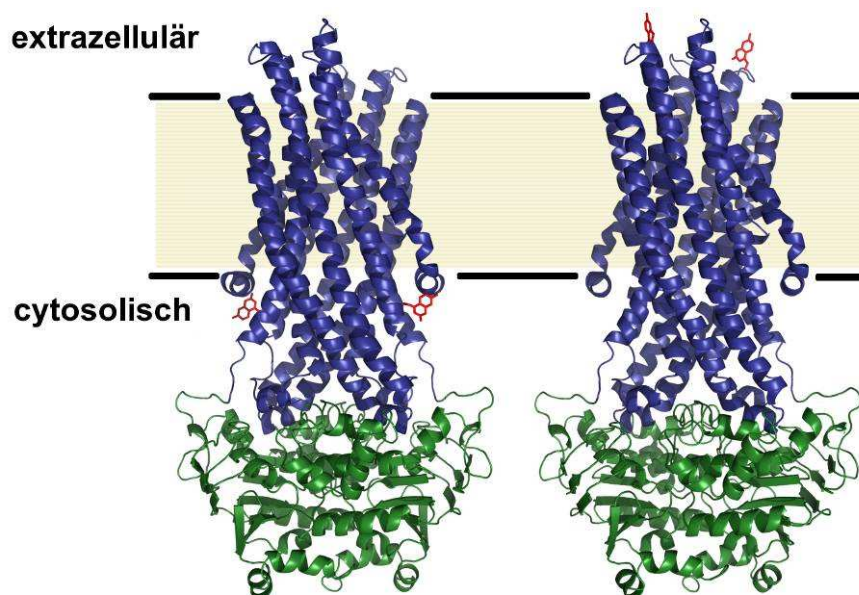


Abbildung 13: Modell der Markierung von LmrA mit 7-hydroxy-Coumaryl-Alanin an Position Threonin 109 (links) und Serin 287 (rechts). Hierbei liegt die erste Mutation in der ICD1 zwischen TM2 und TM3 und ist somit cytosolisch lokalisiert, während die letztere in der extrazellulären Schleife zwischen TM5 und TM6 liegt.

Für die Untersuchung der Substratbindungsstelle von LmrA wurde auf Grund einer Reihe von Publikationen (Poelarends und Konings 2002; Alqawi et al. 2003) TM6 gewählt. Auf Grundlage des Homologiemodells wurden deshalb in einem ersten Schritt 16 Aminosäuren in der TM6 für die Mutagenese ausgewählt.

In Abbildung 14 ist die innere Oberfläche des Proteins dargestellt und die ausgewählten Aminosäuren sind in magenta eingefärbt. Diese liegen eingerahmt von dem in ocker eingefärbt Aminosäuren, die den Kontakt zwischen den Monomeren vermitteln. Im von den beiden Monomeren gebildeten Hohlraum liegen die TM6 an gegenüberliegenden Seiten.

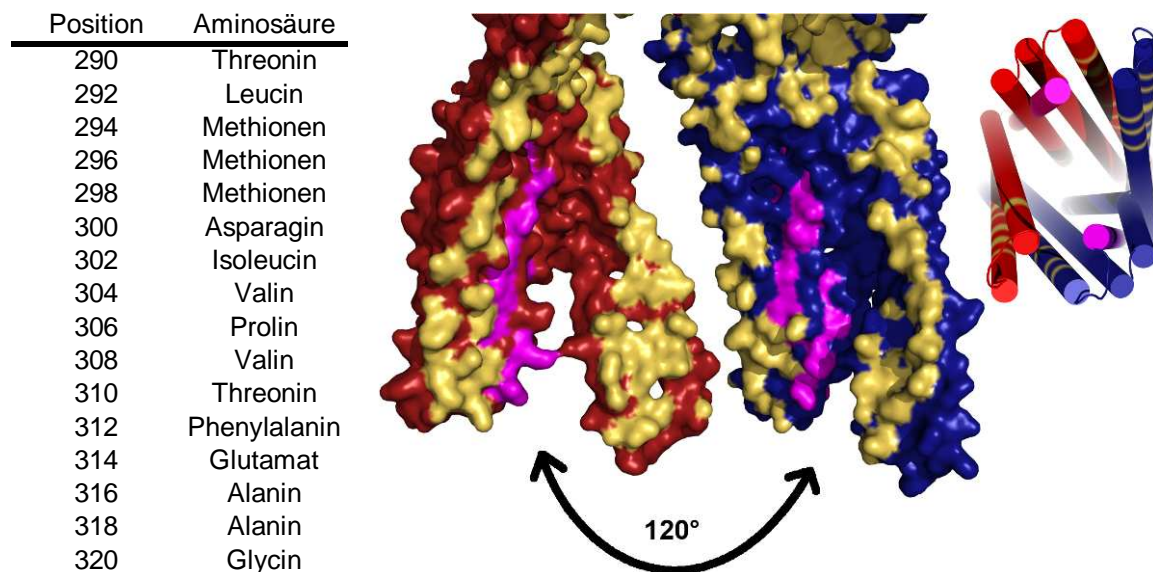


Abbildung 14: In der Transmembranhelix 6 (TM6) wurden die Kodons von 16 Aminosäuren gegen das Amber Stopp Kodon ausgetauscht. In der Tabelle sind alle Positionen aufgeführt mit der im Wildtyp vorkommenden Aminosäure. Die Abbildung rechts zeigt das Interface der beiden TMDs. Hierzu wurden die beiden Monomere um 120° gegeneinander gedreht. In rot und blau sind jeweils die verschiedenen Monomere eingefärbt, in ocker die Aminosäuren, die sich im Abstand von 5Å vom anderen Monomer befinden und in magenta die mutierten Aminosäuren in der TM6.

4.4 Etablierung der heterologen Expression von LmrA in *E. coli*

Die Expression von LmrA wurde auf *E. coli* übertragen, da nur hierfür das Expressionssystem für unnatürliche Aminosäuren zur Verfügung steht. Hierfür wurden drei Vektorsysteme verwendet: pBAD, pET16 und pET28. Auf Grund des schnelleren Klonierungserfolgs und erfolgversprechender erster Expressionen wurde das pBAD System für die Etablierung der heterologe Expression von LmrA verwendet. Für die Expression von LmrA wurden die *E. coli* Stämme BL21 und dessen Derivate C41 und C43, die speziell für die Expression von Membranproteinen optimiert sind, untersucht. Da sich die Induktionsstärke im pBAD System regulierbar ist, wurden drei verschiedene Induktorkonzentrationen (0,00002%, 0,002% und 0,2% Arabinose) verglichen. Für die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse wurde LmrA in 100ml Kulturen expremiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD von 0,6 mit den angegebenen Induktorkonzentrationen. Für die Analyse der Ganzzelllysate wurden nach 0, 1,5 und 4 h Äquivalente von jeweils einer OD abgenommen. In Abbildung 15 ist ein Western-Blot der entsprechenden Ganzzelllysate mit einem Penta-His-Antikörper gezeigt, der die Ergebnisse der Expressionsstudie gegenüberstellt.

