

Protein-Protein Wechselwirkungen des bakteriellen mechanosensitiven Kanals MscL

Zur Erlangungen des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) – Universitätsbereich
genehmigte

DISSERTATION

von

Master Biologin Tamta Turdzeladze

**aus Samtredia
(Georgien)**

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse
Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich
Korreferent: Prof. Dr. Burkhard Luy
Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2010

Ich versichere hiermit wahrheitsgemäß, die Arbeit bis auf die dem Aufgabensteller bereits bekannte Hilfe selbständig angefertigt zu haben, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben, sowie alles kenntlich gemacht zu haben, was aus arbeiten anderer unverändert oder mit Änderungen übernommen wurde.

Karlsruhe, den 3.11.10

Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich all denen aussprechen, die mir beim Zustandekommen der vorliegenden Arbeit Hilfestellung geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Anne S. Ulrich für die Auswahl eines spannenden Themengebietes, das meine Fähigkeiten in empirischer Forschung gefördert hat.

Dr. Birgid Langer möchte ich für die mir zur Verfügung gestellte Zeit, um mich meiner Arbeit widmen zu können, besonders danken.

Dr. Stephan Grage danke ich für seine Unterstützung während der gesamten Zeit und immer ein Ohr für meine Probleme oder Ideen gehabt zu haben.

Dr. Jochen Bürck und Herrn Siegmund Roth danke ich herzlichst für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der CD- und OCD-Messungen.

Mein Dank gilt Mareike Hartmann und Dr. Katja Koch für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Auch für die tatkräftige Unterstützung des Arbeitskreises möchte ich mich an dieser Stelle ausdrücklich bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie ganz herzlich bedanken. Die Gespräche mit ihnen haben mir immer viel Kraft gegeben.

Und mein ganz besonderer Dank geht an alle meine Freundinnen, die während der gesamten Arbeit zu kurz gekommen sind. Ich danke ihnen für das mir entgegen gebrachte Verständnis.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Membranen und Lipide	7
	Biologische Membranen	11
	Membranmodelle	11
1.2	Membranproteine	12
1.3	Protein-Protein Wechselwirkungen	14
2	Biologischer Hintergrund	18
2.1	Mechanosensitive Kanäle in der Natur	18
2.2	Bakterielle mechanosensitive Kanäle: MscM, MscS und MscL	20
	Mechanosensitiver Kanal minimaler Leitfähigkeit (MscM)	21
	Mechanosensitiver Kanal mit kaliumabhängiger Leitfähigkeit (MscK)	22
	Mechanosensitiver Kanal geringer Leitfähigkeit (MscS)	22
2.3	MscL: Funktion und Charakterisierung	24
	Die Struktur des Monomers	25
	N-Terminus	26
	TM 1	27
	Periplasmatischer Loop	27
	TM 2	27
	C-Terminus	28

Geschlossener Zustand des Kanals	29
Öffnungsmechanismus	32
2.4 Die Periplasmatische Loop Region des MscL-Proteins: Ihre Rolle in der Funktion des Kanals	34
3. Motivation und Ziele der Arbeit	38
4. Materialien und Methoden	40
4.1 Gentechnische Methoden	40
4.2 Molekularbiologische Methoden	45
4.3 Mikrobiologische Arbeiten	45
4.4 Spektroskopische Methoden	47
5. Ergebnisse	55
5.1 Funktionelle Tests an MscL-Deletionsmutanten	55
Herstellung der MscL-Deletionsmutanten in der Periplasmatischen Loop-Region	55
Expression und Aufreinigung der MscL-Deletionsmutanten	57
Funktionalitäts-Tests an MscL-Deletionsmutanten	58
5.2 Analyse der Sekundärstrukturunterschiede des MscL-Kanals	60
Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Rekonstitution des MscL-Kanals in die Membranmodelle	62
5.3 Isotopenmarkierung der Proteine für NMR-Untersuchungen	63
Isotopen-Markierung von MscL	66
5.4 Schräglage der Helices des MscL-Kanals in der Membran	72

5.5	Änderung der Form und Größe des Proteinkanls beim Öffnen	80
5.6	Funktionelle Cluster-Bildung von MscL	83
6.	Diskussion	87
6.1	Die Bedeutung der Loop-Region für die Funktion des Kanals	87
6.2	Durchführbarkeit von 3D Strukturuntersuchungen an MscL	88
6.3	Cluster-Bildung	90
6.4	Ursache der Cluster-Bildung	91
6.5	Bedeutung der Cluster-Bildung	91
7.	Zusammenfassung	94
8.	Literatur	95
9.	Anhang	107
	Liste der Veröffentlichungen	110
	Lebenslauf	111

1. Einleitung

1.1 Membranen und Lipide

Zellen sind durch eine Membran, welche als semipermeable Barriere fungiert, gegen ihre Umwelt abgegrenzt. Neben Lipiden besteht sie ebenfalls aus Membranproteinen. 1972 haben Singer und Nicholson das so genannte „Flüssig-Mosaik-Modell“ für biologische Membranen aufgestellt, wonach in der ca. 5-8 nm dicken Lipiddoppelschicht Proteine eingebettet sind. Das Mengenverhältnis zwischen Lipiden und Proteinen hängt von der Membranart ab und variiert von ~0,3 (in Gram-negativen Bakterien) bis 4 (Myelin) (J. M. Graham and Higgins 1998). In dieser „flüssigen“ Umgebung können sich sowohl Proteine als auch Lipide frei lateral bewegen. Diese Eigenschaft sowie die Komposition der Doppelschicht bestimmen die vielfältigen Funktionen der biologischen Membranen, z.B. Transport von Molekülen oder die Signalübertragung über membranständige Rezeptoren.

Die Hauptbestandteile der Membranen sind Phospholipide. Sie besitzen einen amphipatischen Charakter und bestehen aus einem Glycerolrückgrad, woran eine Phosphatkopfgruppe und zwei Fettsäurereste verknüpft sind. Somit bestehen Phospholipide aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einer hydrophoben Acylkette, welche ihre Eigenschaften bestimmen. Die wichtigsten Parameter hierfür sind die Polarität und der Hydratisierungsgrad der Kopfgruppe, sowie die Länge und die Anzahl der ungesättigten C=C Bindungen der Acylketten. Eine wichtige physikalische Eigenschaft der Membranlipide ist ihre Phasenübergangstemperatur T_m (*engl.* main transition), welche von der Länge und dem Sättigungsgrad der Fettsäureketten sowie von der Art der Kopfgruppe abhängt. Sie beschreibt den Übergang zwischen zwei Phasen, und Phospholipidmembranen liegen hauptsächlich in zwei Phasenzuständen vor (Chapman 1975; Melchior and Steim 1976). In der hochgeordneten Gelphase ($L\beta$) sind die Fettsäureketten starr und all-trans-konfiguriert sowie die Kopfgruppen immobilisiert. Im Gegensatz dazu befinden sich die Fettsäureketten in der flüssigkristallinen (fluide) Phase ($L\alpha$) in ständiger Bewegung und die laterale Mobilität der Lipide in der Membran ist erhöht, wodurch die Membran eine geringere Dicke aufweist. Der vorliegende Phasenzustand

bestimmt Eigenschaften und Struktur der Membran. Das wiederum hat Einfluss auf ihre Form und Stabilität. Werden Lipide mit unterschiedlichen Phasenübergangstemperaturen gemischt, verändert das den T_m -Wert der Membran, welcher nun ein Durchschnittswert der verwendeten Lipide darstellt.

In den verschiedenen Phasenzuständen besitzen Membranen unterschiedliche laterale Drücke. Durch eine spontane Bildung der Membran wirkt ein gewisser Stress auf die Lipide, weil sie von der Membranstruktur eingeschränkt sind. Der laterale Druck resultiert aus drei Kräften: i) die Abstoßungskraft der Kopfgruppen, was zu einem positiven lateralen Druck führt. Sie ist abhängig vom Hydratations- und elektrostatischem Zustand der Kopfgruppen sowie sterischen Hinderungen; ii) die Grenzflächenspannung, die für einen negativen lateralen Druck sorgt, da sie zur Minimierung ungünstiger Flächen tendiert (hydrophober Effekt); iii) die Bewegungen der flexiblen Fettsäureketten der Lipide, die in einem positiven lateralen Druck resultieren. Durch das Einbringen keilförmiger Lipide in Monolayern und planaren Lipiddoppelschichten verändert sich der laterale Druck zwischen den Lipidschichten. Diese Änderung des Druckes ist ein entscheidender Faktor für die Funktion von Proteinen, z.B. öffnet sich der mechanosensitive Kanal großer Leitfähigkeit (MscL), wenn zwischen den Lipidmonoschichten unterschiedliche lateraler Drücke entstehen (Perozo et al. 2002c).

Wie beschrieben, hängt der laterale Druck der Membran von der Lipidmorphologie ab. Sie bestimmt die Krümmung einer asymmetrischen Membran, was wiederum einen Einfluss auf die Form der Lipide hat. Durch die Geometrie der Lipide wird deren Packungseigenschaft (P) beeinflusst, welche von der Kopfgruppenfläche (a_0), Länge (l_c) und dem Volumen (V) der Fettsäureketten abhängig ist (Abb.1.1.1).

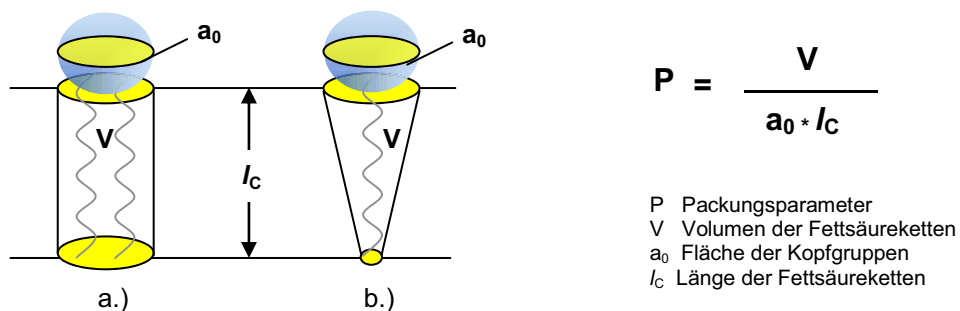


Abb. 1.1.1 Schematische Darstellung der Geometrie der Lipide a) Zylindrische Lipide mit hohem Packungsparameter. b) Keilförmige Lipide mit niedrigerem Packungsparameter. (Abbildung modifiziert nach: Liljas, A., 2009 „Textbook of Structural Biology“).

In wässriger Umgebung bilden Lipide spontan eine Membran aus, welche je nach Geometrie und Kopfgruppenladung eine gewisse Krümmungstendenz aufweist (McMahon and Gallop 2005). Je nach Zusammensetzung der Lipide können drei Arten von Membrankrümmungen definiert werden: eine positive Krümmung wird von keilförmigen Lipiden verursacht, dagegen bilden zylindrische Lipide eine planare Membran aus, die keine Krümmung aufweist. Eine negativ gekrümmter Monolayer ist aus trapezförmigen Lipiden aufgebaut, deren Packungsparameter ist größer als eins ($P > 1$). Auch die Eigenschaft der Kopfgruppen, intermolekulare Wasserstoffbrücken bilden zu können, erhöht den Ordnungsparameter der Lipide (Lafleur et al. 1990) (Abb. 1.1.2).

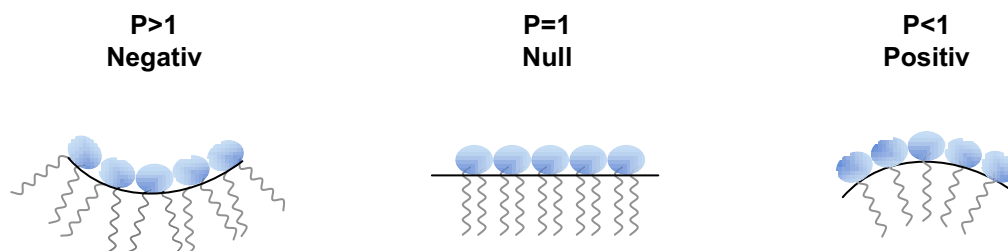
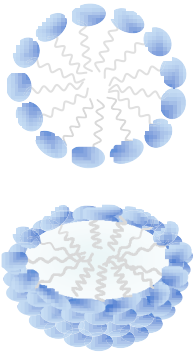


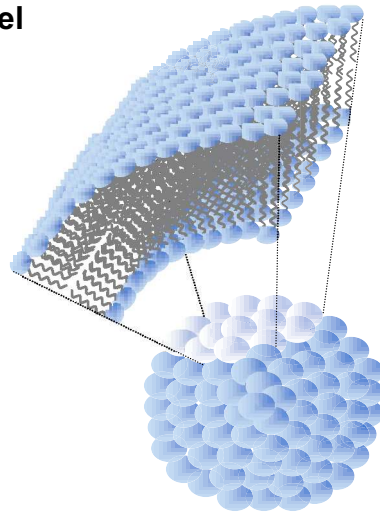
Abb. 1.1.2 Krümmung der Monoschicht, verursacht durch die Geometrie und Eigenschaften der Lipide.

Wegen ihren unterschiedlichen Anordnungseigenschaften bilden Lipide je nach ihrer Umgebung verschiedene Strukturen aus. Zylindrische Lipide ($P=1$) formen in wässriger Umgebung eine planare Lipiddoppelschicht, hingegen assoziieren keilförmige Lipide ($P < 1$) je nach Polarität der Umgebung zu normalen oder inversen Mizellen (Abb. 1.1.3) oder hexagonalen Phasen (H_{II} , H_I).

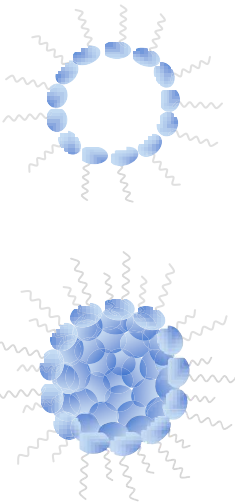
a.) Mizelle



c.) Vesikel



b.) Inverse Mizelle



d.) Planare Lipiddoppelschicht

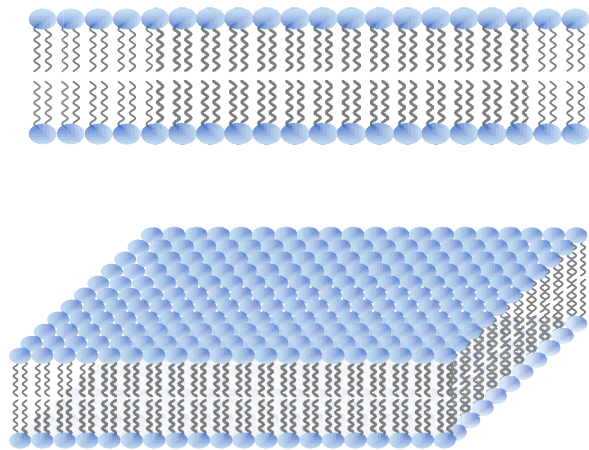


Abb. 1.1.3 Lipide mit unterschiedlichen Geometrien und Packungsparametern a) Keilförmige Lipide in polarer Umgebung. b) Keilförmige Lipide in apolarer Umgebung. c);d) Zylindrische Lipide in wässriger Umgebung, als Vesikel oder planare Lipiddoppelschicht.

Biologische Membranen

Membranen verschiedener Organismen unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung, z.B. besteht die innere Membran von *E. coli* hauptsächlich aus negativ geladenen Lipiden wie Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerol (PG). Hingegen finden sich in eukaryotischen Membranen zwitterionische Lipide und Steriole. In allen Biomembranen sind verschiedene Lipide asymmetrisch verteilt, was eine physiologische Rolle für ihre Funktion spielt (Daleke 2003; Manno et al. 2002).

Wegen ihrer Komplexität lassen sich biologische Membranen nur schwer untersuchen, daher dienen Modellmembranen zur Untersuchung ihrer Eigenschaften.

Membranmodelle

Membranmodelle stellen einfache Systeme biologischer Membranen dar. Je nach Aufbau und Eigenschaften unterscheidet man folgende Arten:

Mizellen bilden sich spontan in wässriger Umgebung aus, und ihr Durchmesser ist durch die Kettenlängen der verwendeten Lipide bestimmt. Sie werden oft für Untersuchungen von Membranproteinen in wässriger Lösung benutzt, da sie eine hydrophobe Umgebung für diese Moleküle ermöglichen.