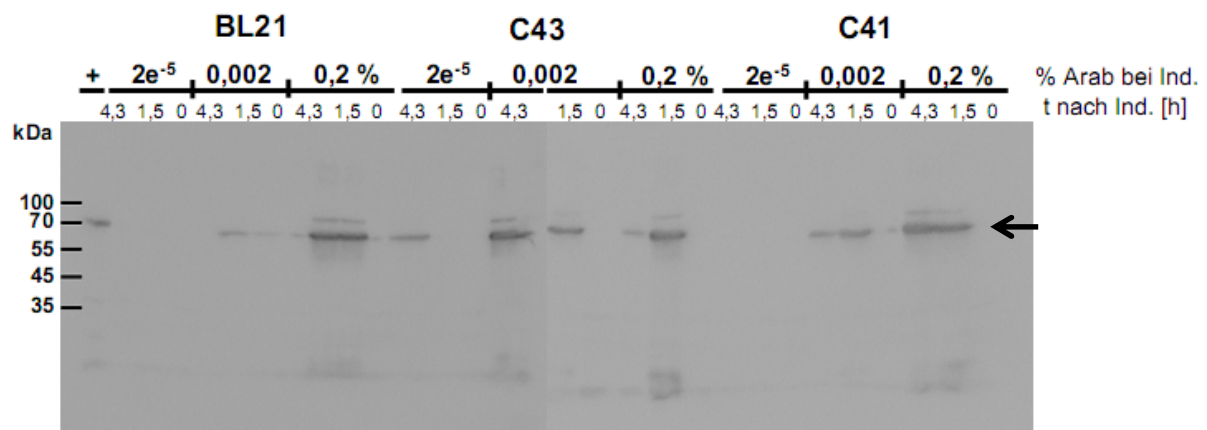


Abbildung 15: Expressionsstudie des Wildtyps in unterschiedlichen Expressionsstämmen (BL21, C41, C43) bei verschiedenen Induktorkonzentrationen (0,00002%, 0,002% und 0,2% Arabinose) nach unterschiedlichen Zeiten (0, 1,5 und 4 h nach Induktion).

Es ist deutlich eine Bande (Pfeil), die dem Molekulargewicht von LmrA entspricht, zu erkennen. Im Vergleich der drei Stämme gibt es keine signifikanten Unterschiede im maximalen Expressionniveau. Jedoch bei der mittleren Induktorkonzentration zeigen die beiden Stämme C41 und C43 die stärkere Expression. Auf Grund dessen und seiner voraussichtlich besseren Eignung für die Expression von LmrA als Membranprotein, wie LmrA, wurde der Stamm C43 gewählt. Für die Induktorkonzentration wurde 0,2% Arabinose gewählt.

4.5 Generierung der LmrA Mutanten und ihre Expression

Der nächste Schritt nach der erfolgreichen heterologen Expression von LmrA, war die Generierung der Mutanten in der TM6 und die Etablierung der Expression von LmrA mit unnatürlicher Aminosäure.

Zu diesem Ziel wurden an ausgewählten Positionen (siehe Abbildung 14 bzw. Tabelle 3) Amber Stopp Kodons in LmrA eingefügt. Die qualitative Überprüfung erfolgte durch Sequenzierung. Die im Laufe dieser Arbeit erstellten Konstrukte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Klone von LmrA.

| Vector | Position | Name | Funktion |
|--------|----------|-----------|--|
| pET16 | wt | | Wildtypkontrolle |
| pET28 | wt | | Wildtypkontrolle |
| pBad | wt | | Wildtypkontrolle |
| pBad | 109 | t109Amber | Lokalisation der Schleife zwischen TM2 und TM3 |
| pBad | 287 | s287Amber | Lokalisation der Schleife zwischen TM5 und TM6 |
| pBad | 290 | l292Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 292 | m294Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 294 | m296Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 296 | m298Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 298 | n300Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 300 | i302Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 302 | v304Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 304 | p306Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 306 | v308Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 308 | t310Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 310 | f312Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 312 | e314Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 314 | a316Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 316 | a318Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 318 | g320Amber | Untersuchung an der TM6 |
| pBad | 320 | t290Amber | Untersuchung an der TM6 |

Alle Konstrukte wurden in *E. coli* Zellen des Stammes C43 transformiert, die entweder ein Plasmid für den Einbau einer Coumarin-Aminosäure (pCouRS) oder eines Tyrosins (Kontrolle (pMjTyrRS) anstelle eines Amber Stopp Kodons, trugen. Insgesamt wurden 47 Klone für die Expression erzeugt.

Die Expression von LmrA Mutanten mit einem Amber Stopp Kodon zum Einbau unnatürlicher Aminosäuren wurde anhand *E. coli* C43 pMjTyr pBADLmrA S287Amber etabliert und später für alle generierte Mutanten gezeigt. Die Analyse der Expression aller Mutanten mit dem Kontrollplasmid mittels Western Blot ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Penta-His-Antikörpers.

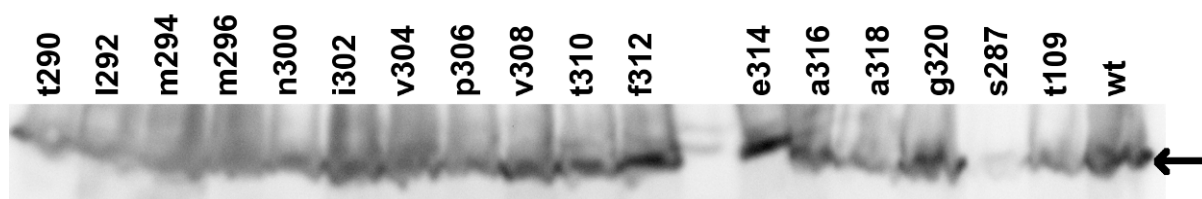


Abbildung 16: Western-Blot von Ganzzelllysaten der erzeugten LmrA Mutanten. Die Entwicklung erfolgte mit einem Penta-His-Antikörper.

Abbildung 16 zeigt für alle Mutanten eine Proteinbande mit gleichem Laufverhalten wie wt LmrA (letzte Bahn), welche dem Molekulargewicht von LmrA entspricht (siehe Pfeil). Die Expressionsniveaus der einzelnen Mutanten unterscheiden sich dabei nicht wesentlich, einzig die Mutante s287Amber zeigt in diesem Experiment eine deutlich schwächere Expression. Dies ist jedoch kein Problem, da in allen weiteren mit dieser Mutante durchgeführten Experimenten (siehe 3.4.3) beschriebene Reinigung, ein mit den anderen Mutanten vergleichbares Expressionsniveau erreicht wurde.

4.6 Aufreinigung von LmrA aus *E. coli*

Die effiziente Reinigung ist eine Grundvoraussetzung für biophysikalische Experimente mit Proteinen als Untersuchungsobjekt. Aus diesem Grund war nach der heterologen Expression ein Reinigungsprotokoll zu etablieren.

Hierzu wurde das grundsätzliche Vorgehen der Reinigung von LmrA aus *L. lactis* (Hanekop 2006) übernommen und für die Anwendung auf *E. coli* wie in 3.4.3 beschrieben modifiziert. Membranen wurden durch differentielle Zentrifugation gewonnen, in FOS-Choline 16 solubilisiert und mit Hilfe des N-terminalen Hexa-His-Tags von LmrA via IMAC gereinigt. Abbildung 17 zeigt ein typisches Chromatogramm einer Reinigung von LmrA. Für die gezeigte Reinigung wurden *E. coli* C43 pMjTyr pBADLmrA S287Amber aus 2l Kulturvolumen verwendet. In diesem Klon wird an der Position des Amber Stopp Kodon (ausgetauscht gegen Threonin 287) ein Tyrosin eingebaut.