Multilamellar large vesicles (MLVs) sind in der Regel mehrere Mikrometer groß und bestehen aus mehreren Lipiddoppelschichten. MLVs entstehen durch Hydratisierung von Lipidfilmen. Sie haben eine ungleiche Form, eine zwiebelartige Lamellarität und neigen zur Sedimentation.

Small unilamellar vesicles (SUVs) haben einen Durchmesser von ~ 50 nm und bestehen aus nur einer Lipiddoppelschicht. Wegen ihrer hohen Membrankrümmung allerdings ist die Packungsdichte der Phospholipide nicht optimal.

Large unilamellar vesicles (LUVs) haben einen Durchmesser von > 50 nm und sind stabiler als SUVs, da weniger Packungsdefekte auftreten. LUVs werden bevorzugt

als Modellmembransysteme eingesetzt, da ihre physikalischen Eigenschaften ähneln denen der Zellmembran sind.

Bizellen (engl. *binare cells*) sind kleine "Membranscheiben", die aus langkettigen Lipiden und einen kurzkettigen Rand bestehen. Sie können sich spontan im äußeren Magnetfeld orientieren, weshalb sie für bestimmte NMR Messungen gerne verwendet werden und durch Zugabe von Lanthanoiden kann deren Orientierung auf 90° verändert werden.

Orientierte Modellmembranen sind für bestimmte Strukturuntersuchungen mit Festkörper NRM und OCD von Lipiden und Membranproteinen am besten geeignet, da sie am ehesten die Umgebung der biologischen Membran imitieren. Mit diesem System ist es möglich, Proteinorientierungen in Membranen zu beschreiben.

1.2 Membranproteine

Die Zelle ist durch eine semipermeable Membran von der äußeren Umgebung isoliert und die Kommunikation zwischen dem Zellinneren und ihrer Umgebung wird durch mit der Membran assoziierte Proteine ermöglicht. Membranproteine haben wichtige Funktionen in der Zelle, z.B. sind sie häufig an Elektronentransfer-Reaktionen beteiligt (Atmungskette und Photosynthese). Dabei können sie entweder selber verschiedene Moleküle über die Zellmembran transportieren, oder sie bilden Kanäle und Poren, die dies ermöglichen.

Je nachdem wie sie mit der Membran interagieren, unterscheidet man zwei Arten von Membranproteinen: Entweder liegen sie auf der Membran und binden an die Lipid-Kopfgruppen (periphere Membranproteine), oder sie sind als integrale Proteine in der Membran eingebettet. Die Bindungsstärke der beiden Proteinsorten an die Membran ist unterschiedlich. Während sich die peripheren Proteine von der Membran leicht entfernen lassen, sind die integralen Proteine so stark mit der Membran assoziiert, dass ihre Entfernung nur nach einer Zerstörung der Membran möglich ist.

Die integralen Membranproteine haben vielfältige Strukturen, aber allgemein sind sie aus einem transmembranen Bereich und einem zur wässrigen Umgebung

ausgerichteten Extramembranteil aufgebaut. Die meisten transmembranen Bereiche von Membranproteinen sind α -helikal. Ausnahmen sind z.B. die Proteine der äußeren Membran der Gram-negativen Bakterien, die meistens eine β -Faltblatt-Konformation besitzen (Nikaido 2003). In Membranprotein Bakteriorhodopsin durchqueren seine sieben α -Helices die Membran und bilden eine Pore (Henderson et al. 1990). Die Anzahl der α -Helices im Protein bestimmt seine Topologie. Man kann die transmembranen α -Helices (oder β -Faltblätter) als die Einheiten der integralen Membranproteine betrachten. Eine transmembrane α -Helix ist durchschnittlich aus 20-25 meistens hydrophoben Aminosäuren gebildet, besitzt damit eine Länge von ca. 35 Å und ist gerade lang genug, um eine Membran durchzuspannen. Je nach Aminosäureanzahl kann Helix etwas kürzer oder länger sein, welches wiederum ihren Neigungswinkel in der Membran beeinflusst.

Ob ein helikales Segment in der Membran liegt, ist nicht nur von der Anzahl der Aminosäuren in der Helix abhängig, sondern auch von der Aminosäuresequenz (Mokrab et al. 2009).

Transmembrane α -Helices bestehen meistens aus hydrophoben Aminosäuren (Ala, Val, Leu, Ile), die der Helix ihre hydrophoben Eigenschaften vermitteln (Samatey et al. 1995).

Die verzweigten Aminosäuren Val und Ile sind nach dem Chou-Fasman Algorithmus (Chou and Fasman 1978) bevorzugt in einer β -Faltblatt Konformation löslicher Proteine zu finden, aber in einer Lipid-Umgebung kommen sie häufig in α -Helices vor.

Die aromatischen Reste Tyr, Trp und Phe, die für β -Faltblatt-Anteile in globulären Proteinen typisch sind (Cramer et al. 1992), kommen häufig am Ende einer transmembranen Helix oder im allgemeinen in der Lipid/Wasser Grenzfläche vor (van der Wel et al. 2002).

Der Helix-Brecher Glycin ist in transmembranen Helices relativ häufig (Landoltmarticorena et al. 1993). Glycin ist eine sehr flexible Aminosäure, aber im transmembranen Bereich ist seine Flexibilität durch die Lipide stark eingeschränkt, so dass es die helikale Struktur weniger stört. Als Aminosäure mit sehr kleiner

Seitenkette sorgt Glycin dafür, dass Helices dicht gepackt werden können, indem es Furchen in der Helixoberfläche bildet, die für Helix-Helix Interaktionen wichtig sind.

Auch ein weiterer Helix-Brecher, das Prolin, kommt häufig in transmembranen Helices vor. Im Gegensatz zu Glycin, hat Prolin eine sehr starre Imid-Seitenkette, die ein Störfaktor für die Sekundärstrukturbildung ist. Deshalb ist es kaum im Zentrum von α -Helices zu finden (Krieger et al. 2005). Das relativ häufige Vorkommen von Prolin in transmembranen Helices mag darin begründet sein, dass Prolin in dieser Umgebung die Helix vor einem Verlust der helikalen Struktur bei höherer Temperatur schützt (Lyu et al. 1990).

Ebenfalls kommen hydrophile und geladene Aminosäuren in transmembranen Helices vor. Auf den ersten Blick scheint dies nicht mit den hydrophoben Eigenschaften der Umgebung vereinbar, aber hydrophile und polare Reste sind oft wichtige Komponente für die korrekte Zusammenlagerung zur Tertiärstruktur der Membranproteine. Sie sind z.B. involviert in Transportprozessen (bei Transportproteinen) oder essentiell zur Ausbildung von wassergefüllten Poren (z.B. bei Porinen u.a. Kanalproteinen). Die Stabilität der transmembranen Helix ist so hoch, dass selbst das Einbringen der wenigen hydrophilen oder geladenen Aminosäuren in die Membran toleriert werden kann (White and Wimley 1999).

Wie oben beschrieben, spielt die Umgebung der Membranproteine eine wichtige Rolle für die Ausbildung der Proteinstruktur, da sich viele Aminosäuren in der Lipiddoppelschicht öfters anders verhalten als in einer wässrigen Umgebung.

Welche Wechselwirkungen zwischen den Proteinen entstehen, wird im nächsten Kapitel behandelt.

1.3 Protein-Protein Wechselwirkungen

Die Protein-Protein Wechselwirkungen spielen in diversen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle, z.B. in der Rezeptorkomplexbildung oder in Signaltransduktionskaskaden. Durch die Oligomerisierung von Proteinen werden Kanäle und Poren gebildet. Die Interaktionen zwischen Proteinen finden auf extra- oder intrazellulärer Ebene statt und die beteiligten Proteine werden dabei entweder

kovalent (statisch) oder nicht-kovalent (reversibel) miteinander verbunden. Letzteres ist für Kanäle und Liganden-gesteuerte Rezeptor-Aktivierung sehr wichtig.

Kovalente Bindungen werden über Disulfid-Brücken gebildet (Liu et al. 2004), während nicht-kovalente Wechselwirkungen durch hydrophobe Interaktionen, Salz- oder Wasserstoff-Brücken entstehen. Die Art der Wechselwirkungen ist in der Sequenz des Proteins angelegt und kommt je nach Umgebung des Proteins zur Geltung.

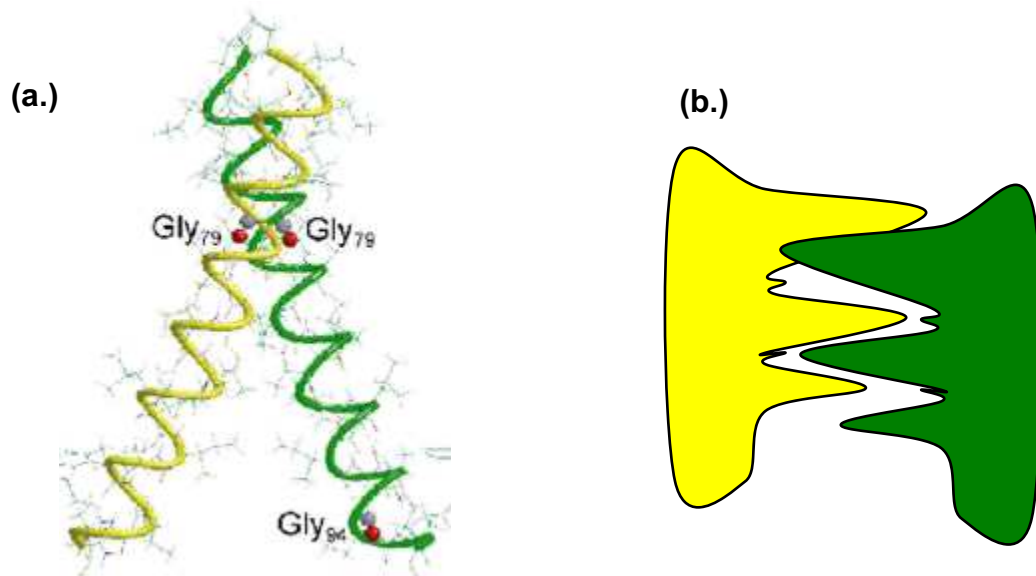


Abb.1.3.1 a.) Glycoporin A Dimer (Quelle: <http://rlbl.chem.upenn.edu/gif/colgrado.gif>, Zugriff: am 26.10.2010) b.) Schematische Darstellung des GxxxG Helix-Paarungsmotivs.

In der Membran werden Protein-Protein Interaktionen über die transmembrane Bereiche der Proteine vermittelt, Z.B. wechselwirken transmembrane Helices miteinander durch bestimmte geometrische Motive, die zur Proteinoligomerisierung führen. Je nach Proteinsequenz ergeben sich hierbei unterschiedliche Motive: Das Heptad-Motiv der Leucine, sogenannte „Leucin-Zipper“, kommen sowohl in löslichen als auch in Membranproteinen vor. DNA-bindende Proteine (Landschulz et al. 1988) oder Liganden-aktivierte Rezeptoren (Gurezka et al. 1999) dimerisieren über „Leucin-Zipper“ und bilden einen rechts- oder linksgängige „coiled-coiled“ Struktur. Andere Proteine wechselwirken miteinander über die aromatischen Ringe der Aminosäuren. Statistische Analysen der bakteriellen Proteinsequenzen zeigten, dass TM-Helices hauptsächlich über die aromatischen Motive QXXW, QXXY, QXXF, WXXS, YXXS,

FXXS, WXXW, YXXY, FXXF miteinander verbunden sind (Sal-Man et al. 2007; Sukharev et al. 2001a). Einige pentamere Proteine, wie z.B. Cys-Loop Rezeptoren (*pentameric ligand-gated ion channels*) oligomerisieren durch aromatische Interaktionen zwischen den Helices (Haeger et al. 2010) Das Helix-Paarungsmotiv (GXXXG), welches sogenannte „ridges-into-grooves“ erzeugt, wurde als Strukturgebende Sequenz erstmals in Glycophorin A beschrieben (Abb. 1.3.1) (MacKenzie et al. 1997) und ist mittlerweile für ~2000 Proteine bekannt (Kim et al. 2005). Dieses Helix-Paarungsmotiv ist in Membranproteinen für die Homooligomerisierung verschiedener Proteinkanäle verantwortlich. Z. B. sind im tetrameren Kalium Kanal (KcsA) (Doyle et al. 1998) oder im pentameren Mechnosensitiven Kanal großer Leitfähigkeit (MscL) in *E.coli* (Sukharev et al. 2001a) die transmembranen Helices über die van der Waals Wechselwirkungen zwischen Glycin und hydrophoben Aminosäuren verbunden. Einige helikale Oligomere bilden hierbei eine rechtsgängige Struktur, wo die Helices ca. 40° zueinander geneigt sind. Bei anderen ist die Struktur des Helixbündels linksgängig mit 20° Kreuzungswinkel (Moore et al. 2008).

Durch interhelikale Wasserstoff-Brücken zwischen polaren Aminosäuren dimerisieren die ζ -Ketten des T-Zell Rezeptors, welcher für die Signaltransduktion in der Zelle verantwortlich ist (Call et al. 2006).

Im transmembranen Bereich eines Proteins kommen manchmal geladene Aminosäuren vor, welche im hydrophoben Milieu thermodynamisch ungünstig positioniert sind und deshalb neutralisiert werden müssen, d.h. für jede geladene Aminosäure in der transmembranen Region muss eine entsprechende Gegenladung vorhanden sein. Wegen der fehlenden Hydrathülle sind die elektrostatische Wechselwirkungen in der Membran vergleichsweise stark und deshalb Salz-Brücken in Transmembran-Helices besonders ausgeprägt, welches wiederum z.B. für eine stabile Komplex-Bildung der Komponenten des T-Zellrezeptors sorgt (Call et al. 2002).

Oligomerisierung der Proteine läuft zweistufig: Als erstes werden die Helices in die Membran eingefügt, die dann miteinander interagieren und ein Oligomer bilden (Popot and Engelman 1990). Dieser Prozess wird in *E.coli* durch das Sec-System unterstützt. Während der Proteininsertion spielen die Loop Länge und Ladung eine

wichtige Rolle. Je länger die Loops sind und je mehr positive Ladung am C-Terminus vorhanden ist, desto stabiler ist das Protein (Whitley et al. 1994). Die Topologie der Membranproteine spielt eine entscheidende Rolle für eine Kanalbildung durch Oligomerisierung von Monomeren. Ein Verlust des Oligomerenzustands bedeutet Verlust der Funktion. Um dies zu vermeiden, wirken einige Insertasen als Stabilisatoren und schützen den Kanal vor Desintegration. Z.B. stabilisiert YidC, eine Insertase aus *E.coli*, den Oligomerenzustand des MscL-Proteins (Pop et al. 2009), welches ein mechanosensitiver Kanal und das Untersuchungsobjekt dieser Dissertation ist.

2. Biologischer Hintergrund

2.1 Mechanosensitive Kanäle in der Natur

Alle Organismen werden durch viele Umweltfaktoren unterschiedlichen Reizen ausgesetzt. Im Laufe der Evolution haben Lebewesen verschiedene Möglichkeiten entwickelt, diese Reize wahrzunehmen um entsprechend reagieren zu können. Einer der ältesten Mechanismen hierbei ist Mechanosensitivität. Nach mechanischer Stimulation der zellulären Plasmamembran, z.B. durch Ansteigen des Turgordrucks, reagiert diese durch Öffnen von mechanosensitiven Kanälen. Diese Mechanosensoren wurden erstmalig in Froschmuskeln (Brehm et al. 1984a; Brehm et al. 1984b) und später auf allen Ebenen des phylogenetischen Stammbaums, von Bakterien bis zu Säugetieren, nachgewiesen. Die Vielfalt an mechanischen Reizen führte dazu, dass mechanosensitive Kanäle verschiedene Funktionen in Organismen übernahmen. Die prokaryontischen mechanosensitiven Kanäle fungieren als „Schutzsystem“ gegen osmotischen Druck in hypoosmotischer Umgebung, um Bakterien vor dem Platzen zu bewahren (Levina et al. 1999). Bei Pilzen haben sie während der Infizierungsprozesse bei der Abtastung der Kontaktfläche eine wichtige Funktion (Zhou et al. 1991). Mit Hilfe von mechanosensitiven Kanälen können Pflanzen die Gravitation wahrnehmen und damit die Wachstumsrichtung ihrer Wurzeln und Sprossen lenken. Auch Wind und Regen werden durch diese Kanäle als mechanischer Reiz detektiert (Kumamoto 2008; Sackin 1995). Bei Tieren sind die mechanosensitiven Kanäle aus den „Degenerin/epithelial Na⁺ channel“- und „transient receptor potential channel“- Familien für Berührung, Gleichgewicht, Druck, Hören, Sehen, Geschmack- und Temperaturempfindung zuständig (Chalfie 2009; Corey et al. 2004; Ernstrom and Chalfie 2002).