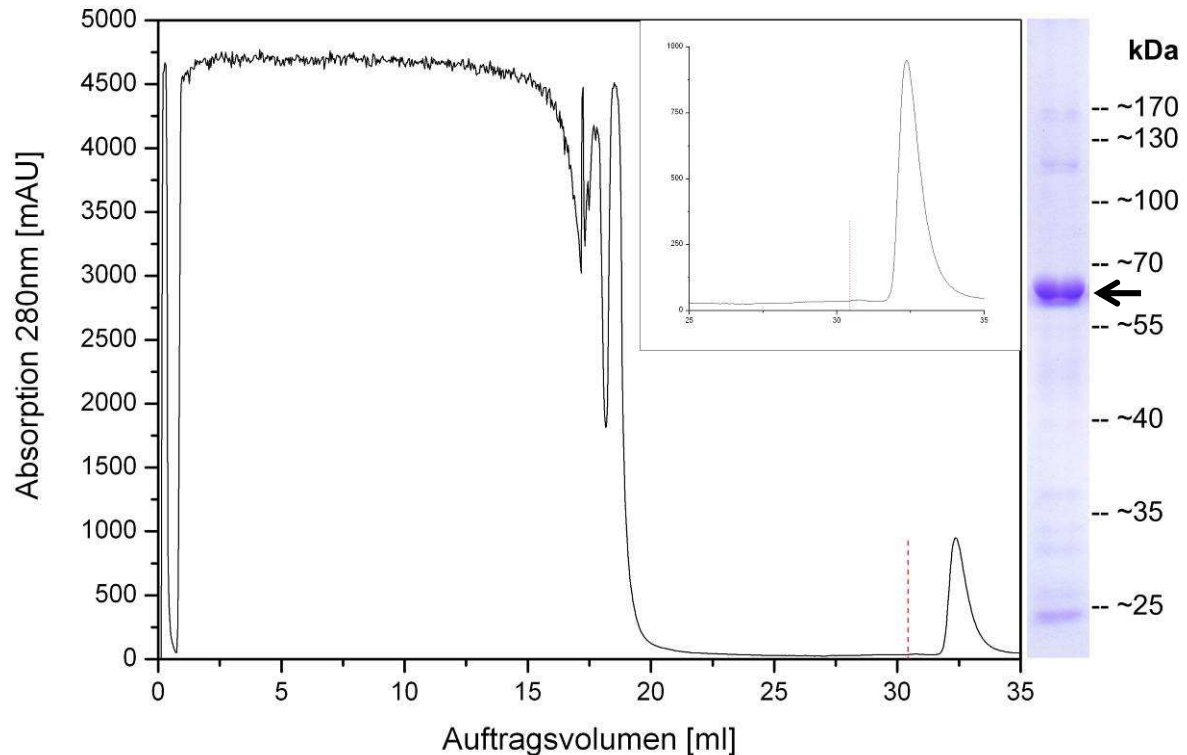


Abbildung 17: Typisches Chromatogramm der Reinigung von LmrA aus *E. coli*. Die rote gestrichelte Linie kennzeichnet den Beginn der Elution mit 250 mM Imidazol. In der Ausschnittvergrößerung ist die Elution vergrößert gezeigt. Das Coomassie gefärbte SDS-PAGE auf der rechten Seite zeigt die Peakfraktion. Der Pfeil kennzeichnet das Molekulargewicht von LmrA.

Die Peakfraktionen haben einen Gesamtproteingehalt von 1mg pro Liter Kulturvolumen. Der Pfeil markiert die, auf Grund der Größe von ~68kDa und der Sensitivität gegenüber einem Penta-His-Antikörper als LmrA identifizierte Bande. Die deutliche Dominanz dieser Bande zeigt den guten Reinigungserfolg, jedoch bedarf es auf Grund der zusätzlichen Banden noch weiterer Optimierung.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Grundlagen für die biophysikalische Untersuchung der Substratbindungsstelle des ABC-Transporters LmrA aus *L. lactis* zu schaffen. Hierzu wurde in einem ersten Schritt ein Homologiemodell von LmrA erzeugt. Auf Grundlage einer Reihe von Studien (Poelarends und Konings 2002; Alqawi et al. 2003) an LmrA wurden Aminosäurepositionen identifiziert werden, die erfolgversprechend für die Untersuchung der Substratbindungsstelle erschienen. Mit dem Ziel diese Positionen im Hinblick auf die Substratbindung näher charakterisieren zu können, wurde ein System etabliert, das den Einbau unnatürlicher Aminosäuren im Rahmen der Proteinbiosynthese erlaubt. Dies geschah, indem an der gewünschte Position in LmrA in ein Amber Stopp Kodon eingefügt wurde und den exprimierenden Zellen mit einem von der Gruppe von Prof. Schultz (Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA) entwickeltem System die genetische Information für eine passende tRNA (Amber Anti-Kodon), sowie eine tRNA-Aminoacyl-Transferase, die die tRNA mit der unnatürliche Aminosäure belädt, zur Verfügung gestellt wurde. Als unnatürliche Aminosäure ist zunächst eine Fluoreszenzsonde geplant, in späteren Studien sollen aber auch Fluoreszenzquenscher eingesetzt werden.

5.1 Das Homologiemodell von LmrA

Die Erstellung eines Homologiemodells für ein strukturell nicht charakterisiertes Protein erfordert die Struktur eines homologen Proteins oder einer Proteindomäne als Vorlage. Für ABC-Transporter sind nur wenige Strukturen gelöst worden, wovon nur Sav1866 ebenfalls ein ABC-Exporter ist und aus diesem Grund als Vorlage in Frage kommt. Wie in den Ergebnissen 4.1 beschrieben, eignet es sich auf Grund seiner deutlichen Homologie, die sich über die NBD hinaus auch in der TMD zeigt.

Das besondere Augenmerk beim Alignment von LmrA und Sav1866 lag auf den eingefügten Lücken (Abbildung 7). Betrachtet man die gezeigten Alignments in Abbildung 7 und 8, so ist eine deutliche Homologie in TM3-6 und in den NBDs zuerkennen. Bei den meisten entstandenen Lücken beschränkt sich die Größe der zusätzlichen Aminosäuren bzw. insertierten Lücken auf ein bis zwei Aminosäuren, welche dann in den Schleifenregionen lokalisiert sind. Sequenzunterschiede bei homologen Proteinen in Schleifenregionen sind oft zu beobachten, da sie die