Durch diese verschiedenen Funktionen unterscheiden sie sich auch in den Aktivierungsmechanismen. Ein Teil wird durch Dehnung (Deformation) der Membran geöffnet, bei anderen reicht das Ziehen an einem Linker aus, der den Kanal öffnet. Die meisten eukaryontischen mechanosensitiven Kanäle sind mit dem komplexen mikrotubulären Netzwerk des Zytoskeletts verbunden und leiten den mechanischen Reiz in der Zelle weiter, wo eine entsprechende Antwort ausgelöst wird. Ein Beispiel

hierfür sind die hochempfindlichen Haarzellen im Innenohr des Menschen, die für das Hören zuständig sind. Es reicht eine Kraft von wenigen pN um einen Kanal zu aktivieren, d.h. Haarzellen können mechanische Reize detektieren, die nicht größer als thermische Bewegungen sind.

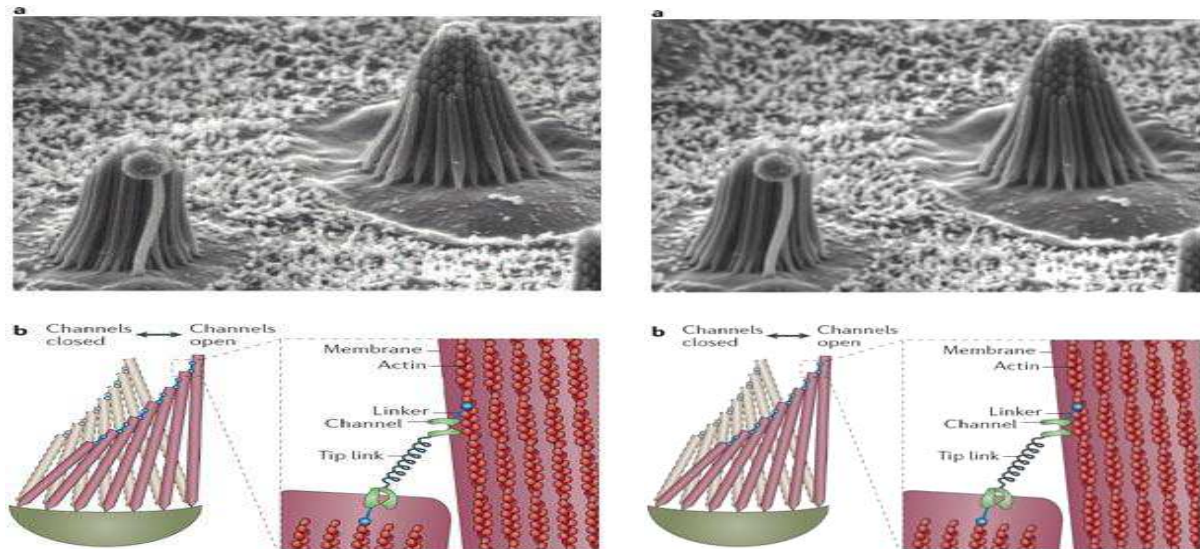


Abb. 2.1.1 a) Elektronmikroskopische Aufnahme von Haarzellen b) Schematische Darstellung der Mechanotransduktion der Haarzellen (Quelle: Perozo, 2006).

Eine Haarzelle kann etwa 20-100 Stereozilien besitzen, die miteinander durch Tipp-Links, dünne Proteinfäden, verbunden sind. Sie kontrollieren die Öffnung der Transduktionskanäle und deren Entfernung führt zum Verlust der Mechanosensitivität (Abb. 2.1.1) (Stauffer and Holt 2007).

Im Gegensatz dazu besitzen prokaryontische mechanosensitive Kanäle keine Protein-Linker und werden ausschließlich durch Dehnung (Deformation) der Membran geöffnet (Kung 2005). Sie waren die ersten, die experimentell durch Membrandeformation mittels Patch-Clamp-Technik nachgewiesen werden konnten (Martinac et al. 1987).

In den nächsten Kapiteln werden daher die bakteriellen mechanosensitiven Kanäle näher erläutert, die im Fokus dieser Arbeit stehen.

2.2 Bakterielle mechanosensitive Kanäle: MscM, MscS und MscL

Mechanosensitive Kanäle in Bakterien spielen eine lebenswichtige Rolle während des osmotischen Schocks. Befindet sich ein Bakterium in einer hypotonischen Umgebung, strömt Wasser in die Zelle ein, was zu einem erhöhten Turgordruck führt. Durch den dadurch entstehenden osmotischen Druck droht die Zelle zu platzen. Um das zu verhindern, werden mechanosensitive Kanäle geöffnet, wodurch das Wasser und kleinere Moleküle (Ionen, Glukose, Aminosäuren usw.) in den periplasmatischen Raum des Bakteriums entlassen werden. Auf diese Weise kehrt die Zelle zu ihrem normalen Equilibrium zurück (Abb. 2.2.1).

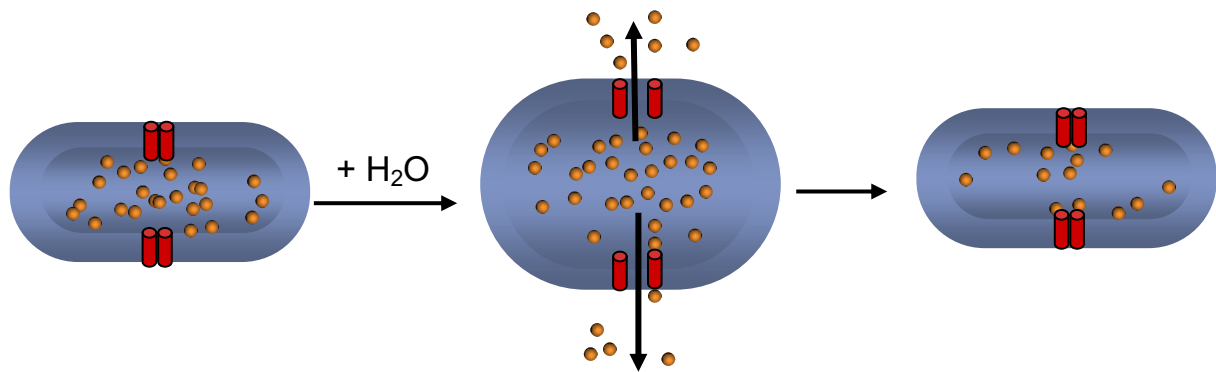


Abb. 2.2.1: Mechanosensitive Kanäle fungieren als Sicherheitsventile während des osmotischen Schocks (Schematische Darstellung).

Bakterielle mechanosensitive Kanäle wurden in den 80er Jahren durch die Patch-Clamp-Technik, eine elektrophysiologische Methode, in *E.coli* entdeckt und sind die ersten mechanosensitiven Kanäle, welche durch direkte Kraftausübung auf die Membran entdeckt wurden (Martinac et al. 1987). Mittlerweile konnten drei Hauptklassen dieser Kanäle identifiziert werden, wobei die Klassifizierung nach ihrer Leitfähigkeit erfolgt: i) mechanosensitiver Kanal minimaler Leitfähigkeit (*engl.* mechanosensitive channel of mini conductance- MscM), ii) mechanosensitiver Kanal geringer Leitfähigkeit (*engl.* mechanosensitive channel of small conductance- MscS) sowie sein verwandter mechanosensitiver Kanal mit kaliumabhängiger Leitfähigkeit (*engl.* mechanosensitive channel of potassium-dependent conductance- MscK), iii) mechanosensitiver Kanal großer Leitfähigkeit (*engl.* mechanosensitive channel of large conductance- MscL) (Booth and Louis 1999; Martinac 2004; Perozo 2006).

Die elektrophysiologischen Experimente zeigten, dass die mechanosensitiven Kanäle in unterschiedlicher Kopienanzahl in der Zelle vorliegen können. Es wird vermutet, dass nur ein oder zwei MscM- und MscK-Kanäle pro Zelle vorhanden sind, wohingegen fünf MscL- und 20-30 MscS-Kanäle für das Überleben des Bakteriums benötigt werden (Blount et al. 1999; Li et al. 2002).

Die Homologieanalysen der Sequenzen verschiedener mechanosensitiver Kanäle haben gezeigt, dass sie dem gleichen Ursprung entstammen. Die MscL-Kanalproteine bilden eine separate Familie, die fast nur aus bakteriellen Homologen besteht (Balleza and Gomez-Lagunas 2009; Martinac 2004; Pivetti et al. 2003). Das MscS-Kanalprotein hat hingegen einige Homologe bei den Pflanzen (Levina et al. 1999; Pivetti et al. 2003). Die Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* (Haswell and Meyerowitz 2006; Haswell et al. 2008) und *Chlamydomonas reinhardtii* (Nakayama et al. 2007) haben gezeigt, dass diese Kanäle mechanisch gesteuert werden können, aber einen direkten Nachweis der mechanosensitiven Phänotypen gab es bisher nicht.

Zwar haben die bakteriellen mechanosensitiven Kanäle den gleichen Ursprung, sie unterscheiden sich aber untereinander durch ihre Struktur, Öffnungskinetik, Leitfähigkeit und Selektivität.

Mechanosensitiver Kanal minimaler Leitfähigkeit (MscM)

Die kleinste Leitfähigkeit unter den bakteriellen mechanosensitiven Kanälen hat der MscM, was durch die Patch-Clamp Methode entdeckt wurde (Martinac et al. 1987). Dieser Kanal wird durch minimale Membrandeformationen aktiviert und hat eine Leitfähigkeit von $\sim 0,3$ nS (Berrier et al. 1996). Allerdings ist seine Struktur nicht bekannt und gehört zu den am wenigsten untersuchten bakteriellen mechanosensitiven Kanälen. Mutationsexperimente haben gezeigt, dass der MscM-Kanal alleine unfähig ist, das Bakterium gegen osmotischen Schock zu schützen (Lit. Levina 1999; Booth and Louis 1999).

Die nächst größere Leitfähigkeit haben die MscK- und MscS-Kanäle. Ursprünglich wurden sie als ein Kanal identifiziert (Martinac et al. 1987), aber spätere genetische

Untersuchungen zeigten, dass es sich um zwei unterschiedliche Proteine handelte (Levina et al. 1999).

Mechanosensitiver Kanal mit kaliumabhängiger Leitfähigkeit (MscK)

Der kaliumabhängige mechanosensitive Kanal hat die gleiche Leitfähigkeit (~1 nS) wie der MscS-Kanal, weshalb er am Anfang für diesen gehalten wurde. Inzwischen ist bekannt, dass er von einem anderen Gen kodiert wird und ein ca. 120 kDa schweres Protein ist. Dieser Kanal ist neben der Membrandeformation auch spannungsabhängig und weist eine kationische Selektivität auf (McLaggan et al. 2002). Trotz der Strukturunterschiede besitzt der MscK-Kanal eine MscS-ähnliche Domäne am C-Terminus (Levina et al. 1999).

Mechanosensitiver Kanal geringer Leitfähigkeit (MscS)

Der MscS-Kanal öffnet sich bei moderatem, ca. 0,8-1 nS starkem Druck, und ist im Gegensatz zum MscK-Kanal hauptsächlich für das Ausströmen von Anionen aus der

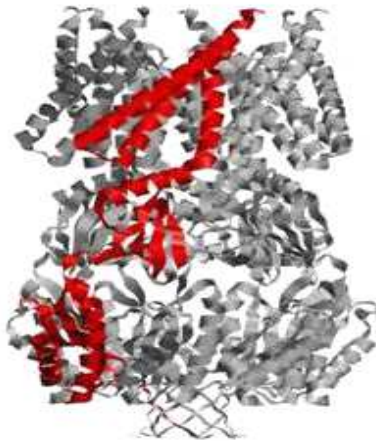


Abb. 2.2.2 MscS im offenen Zustand
(Quelle: www.abdn.ac.uk/ims/staff/details.php?id=i.r.booth, Zugriff am 26.10.2010).

Zelle heraus verantwortlich (Martinac et al. 1987; Sukharev 2002). Dieser Kanal ist ebenfalls spannungsabhängig, obwohl die Spannung nur einen regulierenden Effekt auf den bereits geöffneten Kanal hat (Bass et al. 2002; Vasquez and Perozo 2004). Eine Besonderheit ist auch, dass der MscS-Kanal ein Inaktivierungs- und Adaptationsphänomen aufweist (Akitake et al. 2005; Belyy et al. 2010), welches in anderen mechanosensitiven Kanälen aus Bakterien nicht vorkommt.

Die Kristallstruktur des geschlossenen Kanals aus *E. coli* ist in einer Auflösung von 3,9 Å bekannt. Sieben 31 kDa schwere Monomere bilden ein Homoheptamer mit 80

Å Durchmesser und einem 120 Å langen Kanal (Bass et al. 2002). Jedes Monomer besteht aus einem periplasmatischen N-Terminus, drei Transmembranhelices (TM1, TM2, TM3) und einem großen cytoplasmatischen C-Terminus (Abb.2.2.2). TM1 und TM2 sind verantwortlich für die Wahrnehmung der Membrandeformation und Spannung, während TM3 mit seinen hydrophoben Resten an der eigentlichen Porenbildung beteiligt ist. An der cytoplasmatischen Seite sind diese Helices um 50° geknickt zur Membran ausgerichtet. Der C-terminale Bereich des Proteins ist am größten und besteht aus einer „mittleren β -Domäne“, gebildet aus fünf β -Faltblättern, sowie einer carboxyterminalen Domäne, welche aus ein β -Faltblatt und eine α -Helix im cytoplasmatischen Bereich besteht (Bass et al. 2002).

2008 gelang es Wang et al., sowohl die Kristallstruktur des offenen Kanals als auch den Öffnungsmechanismus aufzuklären (Wang et al. 2008). Während des Öffnens des Kanals drehen sich die TM-Helices im Uhrzeigersinn, was die Neigung der TM3-Helices verursacht. Das wiederum führt dazu, dass sich die porenbildenden Aminosäuren (Leu₁₀₅, Leu₁₀₉) voneinander weg bewegen, wodurch eine 11 Å große Pore entsteht.

Aufgrund seiner Struktur, Öffnungskinetik, Leitfähigkeit und Selektivität unterscheidet sich der MscS-Kanal komplett von dem MscL-Kanal, einem weiteren Mitglied der bakteriellen mechanosensitiven Kanäle.

Der mechanosensitive Kanal großer Leitfähigkeit (MscL) soll in den nächsten Kapiteln eingehend behandelt werden, da mit diesem experimentell gearbeitet wurde.

2.3 MscL: Funktion und Charakterisierung

Der mechanosensitive Kanal großer Leitfähigkeit, MscL, wurde erstmals in Patch-Clamp Experimenten an Bakterienzellen entdeckt (Martinac et al. 1987). Er besitzt die größte Leitfähigkeit unter den bakteriellen mechanosensitiven Kanälen, sie liegt bei etwa 3 nS (Berrier et al. 1996). Wie alle Mitglieder dieser Familie dient er als „Schutzventil“ während eines osmotischen Schocks, und wird während der exponentiellen Wachstumsphase (*log*-Phase) am stärksten expremiert. In dieser Phase reagieren die Bakterien extrem empfindlich auf Änderungen der Osmolarität der Umgebung, und wenn die Zelle zu platzen droht, öffnen sich die MscL-Kanäle und entlassen unselektiv Moleküle in den periplasmatischen Raum (Berrier et al. 1996; Blount et al. 1996c). Die Größe der Moleküle, welche den Kanal passieren können, kann bis zu 6,5 kDa (*in vitro*) oder 12 kDa (*in vivo*) erreichen (Ajouz et al. 1998; van den Bogaart et al. 2007). Dies weist darauf hin, dass die gebildete Pore recht groß sein muss, was durch Strukturuntersuchungen bestätigt werden konnte.

Die Kristallstruktur des geschlossenen MscL-Kanals aus *M. tuberculosis* (Tb-MscL) wurde Ende der 90er Jahre aufgeklärt, wodurch frühere Hypothesen über eine

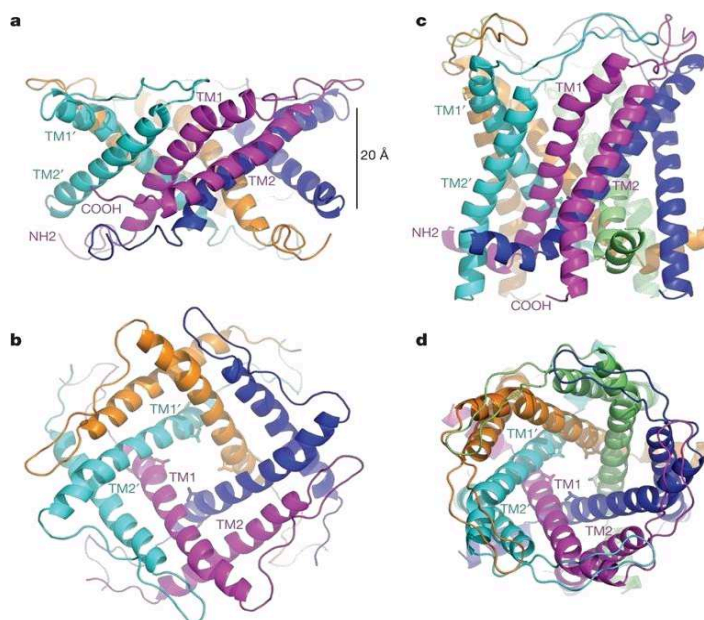


Abb. 2.3.1: Die Kristallstruktur des MscL-Kanals aus a) *S. aureus* b) *E. coli* (Quelle: Liu et al. 2009).

hexamere Struktur des MscL-Kanals widerlegt werden konnten (Chang et al. 1998; Saint et al. 1998).

Danach wurde postuliert, dass der MscL-Kanal allgemein eine homopentamere Struktur besitzt, aber diese Vorstellung konnte kürzlich nach dem Bekanntwerden der 3D-Struktur eines anderen MscL-Kanals widerlegt werden: der MscL-Kanal aus *S. aureus*

(Sa-MscL) besitzt eine tetramere und somit völlig andere Struktur als Tb-MscL (Liu et al. 2009) (Abb. 2.3.1). Es stellt sich nun die Frage, ob sich die Struktur des MscL-Kanals aus *E. coli* (Eco-MscL) ebenso von der Struktur aus *M. tuberculosis*

unterscheidet. Anhand über Experimente zur der pentameren Struktur des Eco-MscL-Kanals gibt es eine ganze Reihe an indirekten Hinweisen, die die Annahme eines Pentamers dieses Kanals zulassen (Chang et al. 1998; Pivetti et al. 2003; Wang et al. 2007). Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, dass der Eco-MscL-Kanal und der Sa-MscL-Kanal unterschiedliche Öffnungskinetiken zeigen (Moe et al. 1998) (Liu et al. 2009). Das oligomere Proteine in verschiedenen Spezies eine unterschiedliche Anzahl an Oligomeren aufweisen wurde auch in weiteren Fällen, wie dem CorA Mg²⁺ Transporter oder der C-Untereinheit der F₀-ATPase beobachtet (Niegowski and Eshaghi 2007; Stock et al. 1999). Hierbei spielt es keine Rolle, ob es sich um Gram-positive oder -negative Bakteria handelt, da sowohl in *S. aureus* als auch in *M. tuberculosis*, beide Gram-positive Bakteria, unterschiedliche Oligomerisierungsgrade des MscL-Kanals auftreten.

In dieser Arbeit wird von einer pentameren Struktur des Eco-MscL-Kanals ausgegangen, und die Sequenzangaben beziehen sich auf *E. coli*.

Die Struktur des Monomers

Homologieanalysen der MscL-Kanal Familie zeigten einen hohen Konservierungsgrad und im Allgemeinen einen gleichen Aufbau der Monomere, trotz unterschiedlicher Anzahl und Längen der Monomere im Kanal. Ein Monomer des Tb-MscL-Kanals ist 151 Aminosäuren lang, während das Monomer des Eco-MscL-Kanals nur aus 136 Aminosäuren besteht (Abb.2.3.2) (Levina et al. 1999; Moe et al. 1998; Pivetti et al. 2003).

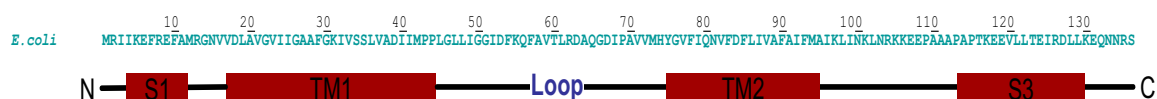
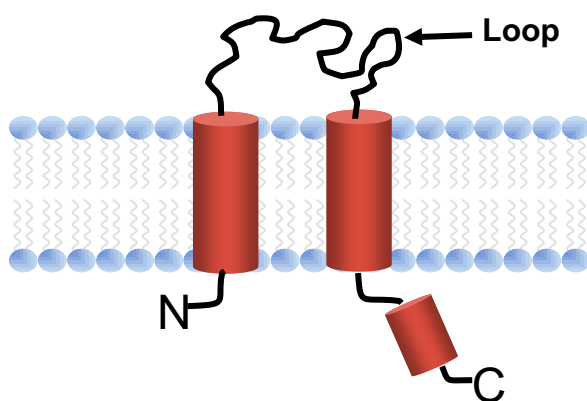


Abb. 2.3.2 Schematische Darstellung des Eco-MscL-Monomers mit entsprechenden Sequenz-Bereichen.

Ein Monomer des Eco-MscL-Kanals ist folgendermaßen aufgebaut: der N-Terminus (AS 1-16) befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite, und geht in eine



transmembrane α -Helix, TM1 (AS 17-44), über. Diese ist durch einen periplasmatischen Loop (AS 45-74) mit einer zweiten transmembranen α -Helix, TM2 (AS 75-96), verbunden. Der C-Terminus (AS 97-136) ist ebenfalls auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert. (Abb. 2.3.3)

Abb. 2.3.3 Schematische Darstellung des MscL Monomers im Lipiddoppelschicht.

N-Terminus

Der N-Terminus des Monomers des Eco-MscL-Kanals ist kurz (z.B. besteht er beim Eco-MscL-Kanal aus 16 Aminosäuren) und hoch konserviert in Bakterien. Er konnte in der ersten Kristallstruktur des Tb-MscL-Kanals nicht aufgelöst werden (Chang et al. 1998), allerdings wurde später eine kurze amphipathische α -Helix (S1) in diesem Bereich für Eco-MscL postuliert (Sukharev et al. 2001a). In der S1-Helix befindet sich ein hoch konservierter Bereich $I_3IKEF_7REF_{10}AM_{12}$, dessen Motiv $XXYYFYFXX$ (X = hydrophobe AS, Y = hydrophile AS) Helix-Helix Interaktionen begünstigt (Iscla et al. 2008; Pivetti et al. 2003).

Mutationen in der S1-Helix zeigen einen sehr starken Einfluss auf die Funktion des Kanals. Die Meisten haben eine eingeschränkte Funktionalität zur Folge (Blount et al. 1996a; Levina et al. 1999; Li et al. 2004; Moe and Blount 2005; Sukharev et al. 2001b).

Nach der S1-Helix kommt ein hoch konservierter Bereich ($Arg_{13}-Gly_{14}-Asn_{15}$), welcher den N-Terminus mit der TM1-Helix verbindet. Die Mutationen in diesem Linker führen ebenfalls entweder zum Verlust der Aktivität (Auswechslung mit einer hydrophoben AS) oder zu veränderter Leitfähigkeit und Drucksensitivität (Auswechslung mit einer hydrophilen AS) (Sukharev et al. 2001a).

TM 1

Die zweitgrößte Region des Eco-MscL-Monomers ist die hoch konservierte erste transmembrane TM1-Helix (Moe et al. 2000; Pivetti et al. 2003). Mittels der Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine ausgeprägte α -Helix handelt (Chang et al. 1998). Zwischen dem N-terminalen Linker und dieser Helix befindet sich ein **NXXD** Motiv, wobei es sich um einen mechanosensitiven Sensor handeln könnte (Kumanovics et al. 2002).

In der Sequenz der TM1-Helix des Eco-MscL-Monomers befindet sich ein weiteres Motiv: ein Helix-Paarungsmotiv **A₂₀VG₂₂VIIIG₂₆AAF₃₀KI₃₂**, sogenannte „ridges-into-grooves“ (GXXXG), welches sehr ausgeprägt ist. Interessanterweise befinden sich in dieser Region im tetrameren Sa-MscL-Kanal nur hydrophobe Aminosäuren. Dies könnte ein möglicher Unterschied zwischen den Kanalstrukturen des Sa-MscL- und des Eco-MscL-Kanals sein.

Die TM1-Helices sind an der Porenbildung des Kanals beteiligt, und Mutationen in dieser Region führen entweder zur Sensibilisierung des Kanals oder zum Verlust der Funktion (Blount et al. 1996d; Li et al. 2004; Maurer and Dougherty 2003).

Zwei Proline an der carboxyterminalen Seite der TM1-Helix beenden den transmembranen Bereich, welcher anschließend durch eine Glycin-Schleife in eine periplasmatische Loopregion übergeht.

Periplasmatischer Loop

Den größten Loop im Monomer bildet die periplasmatische Loopregion von AS 45-74, welche als Linker zwischen der TM1- und TM2-Helix fungiert.

TM 2

Der zweite transmembrane Bereich (TM2) ist in allen Prokaryonten hoch konserviert (Maurer et al. 2000; Pivetti et al. 2003). Es handelt sich hier ebenfalls um eine α -

Helix ähnlich der TM1-Helix, allerdings ist sie sechs Aminosäuren kürzer. Im Gegensatz zur TM1-Helix sind in der Sequenz der TM2-Helix fast alle Aminosäuren hydrophob, was der Grund für die extreme Hydrophobizität dieses Bereichs ist. Die TM2-Helix des Eco-MscL-Monomers ist reich an aromatischen Aminosäuren. Davon sind sechs vorhanden (Tyr₇₅, Phe₇₈, Phe₈₃, Phe₈₅, Phe₉₀, Phe₉₃), was fast einem Drittel der Helix entspricht. Sie sind in diesem Bereich mehr oder weniger gleichmäßig verteilt.

Die meisten Mutationen in der TM2-Helix führen zur Desensibilisierung in Bezug auf die Membranspannung und dem Verlust der Funktion (Maurer and Dougherty 2003).

Die hydrophobe TM2-Helix endet mit einem Isoleucin und geht mittels einer sehr hydrophilen Schleife in den C-Terminus des Monomers über.

C-Terminus

Der längste Teil des Monomers, der C-Terminus mit AS 97-136, ist in Bakterien wenig konserviert (Levina et al. 1999; Maurer et al. 2008; Pivetti et al. 2003). In der Kristallstruktur ist er als cytoplasmatische Helix (S3) zu erkennen, und über einen Loop mit der TM2-Helix verbunden (Chang et al. 1998).

Dieser cytoplasmatische Loop ist sehr hydrophil, und im Monomer des Eco-MscL-Kanals sind, im Gegensatz zum Monomer des Tb-MscL-Kanals, viele positiv geladene Aminosäuren lokalisiert (K₉₇LINK₁₀₁LNR₁₀₄K₁₀₅K₁₀₆EEP₁₀₉). Diese Region besitzt das konservierte „Ladungscluster“ **RKKEE**, welches möglicherweise als pH-Sensor fungiert und für die Aktivierung des Kanals wichtig ist (Blount et al. 1996b; Hase et al. 1995; Hase et al. 1997; Kloda et al. 2006; Maurer et al. 2000). Diese Art der Ladungscluster sind auch in anderen Bakterien und in den TREK-1 Kanälen der Säugertiere zu finden und dienen hier ebenfalls als pH Sensoren (Kloda and Martinac 2001; Patel et al. 1998).

Der cytoplasmatische Loopbereich endet mit der Aminosäure Prolin und geht in die S3-Helix über. Deren Mitte ist aufgrund polarer und geladener Aminosäuren sehr hydrophil und wird mittels hydrophober Aminosäuren von beiden Seiten abgeschirmt. Am Ende der Helix ist ein hoch konservierter Bereich **LLXEIRD** lokalisiert, welcher

die Bündel der S3-Helices im Kanal stabilisiert (Maurer et al. 2008). Da die Deletion der S3-Helix im Eco-MscL-Monomer keinen Einfluss auf die Funktionalität des Kanals zeigt (Hase et al. 1995; Hase et al. 1997), besitzt sie somit keine Relevanz für den Öffnungsmechanismus, spielt aber möglicherweise als Molekularfilter eine wichtige Rolle in der Physiologie der Zelle (Anishkin et al. 2003).

Fünf MscL-Monomere bilden einen mechanisch gesteuerten, homopentameren Kanal in Tb-MscL und Ecol-MscL.

Geschlossener Zustand des Kanals

Die Kristallstruktur des Tb-MscL-Kanals ist in einer Auflösung von 3,5 Å bekannt (Chang et al. 1998). Basierend auf diesen Daten, zusammen mit „cross-linking“

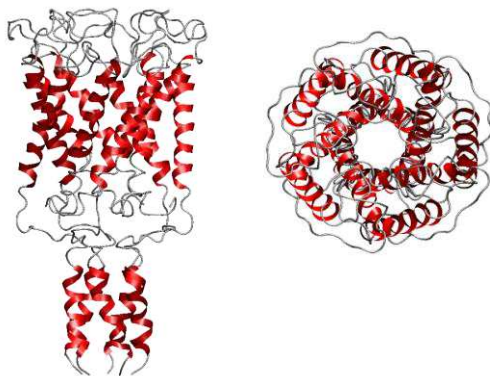


Abb. 2.3.4. Die Kristallstruktur des geschlossenen Eco-MscL-Kanals

Experimenten, molekulardynamischen (MD) Simulationen und Untersuchungen zur Homologie wurde für den Eco-MscL-Kanal ein Strukturmodell erstellt, welches Ähnlichkeiten zum Tb-MscL-Kanal aufweist (Abb. 2.3.4) (Perozo et al. 2002a; Perozo et al. 2002b; Sukharev and Anishkin 2004; Sukharev et al. 2001a; Sukharev et al. 2001b).

Die N- und C-terminalen Seiten des homopentamer Kanals sind zur cytoplasmatischen Seite hin gerichtet, und der Loopbereich befindet sich im periplasmatischen Raum. Die Gesamtlänge des Tb-MscL-Kanals beträgt etwa 85 Å, wovon sich ca. 50 Å in der Membran und ca. 35 Å im Zytoplasma befinden. Die Breite des geschlossenen Kanals misst ca. 50 Å im transmembranen Bereich, und ca. 18 Å im cytoplasmatischen Bereich.

Den oberen Teil des Kanals wird durch die periplasmatischen Loop-Schleifen gebildet, die einen „Hut“ für die darunter liegenden transmembranen Helices bildet. Die beiden transmembran Helices sind jeweils um ca. 30° in der Membran geneigt.