Tertiärstruktur zumeist nicht stören. Schwieriger war die genau Positionierung der Lücke, die auf Grund der Längendifferenz zwischen Sav1866 zu LmrA (12 Aminosäuren) entstehen musste. Um dieses Problem zu lösen, wurden verschiedene Alignmentalgorithmen verwendet und deren Ergebnisse verglichen. Der deutliche Unterschied in den Alignments von ClustalW und dem in Modeller implementierten Algorithmus zeigt sich in der Lage dieser Lücke. Da die Alignments eine ähnliche Qualität aufwiesen, wurde die vorhergesagte Lage der Transmembrandomänen als weiteres Kriterium herangezogen. Diese zeigten eindeutig (Abbildung 7), dass im Alignment mit dem in Modeller implementierten Algorithmus Aminosäuren der TM1 von Sav1866 polaren Resten von LmrA, sowie Reste der möglichen TM1 von LmrA der ersten extrazellulären Schleife von Sav1866 zugeordnet waren. Mit ClustalW hingegen stimmt das Alignment für die vorhergesagten Transmembrandomänen der beiden Proteine wesentlich besser überein. Obwohl solche Vorhersagen keine absolute Lokalisation anzeigen, erscheint das Alignmentergebnis von ClustalW wahrscheinlicher. Dies führt zu einer 19 Aminosäure großen, N-terminalen Domäne bei LmrA, die Sav1866 nicht besitzt und über die daher mittels Homologiemodellierung keine strukturelle Vorhersage gemacht werden kann. Das von ClustalW erzeugte Alignment war jedoch an einer anderen Stelle unwahrscheinlich, da eine 3 Aminosäure große Lücke in die TM2 von LmrA eingefügt wurde, was im Modell zu einem Bruch in der Helix führte. Zur Vermeidung eines Bruchs in der Helix, wurde die Lücke manuell verschoben, da eine Insertation außerhalb eines sekundärstruktur Elements wahrscheinlicher, als innerhalb eines solchen ist. Fraglich war nur die Richtung in die die Lücke verschoben werden sollte. Eine Verschiebung der Lücke vor die Helix hätte zur weiteren Verkürzung der extrazellulären Schleife geführt, sodass die TM1 und TM2 nur durch eine sehr kurze Schleife verbunden worden wären. Eine solche Verschiebung wurde in ein kürzlich veröffentlichten Homologiemodellierung von LmrA (Federici et al. 2007) durchgeführt. Bei ihnen verkürzte sich die Schleife um 11 Aminosäuren gegenüber Sav1866. Um diese Verringerung der Flexibilität zu umgehen, wurde in dem vorliegenden Homologiemodell die Lücke in die ICD1 verschoben. Dies führte jedoch zu einer Verkürzung der ICD um eine Helixwindung. Dies hatte zur Folge dass sich entweder die Lage des mittleren Segments der ICD1 verändert würde oder, wie es in unserem Modell realisiert, die Helixstruktur nicht aufrecht erhalten werden konnte. Daher wird die Struktur an dieser Stelle keine realitätsgetreue Darstellung von LmrA sein. Dies

zeigt ein großes Problem von Homologiemodellierung auf. Grundlage für jedes Modell ist die Struktur der Vorlage und die Homologie zu dieser. Daher sind die Strukturen in nicht homologen Bereichen sehr kritisch zu betrachten, da sie nur auf wenigen oder keinen experimentellen Daten der Vorlage beruhen. Die Unterschiede der Alignments in den äußeren Bereichen des Proteins (TM1 und TM2) deuten auf strukturelle Unterschiede hin, weshalb die Erstellung eines verlässlichen Modells hier schwierig ist. Da jedoch, wie aus biochemischen Untersuchungen bekannt die TM6 die wichtigsten Aminosäuren für den Transport enthält, ist für die geplante Verwendung des Homologiemodells die Ungenauigkeit auf der Außenseite gegenüber dem optimalen Berechnung des Homologiemodells im Bereich der TM6 zu vernachlässigen. Eine Modellierung dieses Bereichs führt daher zu einem Modell was die Architektur von Sav1866 nahezu komplett übernimmt. Betrachtet man den Bereich im Alignment zwischen der ICD1 und der NBD, so zeigt sich ein hohes Maß an Homologie der Aminosäuren, was für die Annahme, dass Sav1866 eine geeignete Vorlage ist, sowie für die Qualität des Modells spricht. Die Qualität des Modells belegen biochemische Untersuchungen an LmrA. In Abbildung 12 visualisiert sind die strukturellen und funktionalen Ergebnisse der Arbeit von Poelarends und Konings (2002). Die biochemischen Daten lassen sich dabei sinnvoll mit dem Modell erklären. So liegen alle intrazellulär lokalisierten Reste zwischen der „ellbow helix“, die nach Dawson und Locher (2006) die cytoplasmatische Seite der Plasmamembran kennzeichnet, und der NBD. In ungefähr 50Å Abstand darunter sind die membranständigen Reste lokalisiert, gefolgt von den extrazellulären Resten auf der Außenseite des Transporters. Die sich in einer Transmembranhelix befindlichen Reste, die eine Lösungsmittelzugänglichkeit zeigen, ragen dabei in den von Poelarends und Konings (2002) postulierten wassergefüllten Hohlraum zwischen den beiden Monomeren. Dieser ist, wie anhand der Abbildung 14 gut zu erkennen, auch im Homologiemodell von LmrA vorhanden. Die einzige Ausnahme bildet die Aminosäure Leucin174, die in der Schleife zwischen TM3 und TM4 lokalisiert ist und nach Poelarends und Konings (2002) zu den extrazellulären Aminosäuren zählt. Denn im Homologiemodell liegt sie in direkter Nachbarschaft zu den membranständigen und nicht wasserzugänglichen Aminosäuren 291 und 294. Da sie jedoch auf Höhe der für den Transport wichtigen Aminosäuren in der TM6 in der Membran liegt, könnten konformationelle Änderungen in diesen Bereichen, für die

Wasserzugänglichkeit von Leucin174 verantwortlich sein. Eine genaue Erklärung für die beschriebene Diskrepanz kann nur die strukturelle Aufklärung von LmrA liefern. Die von Poelarends und Konings (2002) gewonnenen funktionellen Daten lassen sich insgesamt schlechter mit dem Homologiemodell erklären. Jedoch erscheint ein Funktionsverlust bei Mutation der Reste in der TM6 auf Grundlage des Modells durchaus plausibel.

Betrachtet man das Modell in Hinblick auf die strukturellen und funktionellen Ergebnisse aus der Arbeit von Federici et al. (2007), so lassen sich diese auf gleiche Weise erklären, wie anhand des in der Veröffentlichung verwendeten Modells. Die vier untersuchten Reste (S282, M58, E314 und A208) liegen trotz der Unterschiede im Alignment an strukturell gleichen Positionen. Dies zeigt auch die große Ähnlichkeit der Gesamtstruktur. Die zu beobachtende Analogie unterstreicht die Qualität des erstellten Homologiemodells für LmrA.

5.2 Auswahl weiterer Aminosäure-Reste zur Lokalisation der Substratbindungsstelle

Auf Grund der Wichtigkeit der Aminosäuren in der TM6 für die Funktionalität des Transporters (Poelarends und Konings 2002; Alqawi et al. 2003) und der Übereinstimmung mit dem Homologiemodell, wurden die Aminosäuren der TM6 als primäres Untersuchungsobjekt identifiziert. Um die Anzahl der Mutanten nicht zu groß werden zu lassen wurden zuerst 16 der 30 die membrandurchspannenden Aminosäuren gewählt. Um einen möglichst großen Anteil abzudecken, wurde jede zweite Aminosäure der TM6 gewählt. Hierdurch werden Bereiche, wie auch gut in Abbildung 14 zu erkennen ist, ausgespart. Daher stellen die gewählten Positionen nur ein erstes Raster dar, um die Substratbindungsstelle von LmrA zu lokalisieren. Optimal an der Lage ist jedoch die Abdeckung der gesamten Innenseite des wassergefüllten Hohlraumes zwischen den beiden Transporterhälften auf Grund der spiegelbildlichen Lokalisation. Was jedoch nicht abgedeckt ist, ist die cytoplasmatische Teil Innerenmembran, der sowohl nach dem Flippase- als auch nach dem „hydrophobic vacuum cleaner“-Modell für den Eintritt der Substrate verantwortlich zu sein scheint. Daher wären Mutanten in dieser Region für eine weitere Untersuchung der Substratbindungsstelle von LmrA von großem Interesse.