Die langen TM1-Helices bilden eine trichterförmige Pore, deren Durchmesser zwischen 2-18 Å variiert. Jede TM1-Helix hat direkten Kontakt zu zwei benachbarten TM1-Helices in der Pore, sowie zur eigenen und einer benachbarten TM2-Helix. Im Eco-MscL-Kanal ist die Porenbildung durch das Helix-Paarungsmotiv $A_{20}VG_{22}V_{23}IG_{26}AAF_{30}KI_{32}$, einem so genannten „ridges-into-grooves“ Motiv, begünstigt. Die Helices werden in diesem Bereich durch die van der Waals Wechselwirkungen stabilisiert. In Tb-MscL die fünf Valine, welche sich jeweils in der Position 23 befinden, den engsten Teil der Pore. Die positive Ladung in der Mitte der Helix deutet, dass entweder eine neutralisierende Gegenladung in der Nähe vorhanden sein muss, oder die geladene Aminosäure (Lys₃₁) in der wässrigen Umgebung ausgerichtet ist. Die Mutationen in der poreschließenden Region führen zur Sensibilisierung des Kanals, so genannte „gain-of-function“- (GOF-) Mutanten sind hauptsächlich in dieser Bereich lokalisiert (Blount et al. 1998a; Blount et al. 1998b; Li et al. 2004; Maurer and Dougherty 2003; Ou et al. 1998; Yoshimura et al. 2001).

Die Pore des Kanals wird durch kurze TM2-Helices umringt, welche den hydrophilen Bereich der TM1-Helices von der Lipiddoppelschicht isolieren. Helix-Helix Interaktionen in der TM2-Helix gibt es nur zur eigenen und zu einer benachbarten TM1-Helix, wobei die hydrophobe Seite der TM2-Helix zu den Lipiden gerichtet ist. In der Mitte des ausgeprägten „Phenylalanin-Kamms“ (Phe₇₈, Phe₈₃, Phe₈₅, Phe₉₀, Phe₉₃) in Eco-MscL sitzt ein negativ geladene Asparaginsäure (D₈₄). Dieser Ladung ist in dem hydrophoben Milieu thermodynamisch ungünstig, weshalb evtl. die TM2-Helix über Asp₈₄ mit dem Lys₃₁ der TM1-Helix interagiert. Da die TM2-Helices einen Kontakt mit den Lipiden haben, fungieren sie als eine Art „Mechanosensor“ zur Übertragung der Membranspannung. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Mutationen in der TM2-Helix hauptsächlich zu einem so genannten „loss-of-fuction“- (LOF-) Phänotyp führen, die einen Verlust in der Mechanosensitivität aufweist (Levin and Blount 2004; Maurer and Dougherty 2003; Yoshimura et al. 1999). Den Übergang zwischen dem transmembranen und dem cytoplasmatischen Bereich des Kanals bildet ein N-terminaler Linker und die cytoplasmatische Loopregion.

Der N-terminale Linker verbindet die S1-Helix mit dem TM1-Bereich, und das Motiv **NXXD** in diesem Linker fungiert möglicherweise als ein mechanosensitiver Sensor,

welcher den mechanischen Reiz an die TM1-Helix überträgt (Kumanovics et al. 2002).

Im Sukharev-Guy Modell des Eco-MscL-Kanals sind die S1-Helices über hochkonservierte Phenylalanine (Phe₇ und Phe₁₀) in Helix-Helix Interaktionen verwickelt. Das dadurch entstehende linksgängige Bündel ist axial zur Pore gerichtet und fungiert als eine kleine „Schleuse“ (Gate)(Sukharev et al. 2001a). Dagegen zeigten die spätere Experimente an Cystein-Mutanten des Eco-MscL-Kanals sowie eine bessere Auflösung des N-Terminus des Tb-MscL-Kanals eine fast parallele Ausrichtung der S1-Helix zur Membran (Steinbacher et al. 2007). In diesem Modell ist die S1-Helix des Eco-MscL-Kanals durch die Phenylalanine F₇ und F₁₀ in der Membran verankert, und das Lysin (K₅) mit seiner positiven Ladung wechselwirkt mit den negativen Kopfgruppen der Lipide. Das in der S1-Helix vorkommende Motiv I₃IK**F**₇RE**F**₁₀AM₁₂ begünstigt Helix-Helix Interaktionen, was für das Sukharev-Guy Modell spricht. Da aber die Phenylalanine auch in die Lipid-Protein Wechselwirkungen involviert sind, wäre eine weitere Rolle als „Anker“ der S1-Helix in der Membran ebenfalls denkbar (Iscla et al. 2008). Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen der S1- und der TM2-Helix werden über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren Ile₃ und Ile₉₆ vermittelt (Sukharev et al. 2001a). Die Deletion der S1-Helix führt zum LOF-Phänotyp (Blount et al. 1996d), und deutet somit auf die Wichtigkeit des N-terminalen Bereichs hin.

Die negativen Aminosäuren des „Ladungscluster“ RKKEE der cytoplasmatischen Loopregion sind in der ursprünglichen Kristallstruktur des Tb-MscL-Kanals nach außen gerichtet (Chang et al. 1998) Spätere Untersuchungen zeigten, dass sie den Innenraum zwischen der Membran und der S3-Helix ausfüllen und eine Art „Hut“ oder „Deckel“ für die S3-Helices bilden. In MD-Simulationen sind die Loopregionen des Kanals flexibel und spielen möglicherweise eine sehr wichtige Rolle in der Kanalöffnung, da Deletionen im „Ladungscluster“ zum Verlust der Aktivität führten (Hase et al. 1995; Maurer et al. 2008).

Die S3-Helices sind in Sukharev-Guy Modell um ca. 15° zur Porenachse geneigt, und bilden durch das hoch konservierte Motiv LLX**E**IRDLL am Ende der jeweiligen Helices eine coiled-coil Struktur (Chang et al. 1998; Maurer et al. 2008; Sukharev et al. 2001a; Sukharev et al. 2001b). Mittels MD-Simulationen konnten zwischen den

S3-Helices eine durch hydrophobe Umgebung abgeschirmte Glu-Arg Salz-Brücken gezeigt werden. Diese S3-Helix-Bündel besitzen nur eine Molekularfilterfunktion, da ihre Deletion keinen Einfluss auf den Öffnungsmechanismus des Kanals zeigten (Anishkin et al. 2003; Hase et al. 1995; Hase et al. 1997).

Öffnungsmechanismus

Der Öffnungsmechanismus des MscL-Kanals ist nur postuliert und basiert auf indirekten EPR-Daten und MD-Simulationen. Es sind zwei Hauptmodelle bekannt, und beide beschreiben die Öffnung des Kanals als eine Bewegung ähnlich einer Irisblende.

Sukharev-Guy Modell:

Das Modell basiert auf Cystein cross-linking Experimente und MD-Simulationen. Der MscL-Kanal öffnet sich schrittweise, indem er von einem geschlossenen in einen entspannten Zustand übergeht, welcher schließlich mit dem vollen Öffnen des Kanals endet (Sukharev et al. 2001a).

In diesem Modell bilden die S1-Helices eine kleine cytoplasmatische „Schleuse“ (Gate) im Kanal. Während des Öffnens geht diese Schleuse als erstes auf, was einem prä-entspannten Zustand des Kanals entspricht. Mittels cross-linking Experimente wurde gezeigt, dass die S1-Helix durch aromatische Wechselwirkungen (Phe₇, Phe₁₀, Phe₂₉, Phe₈₅, Phe₉₃) mit den TM1- und TM2-Helices interagiert, und das Ganze durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen der S1-Helix (Ile₃) und der TM2-Helix (Ile₉₆) stabilisiert wird (Sukharev et al. 2001a). Für dieses Modell spricht zudem die Tatsache, dass durch cross-linking Experimente der S1-Helices miteinander das Öffnen des Kanals blockiert zu sein scheint (Sukharev et al. 2001a; Sukharev et al. 2001b).

Perozo-Martinac Modell:

Das zweite Modell basiert auf EPR-Experimenten und MD-Simulationen. Die Zugabe von Lysolipiden verursacht unterschiedliche mechanische Spannungen zwischen der äußeren und inneren Membran der Vesikel. Dieser Unterschied führt zur Öffnung des Kanals, wodurch eine ca. 3 nm große Pore entsteht (Abb. 2.3.5) (Ajouz et al. 1998; van den Bogaart et al. 2007).

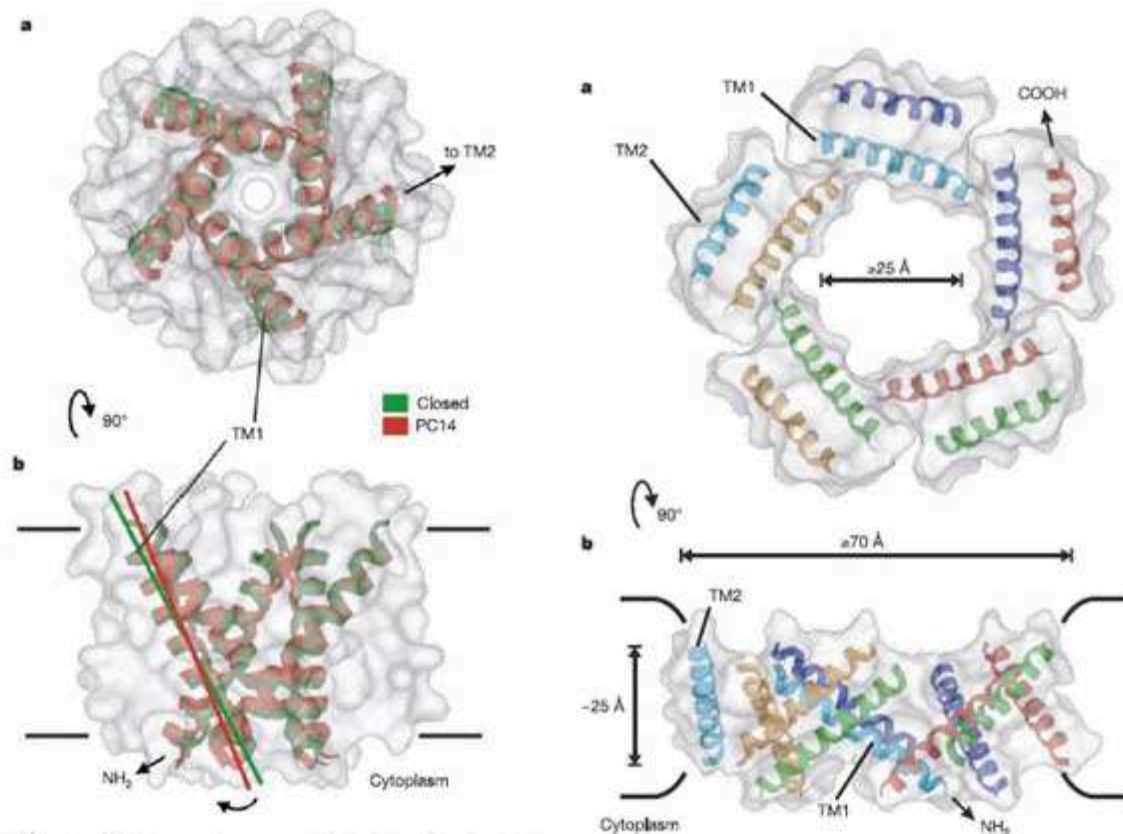


Abb. 2.3.5 Lipid vermitteltes Öffnen des MscL-Kanals (Quelle: Perozo E. et al. (2002) *Nature*, vol. 418: 942-948).

Die mechanische Veränderung der Membran wird über Lipid-Protein Wechselwirkungen an das Protein übermittelt und verursacht so die Neigung der TM1-Helices. Deshalb spielen die Länge der Lipidketten eine wichtige Rolle beim Öffnen des Kanals. In der Anwesenheit kurzkettiger Lipide (PC14) sind die TM1-Helices stärker geneigt als bei langkettigen Lipiden, was das Öffnen des Kanals vereinfacht (Perozo et al. 2002a).

Die Rolle der Loopregion für den Öffnungsmechanismus ist noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt eine Hypothese, wonach die Loops wie eine Feder während des Öffnungsmechanismus fungieren.

Im nächsten Kapitel wird die Loopregion und ihre Rolle in der Funktionalität des Kanals näher erläutert, da in dieser Arbeit gezielte Deletionen in diesem Bereich vorgenommen wurden.

2.4 Die Periplasmatische Loop Region des MscL-Proteins: Ihre Rolle in der Funktion des Kanals

Die periplasmatische Loop Region des MscL-Kanals fungiert als Linker zwischen den TM1- und TM2-Helices und ist einer der mobilsten Teile des Proteins. Homologieanalysen dieses Bereichs zeigten einen geringen Konservierungsgrad, was auf eine moderate Rolle in der Kanalfunktionalität deutet (Maurer et al. 2000; Moe et al. 2000; Pivetti et al. 2003). Die Länge des Loops variiert stark, beispielsweise von 20 Aminosäuren in *S. aureus* bis doppelt so lang in *B. bronchiseptica*. Diese Region ist in Eco-MscL mit 30 Aminosäuren um 4 Aminosäuren länger als im kristallisierten Tb-MscL.

Der Loop Bereich des Tb-MscL zeigt in Kristallstrukturanalysen die Ausbildung von Schleifen überhalb der Pore des Kanals (Chang et al. 1998). Im Eco-MscL Modell ist

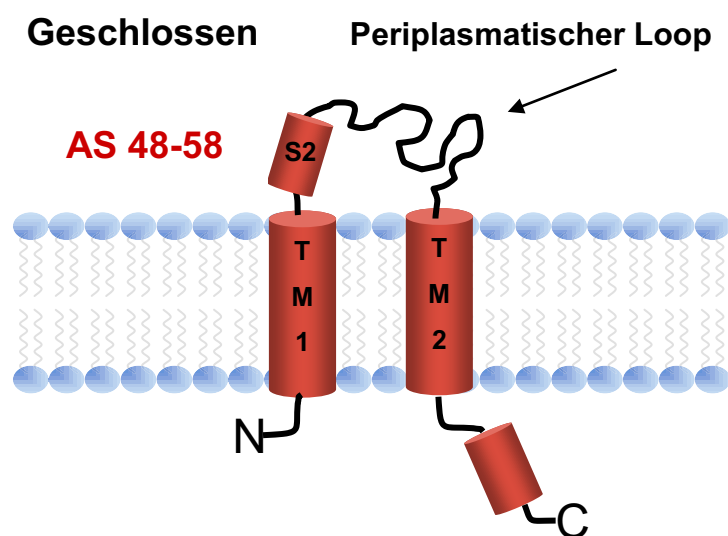


Abb. 2.4.1 Postulierte S2-Helix im geschlossenen Kanal.

eine kleine S2-Helix am Anfang der Loop Region postuliert, die mittels eines kurzen Linkers mit der TM1-Helix verbunden ist. Im geschlossenen Kanal ist sie fast senkrecht zur Porenachse ausgerichtet (Sukharev et al. 2001a). Unveröffentlichte Daten unseres Kooperationspartners Prof. Boris Martinac basierend auf EPR-Experimenten und MD-Simulationen bestätigten

eine Helix zwischen den Aminosäuren 48-58 im geschlossenen Kanal (Abb. 2.4.1).

Cross-Linking Experimente und MD-Simulationen des Loop Bereichs in Tb-MscL haben gezeigt, dass ein an Position 45 vorkommendes Arginin eines Monomers mit dem Gln 51 eines anderen Monomers Wasserstoff-Brücken eingeht, wodurch die Monomere im Loop Bereich miteinander verbunden werden (Gullingsrud et al. 2001). Im Gegensatz zu Tb-MscL weist Eco-MscL in dieser Loop Region keine Wasserstoff-Brücken auf. Dies war zu erwarten, da in diesem Bereich Eco-MscL anstatt Arginin und Glutamin eine sogenannte „Glycin-Schleife“ besitzt. In dieser Schleife sind außer Glycinen auch andere hydrophobe Aminosäuren vorhanden, wodurch die Entstehung von Wasserstoff-Brücken ausgeschlossen wird.

Die strukturellen Veränderungen in der Loop Region während des Öffnens des Kanals sind nicht bekannt. Jedoch weisen unveröffentlichte Daten unseres Kooperationspartners Prof. Boris Matrinac darauf hin, dass im offenen Zustand des Kanals zwei Helices in den Bereichen 44-53 und 59-69 entstehen, was zur Verkürzung des Loops führt (Abb. 2.4.2).

In dieser Region wurden bislang hauptsächlich Punktmutationen durchgeführt, deren Ergebnisse auf die Wichtigkeit dieses Bereichs deuteten.

Der Austausch des Glycins in Position 46 mit einer negativ geladenen Asparaginsäure führte

zu einem schweren GOF-Phänotyp und damit zur Sensibilisierung des Kanals. Demzufolge ist der Übergang zwischen der TM1-Helix und dem periplasmatischen Loop sehr empfindlich, da viele GOF-Mutationen in dieser Region vorkommen (Ou et al. 1998).

Eine mildere Auswirkung hatten Punktmutationen in der Mitte des Loops, da die Mutationen K55T (Ou et al. 1998), Q56P/R (Blount et al. 1997) und L69W (Powl et al.

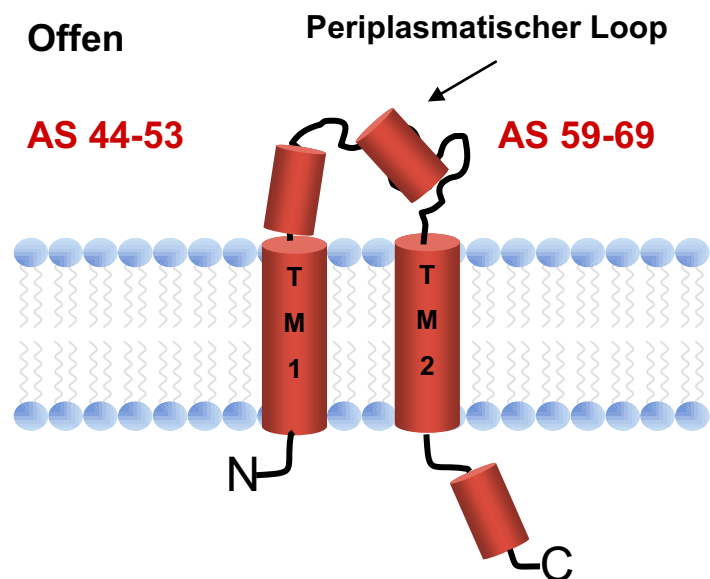


Abb. 2.4.2 Postulierte Helices im offenen Kanal.

2005) nur leichte Formen des GOF-Phänotyps aufwiesen, wobei aber die Auswechslung der Aminosäure Glutamin in der Position 65 in Eco-MscL einen starken Einfluss auf die Funktionalität des Kanals hatte. Der Austausch dieses Glutamins mit einer positiv geladenen Aminosäure (Arginin) führte zur Sensibilisierung des Kanals, dagegen der Austausch mit einer hydrophoben Aminosäure (Leucin) zum Verlust der Aktivität (Tsai et al. 2005).

Einige Mutationen am Ende der Loop Region führten zum GOF-Phänotyp in Eco-MscL, wobei der Austausch von H₇₄ den Verlust der Aktivität verursachte. LOF-Mutationen sind hauptsächlich am Ende des Loops lokalisiert und betrafen die hydrophoben Aminosäuren, die sich in der Nähe der TM2-Helix befanden (Levin and Blount 2004).

Die Rolle des periplasmatischen Loops im Öffnungsmechanismus ist nicht völlig geklärt. Untersuchungen zeigten, dass ein Durchtrennen der Primärsequenz des Kanals zu keinem Verlust der Aktivität führte, solange die N-terminalen (AS 1-67) und C-terminalen (AS 68-136) Hälften vorhanden waren. Der Kanal hatte die gleiche Leitfähigkeit wie WT-MscL, jedoch war er im Vergleich sensibler. In diesem Experiment wurden die beide Hälften des Proteins getrennt exprimiert und später in Vesikeln zusammen rekonstituiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass lediglich die TM1-Helix (N-Hälfte) an der Porenbildung beteiligt ist, die TM2-Helix (C-Hälfte) dagegen keinen Kanal bilden konnte und der Loop eine „Feder“-Rolle einnimmt (Park et al. 2004).

In anderen Untersuchungen wurden Extramembranteile des Kanals enzymatisch verdaut. Durch Trypsin-Spaltung von in Vesikeln rekonstituiertem MscL-Protein wurde die periplasmatische Loop Region und das cytoplasmatische Segment des Kanals abgeschnitten. Danach wurde dieses verkürzte Protein mittels Patch-Clamp-Technik auf die Aktivität untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass der Kanal sensitiver auf mechanischen Reiz reagierte und des Weiteren völlig funktionell war (Ajouz et al. 2000). Durch Entfernen der Phenylalanine (F₇, F₁₀ in der S1-Helix und F₅₄, F₅₇ im Loop) durch Chymotrypsin-Verdau wurde der MscL-Kanal weniger sensibel im Vergleich zur Trypsin-Spaltung (Ajouz et al. 2000). Durch die erhöhte Mechanosensitivität des mutierten Kanals im Loop Bereich kann man auf die

mögliche Feder“-Rolle des Loops im Öffnungsmechanismus schließen, wogegen er im geschlossenen Zustand den Kanal stabilisiert.

Erwähnenswert ist auch der Fakt, dass die Loop Region im Tb-MscL mit einer „Glycin-Schleife“ endet und dadurch für die Flexibilität dieses Bereichs sorgt. In Eco-MscL dagegen, kommt die „Glycin-Schleife“ am Anfang des Loops vor, d.h. in Eco-MscL ist der Anfang des Loops flexibel und in Tb-MscL das Ende. Das könnte einen Einfluss auf die Öffnungsmechanismus des Kanals haben (Abb. 2.4.3).

```
E. coli                45  LGLLIGGIDFKQFAVTLRDAQGDIPAVVMH 74
  
M. tuberculosis    43  INRIGVNAQSDVGILRI----GIGGGQTID 68
```

Abb. 2.4.3. Loop Sequenzvergleich der Eco-MscL und Tb-MscL. Gelb markiert sind die „Glycin-Schleifen“ im Loop Bereich des Proteins.

Aussagen über die genauen Strukturkomponenten des periplasmatischen Loops, die im Öffnungsmechanismus involviert sind, können nicht gemacht werden, weil der Loop Bereich bei vielen Untersuchungen vernachlässigt wurde. Im Öffnungsmodell des Kanals nach Perozo-Martinac wurde die MD-Simulation ohne Loop- und cytoplasmatische Region durchgeführt (Perozo et al. 2002a). Zwar haben neueste MD-Simulationen des MscL-Proteins gezeigt, dass die Vernachlässigung des periplasmatischen Loops keinen direkten Einfluss auf das Öffnen des Kanals hat, aber sie verändert die Elastizität des Proteins und führt zu einer breiteren Pore im offenen Zustand. Nach diesem Model funktionieren die Loops wie ein „Gummizug“ um die Pore herum und halten die Enden der Transmembran-Helices leicht zusammen gedrückt (Tang et al. 2008). Dieses Ergebnis wiederum bestätigt die Aussage über die mögliche Feder-Rolle des Loops.

Wenn der Loop die Feder-Rolle hat, sollte die Looplänge einen Einfluss auf die Öffnungsmechanismus haben, aber es wurden bislang keine Untersuchungen darüber gemacht. Der Fakt, dass es in Bakterien periplasmatische Loops mit unterschiedlichen Längen gibt, und in anderen Kanälen gezeigt wurde, dass die Länge der Loop-Region im Gegensatz zur Sequenz einen wichtigen Einfluss auf die Aktivität ausübt (Lee et al. 2009), lässt es sinnvoll erscheinen, in dieser Arbeit die MscL-Loop Region diesbezüglich zu untersuchen.

3. Motivation und Ziele der Arbeit

Mechanosensitive Kanäle sind Teil des Schutzsystems von Bakterien gegen äußere Umwelteinflüsse. Während eines hypo-osmotischen Schocks öffnet der mechanosensitive Kanal großer Leitfähigkeit (MscL) eine ca 3 nm große Pore und entlässt Osmolyte in den periplasmatischen Raum. Dadurch verringert sich der Turgordruck in der Zelle und sie kehrt in ihren normalen Zustand zurück. Die Kristallstruktur des geschlossenen MscL-Kanals ist bekannt, der Öffnungs-Mechanismus hingegen ist in vielen Teilen nur postuliert und bedarf weiterer struktureller Aufklärung. So ist beispielsweise zwar die Rolle der transmembranen Helices in der Kanalöffnung gut verstanden, aber die Funktion der periplasmatischen Loops weitgehend unbekannt.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Öffnungs-Mechanismus des MscL-Kanals zu untersuchen. Einerseits sollten Einblicke in die funktionelle Rolle der periplasmatischen Loop Region gewonnen werden, andererseits sollte versucht werden, die strukturellen Veränderungen im MscL-Kanal während des Öffnens zu verstehen. Zur Klärung der Rolle der periplasmatischen Loop-Region für die Funktion des Kanals sollten mehrere MscL-Deletionsmutanten hergestellt und deren Aktivität und strukturelle Integrität mittels Patch-Clamp und Zirkulardichroismus-Spektroskopie untersucht werden. Strukturelle Veränderungen während des Öffnens des Kanals sollten mittels ^{15}N -Festkörper-NMR Spektroskopie untersucht werden.

Im Laufe der Arbeit wurden in vielen der unternommenen strukturellen Experimente Hinweise beobachtet, die auf die Bildung von Clustern aus MscL-Kanälen hindeuteten. Die Bildung von Protein-reichen Domänen, und Protein-Protein Wechselwirkungen, die hierzu führen könnten, waren für MscL bislang unbekannt. Da Cluster aus Membranproteinen in jüngster Vergangenheit für großes Interesse gesorgt hatten, sollte als weiteres Ziel die Bildung von MscL-Clustern näher untersucht werden. Hierzu sollte Kleinwinkel-Neutronenstreuung (SANS) verwendet werden, um die Verteilung von MscL in der Membran zu untersuchen. Die Ergebnisse sollten mit Befunden aus weiteren Methoden verglichen werden, um ein umfassendes Bild der Cluster-Bildung und der ihr zugrundeliegenden Protein-

Protein-Wechselwirkungen zu erhalten. Weiterhin sollten die Auswirkungen der Cluster-Bildung auf die Durchführbarkeit von Strukturuntersuchungen am MscL-Kanal abgeschätzt werden.

4. Materialien und Methoden

4.1 Gentechnische Methoden

PCR

Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde für die Herstellung der Deletionsmutanten benutzt. Das Protokoll basiert auf das „Phusion Site-Directed Mutagenesis“-Kit (*Finnenymys*). Die benötigten Primer wurden bei der Firma MWG synthetisiert. Als Matrizen-DNA wird das WT-MscL Plasmid pQE70 verwendet.

Name	Primer Sequenz	Basen	GC %	Tm oC
Δ=45-53	Primer 1 variable: 5'TTTAAACAGTTTGCTGTCACGCTACG 3'	26nt	42,3	68,7+3
	Primer 2 constant: 5'AGGAGGCATGATGATATCGGCAACC 3'	25nt	52,0	67,0+3
Δ=45-58	Primer 2 variable: 5' GTCACGCTACGCGATGCG 3'	18nt	66,6	69,7
	Primer 2 constant: 5'AGGAGGCATGATGATATCGGCAACC 3'	"_"	"_"	"_"
Δ=45-63	Primer 3 variable: 5' GCGCAGGGGATATCCCTG 3'	19nt	68,4	71,1
	Primer 2 constant: 5'AGGAGGCATGATGATATCGGCAACC 3'	"_"	"_"	"_"
Δ=45-69	Primer 4 variable: 5' GCTGTTGTGATGCATTACGGTGTC 3'	24nt	50,0	67,5+3
	Primer 2 constant: 5'AGGAGGCATGATGATATCGGCAACC 3'	"_"	"_"	"_"
Δ=45-74	Primer 1 constant: 5' TACGGTGTCTTCATTCAAACGTC 3'	24nt	41,6	66,1+3
	Primer 2 constant: 5'AGGAGGCATGATGATATCGGCAACC 3'	25nt	52,0	67,0+3
Δ=74-54	Primer 1 constant: 5' TACGGTGTCTTCATTCAAACGTC 3'	"_"	"_"	"_"
	Primer 5 variable: 5' ATCGATCCCGCCAATTAATAAGCC 3'	24nt	45,8	66,6+3
Δ=74-59	Primer 1 constant: 5' TACGGTGTCTTCATTCAAACGTC 3'	"_"	"_"	"_"
	Primer 6 variable: 5' AGCAAACGTGTTAAAATCGATCCCG3'	25nt	40,0	68,5+3
Δ=74-64	Primer 1 constant: 5' TACGGTGTCTTCATTCAAACGTC 3'	"_"	"_"	"_"

	Primer 7 variable: 5' ATCGCGTAGCGTGACAGC 3'	18nt	61,1	65,7
Δ=74-70	Primer 1 constant: 5' TACGGTGTCTTCATTCAAACGTC 3'	"_"	"_"	"_"
	Primer 8 variable: 5' AGGGATATCCCCCTGCGC3'	18nt	66,6	67,4

PCR-Zyklen

PCR-Einstellungen		
Arbeitsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Initialisierung	98	30
Denaturierung	98	30
Annealing	67	30
Extension	72	180
Final	72	600
Aufbewahrung	4	Über Nacht

} x 25

Ligation und Transformation

Erfolgte nach dem Protokoll „Phusion Site-Directed Mutagenesis“-Kit (*Finnenymys*). Durch die Phosphorilierten Primer kann das PCR-Produkt direkt ligiert werden und anschliessend in die kompetenten M15- Zellen transformiert.

Durch die Selektionsmarker werden die gewünschten Zellen aussortiert und Kryostocks hergestellt.

Plasmidisolierung (Miniprep)

Plasmid-DNA wurde mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (*peqLAB*) isoliert, welches ca. 5-8 µg DNA- Ausbeute erzielte.

Hierfür wurden 10 ml LB-Medium in einen 50 ml Kolben vorgelegt und die entsprechende Antibiotikamenge zugegeben. Das Medium wurde mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37 °C über Nacht in einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur bei 5000 g für 10 min zentrifugiert und das gewonnene Pellet in 500µl Lösung I vollständig resuspendiert. Die in Lösung I vorhandene RNase A zerstört RNA. Danach wurde 500µl Lösung II zugegeben und vorsichtig invertiert, da bei diesem Schritt Vortexen vermieden werden sollte. Durch 10 % SDS, das in Lösung II vorhanden ist, werden die Zellen lysiert. Um die lysogene Effizienz zu erhöhen, wurde bei RT für 2-3 Minuten inkubiert. Vorhandene Proteine werden durch alkalische Bedingungen durch 700µl Lösung III als weißes Präzipitat ausgefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei 10000 g wird der klare Überstand in eine HiBind-Miniprep-Zentrifugensäule überführt, wobei die Kontamination mit Proteinresten zu vermeiden ist. Nach 1 min Zentrifugation bei 10000 g bleibt die DNA durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken an der Säule gebunden und der Durchfluss kann verworfen werden. Zum Waschen der Säule um Proteinreste zu entfernen wird 500 µl HB-Puffer zugegeben und danach 1 min zentrifugiert. Anschließend wird die gebundene DNA 2 x mit 750 µl ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen und abschließend die Zentrifugensäule bei maximaler Geschwindigkeit trocken zentrifugiert. Die Plasmid-DNA kann nun mit 50-100µl Elutionspuffer oder desionisiertem Wasser von der Säule eluiert werden und die DNA-Konzentration bestimmt werden.

Plasmidisolierung (Midiprep)

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit dem QIAfilter Plasmid Midiprep Kit (*QIAGEN*) isoliert, welches ca. 100 µg DNA- Ausbeute erzielte. Aufreinigung erfolgte nach „QIAfilter Plasmid Midiprep Kit“ Protokoll.

Konzentrations Bestimmung der Plasmid-DNA

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA wurde mit einem Nano-Drop (*ThermoScientific*) mit Elutionspuffer oder destilliertem Wasser als Referenzwert durchgeführt.

DNA Extraktion aus dem Agarose Gel

DNA Fragmente (70 bp-10kb) wurden aus dem Agarosegel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (*QIAGEN*) extrahiert. Die maximale Agarosegel-Menge beträgt 400mg.