5.3 Heterologe Expression von LmrA und Einbau unnatürlicher Aminosäuren

Für die Markierung von Protein durch die Erweiterung des genetischen Kodes musste das genetische Repertoire des Expressionsorganismus um die benötigte tRNA und ihre Aminoacyl-Transferase erweitert werden. Die Expression von LmrA musste daher auf die heterologe Expression in *E. coli* übertragen werden, da nur hierfür das Expressionssystem zur Verfügung steht. Aus diesem Grund musste zuerst die heterologe Expression von LmrA etabliert werden. Die zwei grundlegenden Arbeitsschritte waren der Gentransfer in einen Expressionsvektor für *E. coli* und damit die Wahl des Expressionssystems, sowie Entscheidung für einen geeigneten Expressionsstamm. Als Expressionssysteme wurden das pET System und das pBAD System gewählt, wobei wegen des schnelleren Klonierungserfolgs und der erfolgsversprechenden ersten Expressionsergebnisse, die Expressionsstudien mit dem pBAD System durchgeführt worden. Zwar hat sich dies bis jetzt nicht experimentell gezeigt, da alle Expression im Rahmen dieser Arbeit am Kontrollsystem durchgeführt (Einbau eines Tyrosins), jedoch könnte die gute Regulierbarkeit des Arabinose induzierbaren pBAD Systems Vorteile bei der Integration von unnatürlichen Aminosäuren bringen. Da die Expression auf eine definierte intrazelluläre Konzentration der Aminosäure angewiesen ist, könnte eine weniger starke jedoch längere Expression eine höhere Ausbeute.

Die Expressionsstudien mit wt LmrA in den *E. coli* Stämmen BL21, sowie dessen Derivaten C41 und C43, haben eine positive Abhängigkeit von der Induktorkonzentration gezeigt. So steigt in allen Stämmen das Expressionniveau mit der Induktorkonzentration. Da sich die maximale Expression nicht gravierend unterschied, fiel die Entscheidung für den Stamm C43 auf Grund seiner besonderen Eignung für die Expression von Membranproteinen. Eine Besonderheit des gewählten *E. coli* Stammes liegt in der starken Ausbildung von intrazellulären Membranstapeln in den sich große Mengen an Protein sammeln können ohne die Integrität der Plasmamembran zu stören (Arechaga et al. 2000). Wichtig für die spätere Reinigung ist jedoch die effiziente Isolierung der Membranen durch differentielle Zentrifugation. Ein Problem dieser eigentlich erwünschten Membranmenge, ist ihre hohe Dichte. Es ist somit schwierig, sie mit Zentrifugationsschritten quantitativ von nicht aufgeschlossenen Zellen zu trennen. Der große Reinheitsgewinn durch die differentielle Zentrifugation kann damit

entweder nicht ganz ausgenutzt werden oder geht zu Lasten der Gesamtausbeute an exprimiertem Protein. Als Optimierung wäre daher auch die Wahl des Ursprungsstammes BL21 zu erwägen, da hier die Dichte der Membranen geringer ist und damit die Gewinnung besser funktioniert. Des Weiteren unterscheidet sich das Expressionsniveau, zumindest für den Wildtyps, nicht gravierend zu dem Stamm C43.

Die erfolgreiche Expression von wildtyp LmrA in *E. coli* ließ den Versuch der markierten Expression zu. Hierbei wurden die LmrA Mutanten im *E. coli* Stamm C43 mit dem Kontrollplasmid pMjTyr exprimiert. Wie aus dem in Abbildung 16 dargestellten Western Blot zu entnehmen ist, lassen sich alle generierten Mutanten mit dem Kontrollplasmid exprimieren. Hiermit war die grundsätzliche Etablierung der Markierung mit Hilfe eines erweiterten genetischen Kodes erfolgreich. Daran anschließend kann die Markierung mit einer unnatürlichen Aminosäure durchgeführt werden. In diesem System können mehrere Probleme auftreten, die eine weitere intensive Optimierung zur Folge haben können. Wie schon in Wang et al. (2006) für Myoglobin gezeigt, erniedrigt sich die Expressionsausbeute bei der Markierung mit Coumarylalanin drastisch. Dieser Effekt wird sich vermutlich bei der Expression von Membranproteinen noch verstärken. Dies macht notwendig, dass die Expressionsbedingung weiter optimiert werden müssen. Da die Expression von der intrazellulären Konzentration der unnatürlichen Aminosäure und damit von dem Import oder der Diffusion in die Zelle, abhängig ist, wäre eine Möglichkeit, die Expression zu verlangsamen, sodass immer eine ausreichende Menge vorhanden ist. Dies kann wegen der Regulierbarkeit des pBAD Systems durch Erniedrigung der Induktorkonzentration erzielt werden. Eine Erniedrigung der Temperatur während der Expression würde des Weiteren den Metabolismus verlangsamen und somit Wachstum und Proteinbiosynthese verzögern.

Ein weiterer Ansatz die Expression zu optimieren, könnte eine Anpassung des Kodongebrauch an den Expressionsorganismus sein. In der Gensequenz von LmrA befinden sich sieben Kodons, die in *E. coli* mit nur einer geringen Häufigkeit verwendet werden. Durch den Austausch dieser Kodons gegen andere Kodons könnte die Verfügbarkeit der benötigten tRNAs und somit die Expression erhöht werden.

5.4 Reinigung von LmrA aus *E. coli*

Ein weiterer Schritt zur biophysikalischen Charakterisierung der Substratbindungsstelle von LmrA, war es eine effiziente Reinigung zu etablieren. Diese wurde exemplarisch an *E. coli* C43 pMjTyrRS pBADLmrA s287Amber durchgeführt. Wie aus Abbildung 17 ersichtlich, führt eine Adaption der Reinigung von LmrA aus *L. lactis* (Hanekop 2006) an *E. coli* zu einer für Membranproteine vergleichsweise hohen Ausbeute von 0,5-1mg/l Kulturvolumen an LmrA. Da sich die Reinigung auf nur zwei Schritte beschränkt, Membranisolation und IMAC, ist hier noch ein großes Potential an Reinheitsoptimierung möglich. Hierbei sind vor allem die grundlegenden Schritte einer Präparation von Membranproteinen zu bedenken: die Wahl des geeigneten Detergenz und die optimale Methode der Solubilisierung (Konzentration, Zeit und Temperatur). Die Optimierung dieser Parameter beeinflusst die Menge und Zusammensetzung des solubilierten Proteins. Da das verwendete Protokoll für die Reinigung aus einem gram-positive Bakterium übernommen wurde, dessen Lipidzusammensetzung sich von der in *E. coli* unterscheidet, könnte die Optimierung des Detergenz die Reinheit des solubilierten Proteins ändern. Des Weiteren kann der Wechsel des Detergenz einen Einfluss auf die Aktivität haben. Im Vorfeld zur Optimierung der Reinigung, ist somit eine genau Untersuchung des Solubilisierungsgrades und Erhalt der Aktivität in Abhängigkeit vom Detergenz zu untersuchen. Möglich ist jedoch, dass der eventuelle Aktivitätsverlust durch die andere Lipidzusammensetzung der *E. coli* Membranen kommt und während der Solubilisierung und Reinigung Lipide aus *L. Lactis* zugesetzt werden müssen.