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorf Gefäß überführt. Je 100 mg Agarosegel-Fragment wurde mit 300µl QG-Puffer, der Guanidin Thiocyanat enthielt, zugefügt und bei 50°C bis zu kompletter Auflösung des Gels inkubiert. Bei 2% Agarosegel wurde das Volumen des QG-Puffers verdoppelt. Die Ausbeute an DNA-Fragmenten die kleiner 500bp oder größer 4kb sind, wurde mit der Zugabe von 100µl Isopropanol erhöht. Nach Solubilisierung der Gel-Fragmente, wurde die Lösung auf eine QIAquick Säule aufgetragen. Durch eine 1 min Zentrifugation bei 17 900 g bindet DNA an der Säule. Reste des Agarosegels kann hierbei durch Zugabe von 500µl QG-Puffer und anschließender Zentrifugation bei 17 900 g entfernt werden. Gebundene DNA wurde durch 5 min Inkubation mit 750 µl ethanolhaltigen PE-Puffer und anschließender Zentrifugation bei 17 900 g entsalzt. Der Durchfluss kann verworfen werden. Um Ethanolreste zu entfernen, wurde die Säule bei 17 900 g trocken zentrifugiert. Abschließend konnte die DNA durch 50µl EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) von der Säule eluiert werden. Um eine Konzentrationserhöhung des Eluats zu erzielen, kann man auch nach 2 min Inkubationszeit mit 30µl EB-Puffer eluieren.

Agarose-Gel Elektrophorese

Auftrennung von DNA-Fragmenten über 0,5 Kb wurde mit 1% Agarosegelen durchgeführt, während zur besseren Auftrennung kleinerer Fragmente 2% Agarosegele bevorzugt wurden.

100 mg Agarose für ein 1% Gel, bzw. 200 mg für ein 2 %, wurde mit TAE-Puffer bis 100 ml aufgefüllt und in der Mikrowelle bis zur kompletten Auflösung erhitzt. Das flüssige Gel wurde abgekühlt bis es handwarm war und mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Durch leichtes Schütteln wurde eine homogene Verteilung gewährleistet und anschließend wurde das Gel gleichmäßig in eine 12 cm Gel-Gießkammer eingefüllt. Nach der Aushärtung wurde das Gel in eine Laufkammer gegeben und mit TAE-Puffer überschichtet. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt und die mit Probenpuffer versetzten Proben langsam einpipettiert. Als Referenz wurde eine DNA-Leiter mit Banden bekannter Größe aufgetragen. Nachdem die Laufkammer an den Strom angeschlossen wurde, wurde dieser bei konstant 120 V eingeschaltet. Die Elektrophorese war beendet, wenn die Lauffront die Gelunterkante erreicht hat. Das Gel wurde dann aus der Laufkammer genommen, unter einer UV-Lampe untersucht und ein Bild aufgenommen.

DNA-Ethanol-fällung

50 µl isolierter Plasmid-DNA wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 125 µl 100%-igem, eiskaltem Ethanol und 5 µl Natriumacetat (3 M, pH 4,8) versetzt. Daraufhin folgte eine 30 minütige Inkubation bei -80°C inkubiert und eine Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 min. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Präzipitat in 125 µl eiskaltem, 70%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Präzipitat unter der Reinraumbank an der Luft getrocknet.

Die erhaltene DNA wurde zur Sequenzierung zur Firma MWG verschickt.

4.2 Molekularbiologische Methoden

Proteininformation

Protein	MW (Da)	AS	Sequenz
WT	16091.9	144	MRIKEFREF AMRGNVVDLA VGVIIGAAFG KIVSSLVADI IMPPLGLLIG GIDFKQFAVT LRDAQGDIPA VVMHYGVFIQ NVFDLIVAF AIFMAIKLIN KLNRRKKEEPA AAPAPTKEEV LLTEIRDLLK EQNNRSRSHH HHHH
45-53	15239.9	135	MRIKEFREF AMRGNVVDLA VGVIIGAAFG KIVSSLVADI IMPPFKQFAV TLRDAQGDIP AVVMHYGVFI QNVFDLIVA FAIFMAIKLI NKLNRKKEEP AAAPAPTKEE VLLTEIRDLL KEQNNRSRSH HHHHH
45-58	14618.2	130	MRIKEFREF AMRGNVVDLA VGVIIGAAFG KIVSSLVADI IMPPVTLRDA QGDIPAVVMH YGVFIQNVFD FLIVAFAIM AIKLINKLNR KKEEPAAAPA PTKEEVLLTE IRDLLKEQNN RSRSHHHHHH
45-69	13451.9	119	MRIKEFREF AMRGNVVDLA VGVIIGAAFG KIVSSLVADI IMPPAVVMHY GVFIQNVFDF LIVAFAIMA IKLINKLNRK KEEPAAPAP TKEEVLLTEI RDLLKEQNNR SRSHHHHHH
45-74	12914.2	114	MRIKEFREF AMRGNVVDLA VGVIIGAAFG KIVSSLVADI IMPPYGVFIQ NVFDLIVAF AIFMAIKLIN KLNRRKKEEPA AAPAPTKEEV LLTEIRDLLK EQNNRSRSHH HHHH
54-74	13913.4	124	MRIKEFREF AMRGNVVDLA VGVIIGAAFG KIVSSLVADI IMPPLGLLIG GIDFYGVFIQ NVFDLIVAF AIFMAIKLIN KLNRRKKEEPA AAPAPTKEEV LLTEIRDLLK EQNNRSRSHH HHHH
59-74	14388.0	128	MRIKEFREF AMRGNVVDLA VGVIIGAAFG KIVSSLVADI IMPPLGLLIG GIDFKQFAYG VFIQNVDFL IVAFAIMAI KLINKLNRKK EEPAAAPAPT KEEVLLTEIR DLLKEQNNRS RSHHHHHH
64-74	14972.6	133	MRIKEFREF AMRGNVVDLA VGVIIGAAFG KIVSSLVADI IMPPLGLLIG GIDFKQFAVT LRDYGVFIQ NVFDLIVAF AIFMAIKLINK LNRKKEEPA APAPTKEEV L TEIRDLLKE QNNRSRSHH HHH
70-74	15554.3	139	MRIKEFREF AMRGNVVDLA VGVIIGAAFG KIVSSLVADI IMPPLGLLIG GIDFKQFAVT LRDAQGDIPY GVFIQNVFDF LIVAFAIMA IKLINKLNRK KEEPAAPAP TKEEVLLTEI RDLLKEQNNR SRSHHHHHH

Hergestellte MscL-Protein Proben werden mittels 12%-iger SDS-PAGE analysiert und spätere Untersuchungen verwendet (Siehe 5.1)

4.3 Mikrobiologische Arbeiten

Steriles Arbeiten

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Reinraumbank) durchgeführt. Die Glasgefäße wurden bei 220°C für 2 Stunden sterilisiert. Lösungen und Medien wurden bei 121°C bei 1 bar für 30 min autoklaviert und hitzeempfindliche Lösungen mittels Filter (22 µm) sterilfiltriert.

Lösungen:

LB-Medium	<i>(Zellaufzucht):</i>	10 g Bactotrypton 10 g NaCl 5 g Hefe ph 7,2 mit ddH ₂ O bis 1 l auffüll.
Ampicillin-Lösung	<i>(für Selektion):</i>	85 mg/ml
Benzonase	<i>(Nuklease):</i>	5 µl
Benzamidin	<i>(Proteaseinhibitor):</i>	1 ml 75 mg/ml,
Pefabloc	<i>(Proteaseinhibitor):</i>	1 ml 4,8 mg/ml

Expression und Aufreinigung von 6His-MscL

Präkultur Zuerst wurde 50-100 ml LB Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin vorgelegt und anschließend mit Bakterien inokuliert (aus Glycerolstock oder von einer Agar-Platte). Diese Präkultur wuchs über Nacht bei 37°C im Schüttler (~200-220rpm) und erreichte ca. eine OD₆₀₀≈ 4,0 am nächsten Tag.

Expression In 2x 2 l Erlenmeyer Kolben wurden je 0,5 l LB Medium mit entsprechenden Antibiotika (100µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin) vorgelegt und mit der Präkultur bis zu einer OD₆₀₀≈0,2 beimpft. Die Kultur wurde im Schüttler bei 37°C bis OD₆₀₀≈ 0,6-0,8 wachsen lassen und anschließend mit 1 mM IPTG induziert. Nach vierstündigem Wachstum wurden die Zellen bei 5500 g bei 4 °C geerntet. Das gewonnene Pellet wurde in ca. 30 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und bei -20 °C eingefroren.

Der Zellaufschluss erfolgt mittels „french press“-Methode und durch die zwei Ultrazentrifugationsschritte kann die membran- und cytoplasmatische Fraktionen voneinander getrennt werden. Die Membran-Fraktion wird mit ca. 1,5%-igen Triton X-100 Detergens 2 h bei RT solubilisiert und anschließend über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Die Membranproteine werden für weitere Untersuchungen in Detergens oder Lipiden Beisein untersucht.

4.4 Spektroskopische Methoden

Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Sekundärstrukturintegrität des MscL-Kanals wurde mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie (*engl.* circular dichroism, CD-Spektroskopie) untersucht. Sie liefert eine qualitative Aussage über die räumliche Struktur von Molekülen und hat sich wegen uneingeschränkter Molekülmasse, geringer Probenmengen und leichter Probenpräparation als schnelle, einfache und zerstörungsfreie Methode in der Strukturbiologie etabliert.

Diese Methode basiert auf der Chiralität des untersuchten Objekts (chiroptische Methode) und auf dem Absorptionsverhalten des Chromophors. Ein asymmetrisches C α -Atom als chirales Zentrum und die unmittelbar benachbarte Peptidbindung als Chromophor machen das Protein optisch aktiv, d.h. es kann die Schwingungsebene eines linear polarisierten Lichts um einen bestimmten Winkel α drehen (Abb. 4.4.1) und eingestrahktes Licht in Abhängigkeit von der Polarisation verschieden absorbieren.

a.)

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{l * c}$$

α	Drehwinkel in Grad
l	Weglänge der Küvette in cm
c	Konzentration in $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$
T	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$
λ	Wellenlänge in cm
M	molare Masse in $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

b.)

$$[\Phi]_{\lambda}^T = \frac{[\alpha]_{\lambda}^T * M}{100}$$

$[\alpha]_{\lambda}^T$	Spezifischer Drehwinkel in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
$[\Phi]_{\lambda}^T$	Spezifischer molarer Drehwert in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$

Abb.4.4.1: Optische Rotationsdispersion (ORD) der optisch aktiven Substanzen a.) Spezifischer Drehwinkel $[\alpha]_{\lambda}^T$ der optisch aktiven Verbindungen b.) Spezifischer molarer Drehwert $[\Phi]_{\lambda}^T$ komplexer optisch aktiver Moleküle z.B. Proteine. Wie an den Formeln zu sehen ist, sind der spezifische Drehwinkel und der spezifische molare Drehwert von der Temperatur und der Wellenlänge des eingestrahkten Lichts abhängig.

Licht wird in der Wellenoptik als periodische Oszillation elektrischer und magnetischer Felder in Zeit und Raum betrachtet. Nach der Maxwellschen Theorie wird es als elektromagnetische Transversalwelle beschrieben, d.h. elektrische und magnetische Feldvektoren stehen immer senkrecht zur Ausbreitungsrichtung, wobei magnetische (H) und elektrische (E) Komponente phasenversetzt schwingen. Rein mathematisch gesehen kann linear polarisiertes Licht in einen rechts- und einen links zirkular polarisierten Lichtstrahl zerlegt werden, deren E-Vektoren gleiche Amplitude und Phase haben, und sich in entgegengesetzter Richtung um die Ausbreitungsrichtung drehen. Wenn zwei linear-polarisierte Lichtstrahlen bezüglich der Phase um $\pi/2 = 90^\circ$ gegenüber einander verschoben sind, setzen sie sich zu zirkular polarisiertem Licht zusammen. Die Drehrichtung ergibt sich daraus, welcher der beiden Lichtstrahlen (links $[\alpha]_\lambda^T < 0$ oder rechts $[\alpha]_\lambda^T > 0$) gegenüber dem zweiten verzögert wird. In einer optisch aktiven Verbindung werden diese beiden Lichtstrahlen entgegengesetzter Drehrichtung unterschiedliche Geschwindigkeiten haben. Daraus resultiert ein unterschiedlicher Brechungsindex n je nach Drehrichtung, das optische Rotationsdispersions (ORD) Phenomen: Bei Austritt aus der Küvette werden rechts und links zirkularpolarisierte Lichtstrahlen eine Phasenverschiebung haben, wodurch eine Drehung der Polarisationssebene resultiert. Außerdem besitzt rechts und links-zirkularpolarisiertes Licht einen unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten ϵ , das Zirkulardichroismus (CD)-Phänomen: Die rechts- und links-drehenden Komponenten des polarisierten Lichts werden unterschiedlich absorbiert und deshalb die entsprechenden Amplituden verändert, welches bei Austritt aus der Küvette zur Bildung eines elliptisch polarisierten Lichts führt. Ein elliptisch polarisiertes Licht ist durch die große und kleine Achse der Ellipse, deren räumlichen Neigung, der sog. Elliptizität (θ), und durch die Umlaufrichtung des E-Vektors definiert. Bei komplexen Molekülen (z.B. Proteinen) wird die spezifische molare Elliptizität $[\theta]$, bezogen auf die gemittelte Molmasse der optisch aktiven Reste (z.B. Aminosäurereste) (*engl.* mean residual eillipticity, MRE) definiert. Im Wellenlängenbereich in der Nähe einer Absorptionsbande sind die Stärke der ORD und CD Effekte von der Wellenlänge abhängig (Cotton-Effekt).

Die Brechung und Streuung (resultierend auch die Absorption) sind Ergebnis der Dipolschwingungen der äußeren Elektronen eines Moleküls (Elektronenwolke wird

verschoben), die durch polarisiertes Licht induziert wird. In der Peptidbindung der Proteine werden dabei $\pi \rightarrow \pi'$ (~ 193 nm, Amidbindung) und $n \rightarrow \pi'$ (~ 222 nm, ungepaarte Elektronen des Sauerstoffs) Übergänge induziert, was zur Absorption des eingestrahlten Lichts führt. Da diese von der räumlichen Anordnung der Molekülsegmente abhängt, kann Information über die Sekundärstruktur von Proteinen gewonnen werden. Daher zeigen die jeweiligen Sekundärstruktur-Arten des Proteins im nahen UV-Wellenlängenbereich (von 180 nm bis 260 nm) ein charakteristisches CD-Spektrum (Abb. 4.4.2).

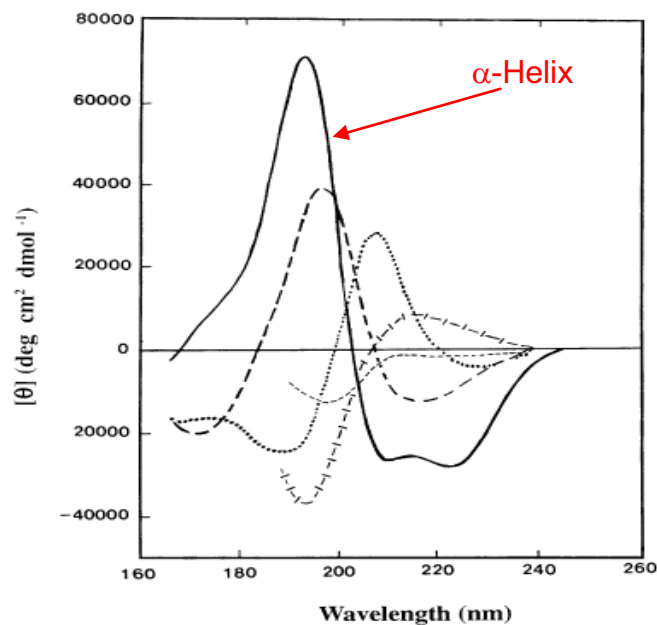


Abb. 4.4.2 Die charakteristischen CD-Spektren jeweiliger Sekundärstrukturen des Proteins. Das CD-Spektrum einer α -Helix zeigt ein positives Maximum bei 193 nm ($\pi \rightarrow \pi'$) und zwei negativen Maxima bei ca. 208 nm ($\pi \rightarrow \pi'$) und bei 222 nm ($n \rightarrow \pi'$), wobei das Verhältnis der positiven und negativen Anteile des Spektrums idealerweise 2:1 beträgt (Quelle: Kelly S. M. et al., 2005).