Aber auch an den weiteren Reinigungsmethoden sind noch Optimierungen vorzunehmen. Hier sind eigentlich alle Parameter einer IMAC zu nennen, Puffer, Geschwindigkeit des Auftrags, Waschen, sowie Elution. Ein grundsätzlicher Vorteil von Affinitätsreinigungen ist die Erhöhung Reinheit des Proteins in einem Schritt und damit die Vermeidung vieler Schritt mit hoher Verlustrate. Wie die durchgeführte Reinigung zeigt ist die Reinheit des Proteins schon stark verbessert, jedoch ist für die angestrebten Experimente eine höhere Reinheit erforderlich. Die Optimierung der IMAC würde diese stark verbessern. Hier sind vor allem der Gradient der Konzentration von Imidazol in den Wasch- und Elutionsschritten zu verbessern. Sollte die erzielte Reinheit nicht ausreichen, sind weiter chromatographische Schritte denkbar. Diese verringern jedoch die Ausbeute von markiertem Protein durch jeden weiteren Schritt, was bei den zu erwartenden Expressionsmengen nicht

erstrebenswert ist. Hier wären unter anderem die Größenausschlußchromatografie zu nennen, welche durch Abtrennung von monomeren LmrA, eine einheitliche Präparation zur Folge hätte.

6 Ausblick

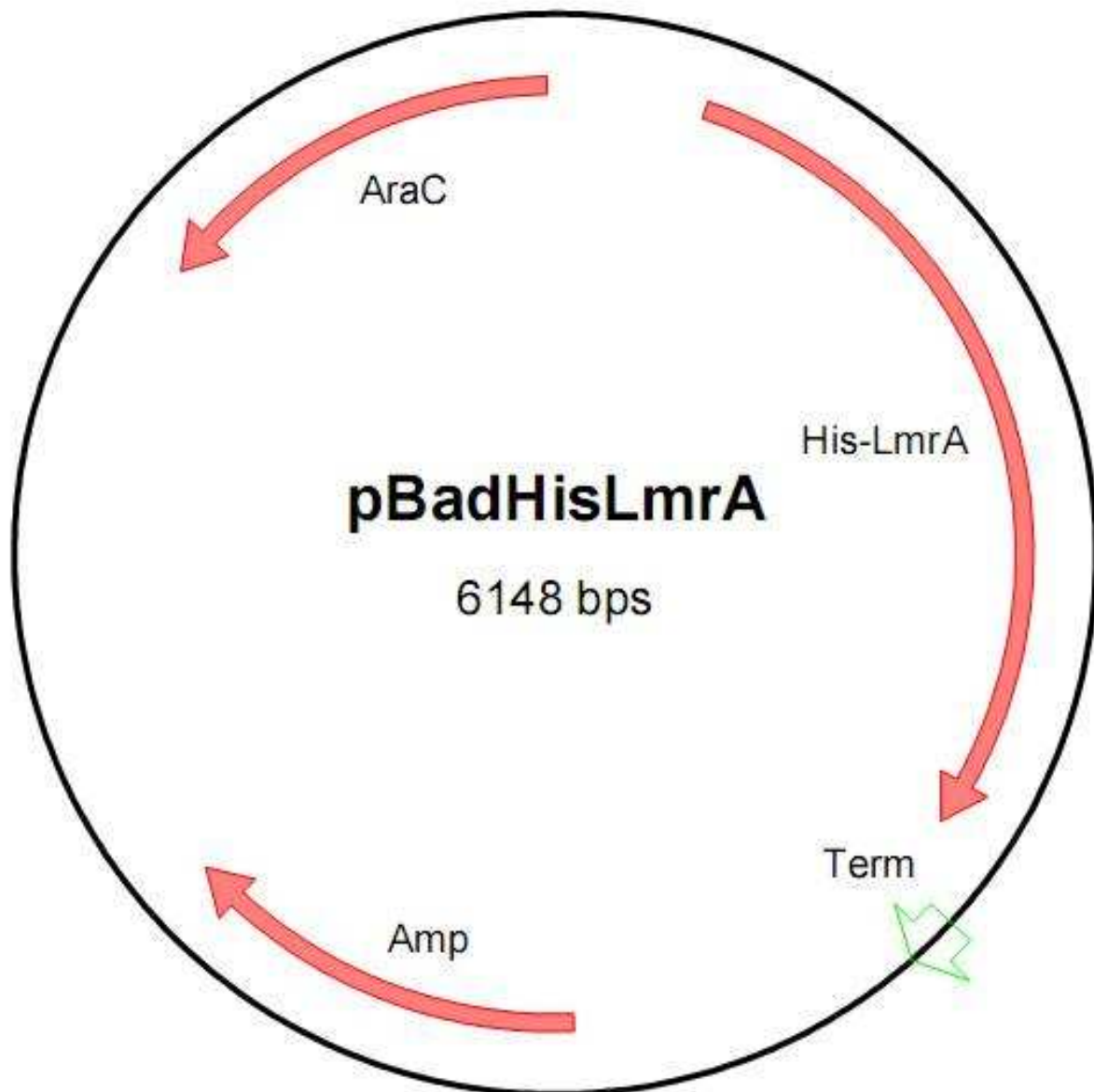
In weiteren Arbeiten sind zusätzliche Grundlagen für die biophysikalische Charakterisierung der Substratbindungsstelle von LmrA zuschaffen. Als direkte Folge der vorliegenden Arbeit ist eine Optimierung der Reinheit und Überprüfung auf ATPase (stimuliert und nicht stimuliert) des heterolog gewonnen Protein. Ein weiterer Schritt ist die finale Markierung durch Einbau der gewünschten artifiziellen Aminosäure, sowie dessen Reinigung.

Endgültiges Ziel ist die Charakterisierung Substratbindungsstelle, um der Rolle im Transportzyklus zu verstehen. Ein Transport kann nur in einem Mehrkomponentensystem gemessen werden. Somit muss ein erfolgreiches Rekonstitutionsprotokoll von LmrA in Liposomen mit dazugehörigen Transportuntersuchungen etabliert werden. Hierzu gehören auch die Bestimmung von geeigneten Substraten, sowie Inhibitoren für LmrA.

7 Anhang

7.1 Plasmid Karten

7.1.1 pBadLmrA

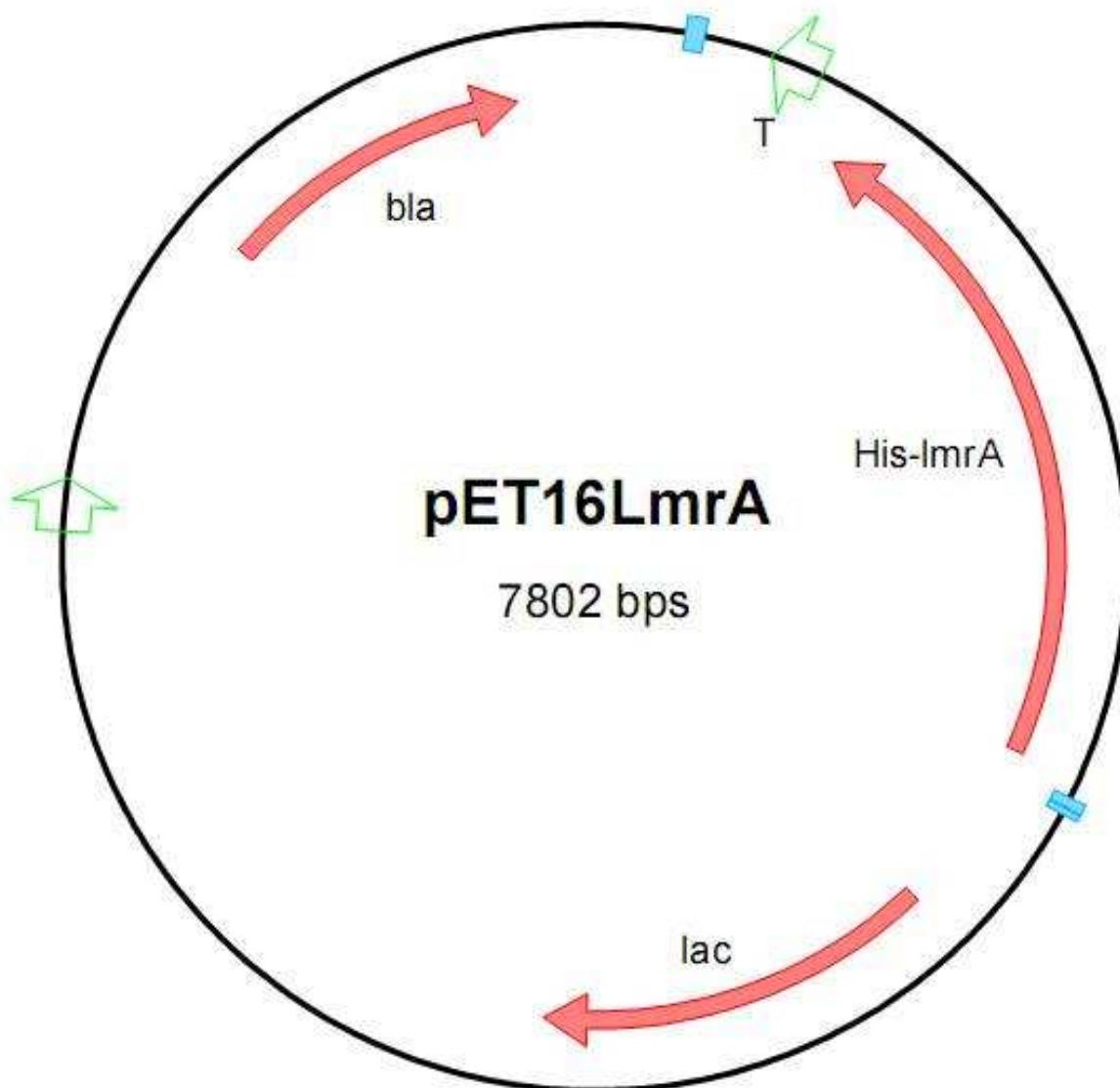


Molecule: pBADHisLmrA, 6148 bps DNA Circular

Description: Ligation of LmrA_gene into pBadHis_linearisiert_NcoI_XhoI

| Feature | Start | Ende |
|----------|-------|------|
| His-LmrA | 319 | 2130 |
| Term | 2320 | |
| Amp | 3035 | 3895 |
| AraC | 6131 | 5244 |

7.1.2 pEt16aLmrA

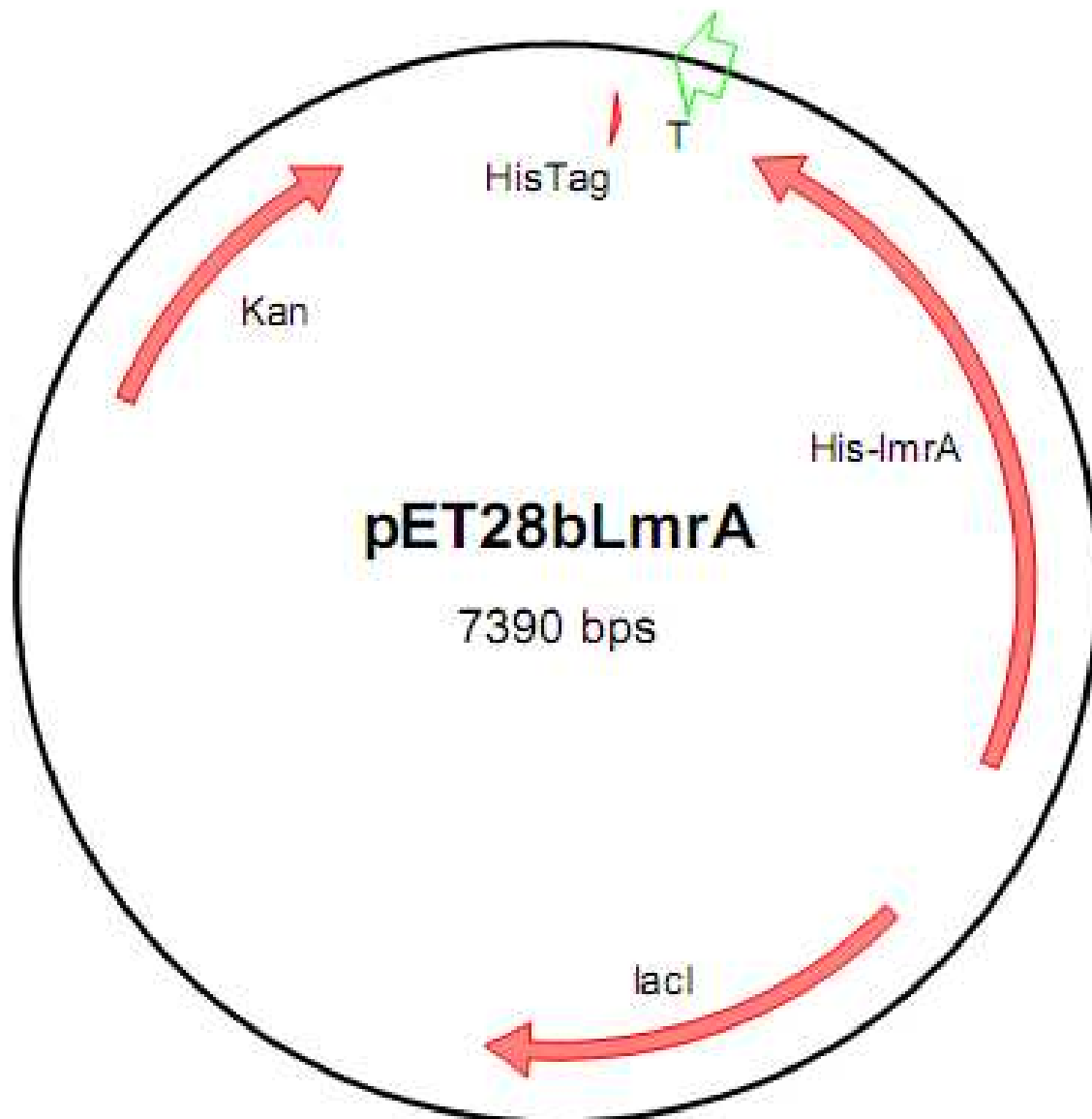


Molecule: pET16LmrA, 7802 bps

Description: Ligation of inverted LmrA_gene into pet 16a_linearisiert_NcoI_XhoI

| Feature | Start | Ende |
|---------------|-------|------|
| T7 Terminator | 213 | 259 |
| Terminator | 485 | |
| His-LmrA | 2483 | 675 |
| lac Operator | 2530 | 2554 |
| T7 Promotor | 2557 | 2573 |
| lac | 2960 | 4039 |
| ori | 5976 | |
| bla | 6743 | 7594 |

7.1.3 pET28bLmrA



Molecule: pET28bLmrA, 7390 bps

Description: Ligation of inverted LmrA_gene into pET28b_linearisiert_NcoI_XhoI

| Feature | Start | Ende |
|---------------|-------|------|
| T7 Terminator | 213 | 259 |
| Terminator | 319 | |
| His-LmrA | 2317 | 509 |
| T7 Promotor | 2557 | 2573 |
| <i>lacI</i> | 2761 | 3876 |
| <i>ori</i> | 5976 | |

7.2 Modellerskripte

7.2.1 make_model.py

```
from modeller import *
from modeller.automodel import *

log.very_verbose()
env = environ()
a = automodel(env, alnfile='sav1866_LmrA.ali',
              knowns='2hydA', sequence='LmrA')
a.starting_model = 1
a.ending_model = 50
a.final_malign3d = True
a.md_level = refine.slow
a.make()
# Get a list of all successfully built models from a.outputs
ok_models = filter(lambda x: x['failure'] is None, a.outputs)

# Rank the models by DOPE score
key = 'DOPE score'
ok_models.sort(lambda a,b: cmp(a[key], b[key]))

# Get top model
m = ok_models[0]
print "Top model: %s (DOPE score %.3f)" % (m['name'], m[key])
```

7.3 Referenzen

- Alqawi, O., G. Poelarends, et al. (2003). "Photoaffinity labeling under non-energized conditions of a specific drug-binding site of the ABC multidrug transporter LmrA from *Lactococcus lactis*." Biochem Biophys Res Commun **311**(3): 696-701.
- Altenberg, G. A., C. G. Vanoye, et al. (1994). "Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4654-7.
- Arechaga, I., B. Miroux, et al. (2000). "Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F(1)F(o) ATP synthase." FEBS Lett **482**(3): 215-9.
- Bergseid, M., B. Scott, et al. (1991). "A high fidelity thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus jiriosus*." Strategies in Molecular Biology **4**: 34-35.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Blake, M. S., K. H. Johnston, et al. (1984). "A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots." Anal Biochem **136**(1): 175-9.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Chang, G., C. B. Roth, et al. (2006). "Retraction." Science **314**(5807): 1875.
- Chung, C. T., S. L. Niemela, et al. (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-5.
- Dawson, R. J. und K. P. Locher (2006). "Structure of a bacterial multidrug ABC transporter." Nature **443**(7108): 180-5.
- Federici, L., B. Woebking, et al. (2007). "New structure model for the ATP-binding cassette multidrug transporter LmrA." Biochem Pharmacol **74**(5): 672-678.
- Gasteiger, E., A. Gattiker, et al. (2003). "ExpPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis." Nucleic Acids Res **31**(13): 3784-8.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Hanekop, N. (2006). Strukturbiologische Charakterisierung des ABC-Transporters LmrA aus *L. lactis* und des Substratbindepoteins EhuB aus *S. meliloti*. Institut für Biochemie. Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt.
- Hanrahan, J. W., M. Gentsch, et al. (2002). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ABCC7)." ABC Proteins: From Bacteria to Man: 589–618.
- Higgins, C. F. und M. M. Gottesman (1992). "Is the multidrug transporter a flippase?" Trends Biochem Sci **17**(1): 18-21.
- Higgins, C. F. u. L., K.J (2003). ABC transporters: an introduction and overview. ABC proteins: from bacteria to man. I. B. Holland, Cole, S.P., Kuchler, K. und Higgins, C.F. (eds.), Academic Press, Amsterdam.
- Juliano, R. L. und V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-62.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.

- Lovell, S. C., I. W. Davis, et al. (2003). "Structure validation by C α geometry: phi,psi and C β deviation." Proteins **50**(3): 437-50.
- Margolles, A., M. Putman, et al. (1999). "The purified and functionally reconstituted multidrug transporter LmrA of *Lactococcus lactis* mediates the transbilayer movement of specific fluorescent phospholipids." Biochemistry **38**(49): 16298-306.
- Matsuo, M., K. Ueda, et al. (2003). "The sulfonyleurea receptor: an ABC transporter that acts as an ion channel regulator." ABC Proteins from Bacteria to Man: 551–575.
- McClelland, M. und M. Nelson (1992). "Effect of site-specific methylation on DNA modification methyltransferases and restriction endonucleases." Nucleic Acids Res **20 Suppl**: 2145-57.
- Miroux, B. und J. E. Walker (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." J Mol Biol **260**(3): 289-98.
- Notredame, C., D. G. Higgins, et al. (2000). "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." J Mol Biol **302**(1): 205-17.
- Poelarends, G. J. und W. N. Konings (2002). "The transmembrane domains of the ABC multidrug transporter LmrA form a cytoplasmic exposed, aqueous chamber within the membrane." J Biol Chem **277**(45): 42891-8.
- Poirot, O., E. O'Toole, et al. (2003). "Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments." Nucleic Acids Res **31**(13): 3503-6.
- Raviv, Y., H. B. Pollard, et al. (1990). "Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells." J Biol Chem **265**(7): 3975-80.
- Ryu, Y. und P. G. Schultz (2006). "Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in *Escherichia coli*." Nat Methods **3**(4): 263-5.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Sali, A. und T. L. Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." J Mol Biol **234**(3): 779-815.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Saurin, W., M. Hofnung, et al. (1999). "Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters." J Mol Evol **48**(1): 22-41.
- Stryer, L. (2002). Biochemistry. Fifth, New York: Freeman & Co.
- Studier, F. W. und B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-30.
- van Veen, H. W., R. Callaghan, et al. (1998). "A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene." Nature **391**(6664): 291-5.
- van Veen, H. W., K. Venema, et al. (1996). "Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10668-72.
- Wang, J., J. Xie, et al. (2006). "A genetically encoded fluorescent amino acid." J Am Chem Soc **128**(27): 8738-9.
- Wang, L., A. Brock, et al. (2001). "Expanding the genetic code of *Escherichia coli*." Science **292**(5516): 498-500.

Xie, J. und P. G. Schultz (2006). "A chemical toolkit for proteins--an expanded genetic code." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(10): 775-82.

Danksagung

Mein Dank geht an

Herrn Prof. Lutz Schmitt,
für die Unterstützung und Möglichkeiten, die ich an seinem Institut erfahren habe

Nils Hanekop,
für seine Betreuung, seine Loyalität und seine Geduld mit mir

Stefan, dem Retter aller Diplomanten,
*für seine Hilfe bei allen Problemen und in allen Lebenslagen (auch 50 Meter überm
Boden!)*

Jan,
für seine immer verlässliche Hilfe

dem Rest der Membrane Transport Group
für ihre Akzeptanz am Institut und die Beantwortung aller meiner Fragen

der „alten“ Weiss Abteilung,
dass ihr mich von Anfang herzlich aufgenommen habt

Kathi, meiner Frau!!!,
*dafür, dass ich mit Ihr nicht nur qualifizierte Fachgespräche in der Badewanne führen
kann!!!*

Herrn Prof. Hanns Weiss und PD Dr. Ulrich Schulte,
für Etablierung des Biochemie Studienganges an der Universität Düsseldorf

meinen Geschwistern Maria, Johann und Jakob,
*die mir, obwohl ich andauernd schlaflose Nächte wegen ihnen hab, mir doch das
wichtigste sind.*

Eidesstattliche Erklärung

zur Masterarbeit

Hiermit versichere ich, dass die Diplomarbeit selbständig und lediglich unter Benutzung der

angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Ich versichere außerdem, dass die vorliegende Arbeit noch nicht einem anderen Prüfungsverfahren zugrunde gelegen hat.

Ich bin damit einverstanden, dass ein Exemplar meiner Diplomarbeit in der Bibliothek ausgeliehen werden kann.

Düsseldorf, den 20.10.2007

_____.

(Justin Schmitz)