Probenvorbereitung: Proteinaufreinigung in nativem Zustand erfolgt mittels Ni-Affinitätschromatographie mit anschließendem Pufferaustausch mit 10 mM Phosphat Puffer (ohne NaCl) pH 7.2 und 1% TX-100 Detergens. Die Proteinkonzentration wird mit dem DC Protein Assay Kit (BIO-RAD) berechnet (als Eichprotein wird Bovines Serumalbumin, BSA verwendet). Das Protein wird in Lipid-Vesikeln mit Protein-zu-Lipid Verhältnis 1:1000 (mol/mol) rekonstituiert und zeitgleich wird das Detergens durch die Inkubation mit Biobeads (BIO-RAD) für 3-4 h entfernt.

Die hergestellten Proben werden in eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm und einem Volumen von 260 μl gegeben und überhalb der Phasenübergangstemperatur der Lipide gemessen (CD-spektropolarimeter, J-810, *Jasco*). Die Spektren werden im Bereich 180 nm -260 nm mit 10 nm/min Abstände 8 s lang aufgenommen. Die Messung wird drei Mal wiederholt. Als Referenz werden entsprechende Detergens- oder Lipid-Vesikel verwendet und die aufgenommenen Spektren von dem CD-Spektrum des jeweiligen Proteins abgezogen.

Kernresonanz Spektroskopie

NMR-Methoden basieren auf den Wechselwirkungen zwischen magnetisch aktiven Kernen und einem angelegten Magnetfeld (Abschnitt 5.3) (Evans, J.N.S., *Biomolecular NMR Spectroscopy*, 1995; Friebolin, H., *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 1999). In Flüssigkeiten führen Moleküle isotrope, schnelle Bewegungen aus, die zur Ausmittelung dieser Wechselwirkungen auf ihre isotropen Mittelwerte führen, wodurch sich eine hohe Auflösung erzielen lässt. Dagegen ist in Festkörpern die Beweglichkeit der Moleküle eingeschränkt, was zu einer Linienverbreiterung der Spektren führt. Dadurch ist die Festkörper-NMR ohne spezielle Techniken keine hochauflösende spektroskopische Methode. Gründe für die Linienverbreiterung sind T_2 -Relaxation, Anisotropie, Dipol-Dipol-Kopplungen und die oft heterogene Umgebung der Moleküle.

Die langsamen Bewegungen der Moleküle verursachen eine starke T_2 -Relaxation. Wegen der invers proportionalen Abhängigkeit der Linienbreite von der T_2 -Relaxationszeit, ergibt sich eine erhebliche Linienverbreiterung der Spektren:

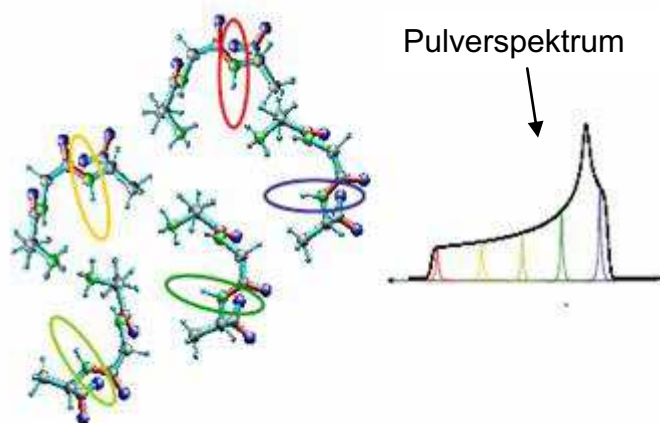


Abb. 4.4.3. „Pulverspektrum“ verursacht durch Anisotropie-Effekte der Festkörper-NMR. (Quelle: Vorlesung „Einführung in die NMR-Spektroskopie“).

$$\text{Linienbreite} = 1/(\pi T_2)$$

Da die Resonanzfrequenz von der Molekülorientierung im Magnetfeld abhängig ist, treten in der Festkörper-NMR Anisotropie-Effekte auf.

Sind die molekularen Bewegungen langsamer als die NMR-Zeitskala (ca. 1 ms), so werden die orientierungsabhängigen Resonanzfrequenzen, anders als in der Flüssigkeits-NMR, nicht ausgemittelt. Kommt das Molekül beispielsweise in allen möglichen Orientierungen in der Probe vor, so enthält das Festkörper-NMR-Signal dann die Resonanzfrequenzen aller Orientierungen, was zu einem sogenannten „Pulverspektrum“ führt (Abb. 4.4.3).

Wegen seiner stark ausgeprägten homonuklearen Dipolkopplungen und der damit verbundenen Linienverbreiterung eignet sich ^1H in der Festkörper-NMR nicht für die direkte Detektion. Daher werden Kerne, die in geringerer Häufigkeit in der Probe vorhanden sind und schwächere Dipolkopplungen ausbilden, wie zum Beispiel ^{13}C oder ^{15}N , für Festkörper-NMR-Experimente bevorzugt. Durch die größeren internuklearen Abstände der „verdünnten“ Spins und deren geringerem gyromagnetischen Verhältnis sind ^{13}C - ^{13}C oder ^{15}N - ^{15}N homonukleare Kopplungen in der Regel vernachlässigbar. Heteronukleare Kopplungen zu den umgebenden ^1H -Kernen kann man durch ^1H -Entkopplung unterdrücken.

$$\delta = \begin{vmatrix} \delta_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \delta_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \delta_{33} \end{vmatrix}$$

Abb. 4.4.4 Durch den Tensor der chemischen Verschiebung lässt sich die Orientierungsabhängigkeit eines Kerns zu B_0 Feld darstellen. Im Hauptachsensystem notiert enthält er die drei Hauptwerte der chemischen Verschiebung.

Um die geringe Empfindlichkeit von ^{13}C und ^{15}N zu verbessern, kann Magnetisierung durch Kreuzpolarisation von ^1H auf die unempfindlichen Kerne übertragen werden. Dieses Verfahren stellt eine Standardmethode der Festkörper-NMR dar. Im durch Kreuzpolarisation angeregten, und unter ^1H -Entkopplung aufgenommenen NMR-Spektrum treten dann keine dipolaren und skalaren Spin-Spin-Wechselwirkungen auf, und die Signale sind nur durch die Anisotropie der chemischen Verschiebung verbreitert. Diese wird durch die Hauptwerte des Tensors der chemischen Verschiebung, δ_{11} , δ_{22} und δ_{33} , beschrieben, die die Resonanzfrequenz für drei spezielle Ausrichtungen des markierten Molekülsegments bezüglich des Magnetfelds darstellen. Der Tensor der chemischen Verschiebung, δ , ist im Hauptachsen-Koordinatensystem diagonal (Abb. 4.4.4).

Die gemessene chemische Verschiebung eines Molekülsegments in einer bestimmten Orientierung bezüglich des Magnetfelds ergibt sich als die δ_{33} Komponente des Tensors nach Koordinatentransformation ins Laborsystem (mit der z-Achse parallel zum Magnetfeld). In einem Pulverspektrum, in dem alle Orientierungen vorhanden sind, entsprechen die drei Hauptwerte den Frequenzen der beiden Kanten und eines charakteristischen Peaks (siehe Abb. 4.4.3). Im Fall einer axial-symmetrischen elektronischen Umgebung ($\delta_{11} = \delta_{22} \neq \delta_{33}$) fällt das Maximum des Pulverspektrums zusammen mit einer der beiden Kanten, und es ergibt sich eine für axiale Symmetrie charakteristische Linienform. In Flüssigkeit wird die isotrope chemische Verschiebung gemessen, die sich aus dem Mittelwert der drei Hauptwerte des chemischen Verschiebungstensors berechnet. Mittels „*magic angle spinning*“ (MAS) kann man die Anisotropie der chemischen Verschiebung auch in Festkörpern verschwinden lassen. Wenn die Probe um eine Achse, die um $54,7^\circ$ aus der Richtung des Magnetfelds gekippt ist, mit mehreren Kilohertz rotiert wird, erhält man hoch aufgelöste Spektren ähnlich wie in der Flüssigkeits-NMR. Der Grund hierfür ist, dass bei einer Drehung um eine um θ geneigte Achse die chemische Verschiebungs-anisotropie um einen Faktor $(3\cos^2\theta-1)$ verschmälert wird. Ist $\theta = 54,7^\circ$ („magischer Winkel“), so wird die Verschiebungsanisotropie Null. Mit der Anisotropie der chemischen Verschiebung verschwindet auch die Strukturinformation, die sie enthält. Diese kann aus den Seitenband-Signalen zurückgewonnen werden, die entstehen, wenn die Probe nur langsam gedreht wird.

Protein Rekonstitution in Lipid Membranen

Lipid-Film Vorbereitung (nur bei Glassplättchen Vorbereitung): Gewünschte Lipidmischung wird mit CHCl_3 aufgelöst und mit N_2 (oder Ar) beblasen um einen Lipidfilm zu bilden. Den hergestellten Lipidfilm wird über Nacht im Excikator eingebracht und die restlichen Chloroform-Reste entfehrt.

Vorbereitung der unilamellaren Vesikel (ULV) und Protein Rekonstitution: Für die gewünschte Lipid Konzentration wird auf den Lipidfilm oder die Lipidmischung (für die Bizellen) temperierter (überhalb des Phasenübergangstemperatur der Lipide) Puffer ohne Detergens zugegeben. Hergestellt wird 10 mg/ml Lipid-Suspension, welches als multilamellaren Vesikeln (MLV) vorliegen.

Die MLV werden 1 h lang mit Ultraschall behandelt oder extrudiert und die unilamellaeren Vesikel (ULV) mit ca. 100 nm Durchmesser hergestellt. Zu den ULVs wird Triton X-100 mit der Verhältnis Lipid: Triton X-100 = 1:1 (Masse). Danach wird die gewünschte Proteinmenge zugegeben. Das endgültige Massenverhältnis für Lipid-zu-Triton X-100 beträgt 1:2. Diese Mischung wird 1-2 Stunde lang überhalb der Phasenübergangstemperatur inkubiert. Anschließend wird die Biobeads (*BioRad*) zu der Probe gegeben und ca. 3-4 h lang inkubiert.

Ultrazentrifugation um Membranfraktion zu erhalten: der Überstand wird in Ultrazentrifugationsröhrchen transferiert, mit ddH_2O bis 6,5 ml aufgefühlt und ultrazentrifugiert bei 100 000 g für 2h, 4 °C.

Nschder Ulatrazentifugation wird der Überstand verworfen und das Pellet mit H_2O oder verdünntem Puffer gewaschen. Weiter wird je nach Experiment der A.) oder B.) Preparations-Weg genommen.

A.) Herstellung der Bizellen: Für die Bizellen herstellung wir DMPC als langkettiges- und DHPC als kurzketigges Lipid verwendet. Wobei auch ein aanionisches Detergens- CHAPSO anstatt DHPC verwendet werden kann.

Hergestelltes Pellet in H_2O oder verdünntem Puffer resuspendieren und ultrazentrifugieren bei 100 000 g für 2h bei 4 °C. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit Wasser oder entsperchende Puffer resuspendiert wird. Anschliesend wird zu dem Pellet kurzkettige Lipide (DH(6)PC) oder Detergens dazugegen, so das

Q=3-4 erreicht wird. Lipidmischung wird abwechselnd bei 4°C und 37°C mehrmals inkubiert.

B.) Glasplättchen Vorbereitung: Gewonnenes Pellet wird in ca. 400 µl verdünntem Puffer resuspendiert und auf die acht Glasplättchen aufgetragen. Die Proben werden im Beisein des Silikagels (evtl. bei 48°C) über Nacht trocknen gelassen, danach werden sie gestapelt und rehydratisiert bei hoher Luftfeuchtigkeit (im Beisein K₂SO₄) für 24h durch die Inkubation. Anschließend wird die Probe in Parafilm eingewickelt.

Kleinwinkel-Neutronenstreuung (SANS)

Die SANS-Experimente wurden auf dem High-Flux-Instrument D22 am ILL, Grenoble 36 geführt. Die Intensität wurde für zwei q-Bereiche von 0,003 bis 0,04 Å⁻¹ und 0,02 bis 0,4 Å⁻¹ gemessen, mit einer Wellenlänge von $\lambda = 6 \text{ \AA}$ ($\pm 10\%$ FWHM), Kollimation von 17,6 und 2,8 m, Detektor-Entfernungen von 17,6 und 2,5 m und Detektor-Offsets von 0 und 4 m, jeweils. Der Impulsübertrag q ist als $q = 4\pi \sin(\theta) / \lambda$, wobei 2θ der Streuwinkel definiert. Die Daten wurden von MscL gesammelt. Protein wurde in DOPC Vesikel rekonstituiert und als Puffer diente 137 mM Natriumphosphat-Puffer, 20 mM NaCl und 0,01% EDTA (Lipid-Konzentrationen variieren zwischen 1-10 mg/ml, und Protein-Konzentrationen zwischen 0,3 bis 1 mg/ml), zum Schluss wurde 300 µl Probe in eine Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke (Hellma) eingegeben und gemessen.

5. Ergebnisse

5.1 Funktionelle Tests an MscL-Deletionsmutanten

Herstellung der MscL-Deletionsmutanten in der Periplasmatischen Loop-Region

Um die Rolle der Loop-Region für die Kanal-Funktion zu untersuchen, wurden MscL-Deletionsmutanten der periplasmatischen Loop-Region hergestellt. Diese wurden so entworfen, dass sie die in der Loop Region postulierten Helices im geschlossenen (AS 48-58) oder offenen (AS 44-54, 59-69) Zustand des Kanals entweder beinhalteten oder diese Segmente fehlten. In acht MscL-Deletionsmutanten wurde die Länge und Sequenz des Loops systematisch variiert. Als Negativkontrolle diente eine Mutante ohne periplasmatische Loop-Region, während WT-MscL als Positivkontrolle benutzt wurde (Abb. 5.1.1). Die Mutanten sollten mittels CD-Spektroskopie hinsichtlich der strukturellen Veränderungen im Vergleich zum WT-MscL im offenen und geschlossenen Zustand des Kanals untersucht werden.

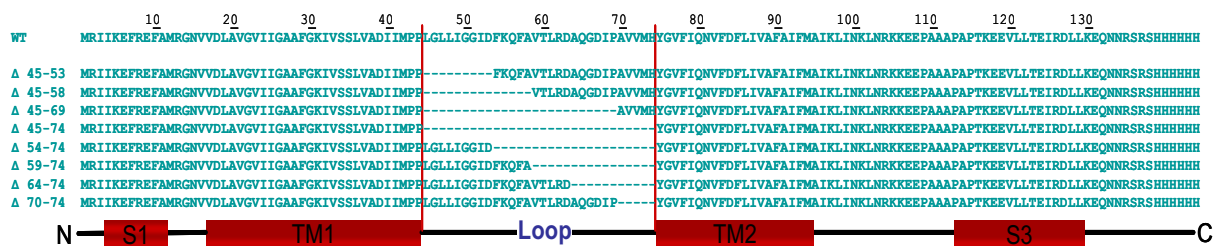


Abb.5.1.1 Deletionen in der periplasmatischen Loop Region des MscL-Mutanten.

Das für die Herstellung der Mutanten benutzte Gen des Wildtyp-MscLs wurde freundlicherweise von Professor Boris Martinac zur Verfügung gestellt. Das Gen war in einem Standard-Expressionsvektor pQE70 einkloniert, welches für einen C-terminalen 6-His-tag codiert. Dieser Vektor diente während der PCR-Mutagenese als Matrize. Mit Hilfe des „Phusion Site-Directed Mutagenesis“ Kit (Finnzymes) konnte der gewünschte Teil der periplasmatischen Loop-Region ausgeschnitten werden

(Abschnitt 4.1). Während des PCR-Vorgangs wurden phosphorylierte Primer (kommerziell erworben bei der Firma MWG Eurofins) benutzt, welche einen direkten Ligationsschritt nach der PCR ermöglichten. Dieses Verfahren war zeiteffizient, aber es war zu beachten, dass die Modifizierung der Primär zu einer erhöhten Annealingtemperatur führten (Abb. 5.1.2).

Die hergestellten Konstrukte wurden nach erfolgreicher PCR-Mutagenese auf die Richtigkeit der Sequenz überprüft, wobei die erwarteten Deletionen in der Loop-Region bestätigt werden konnten.

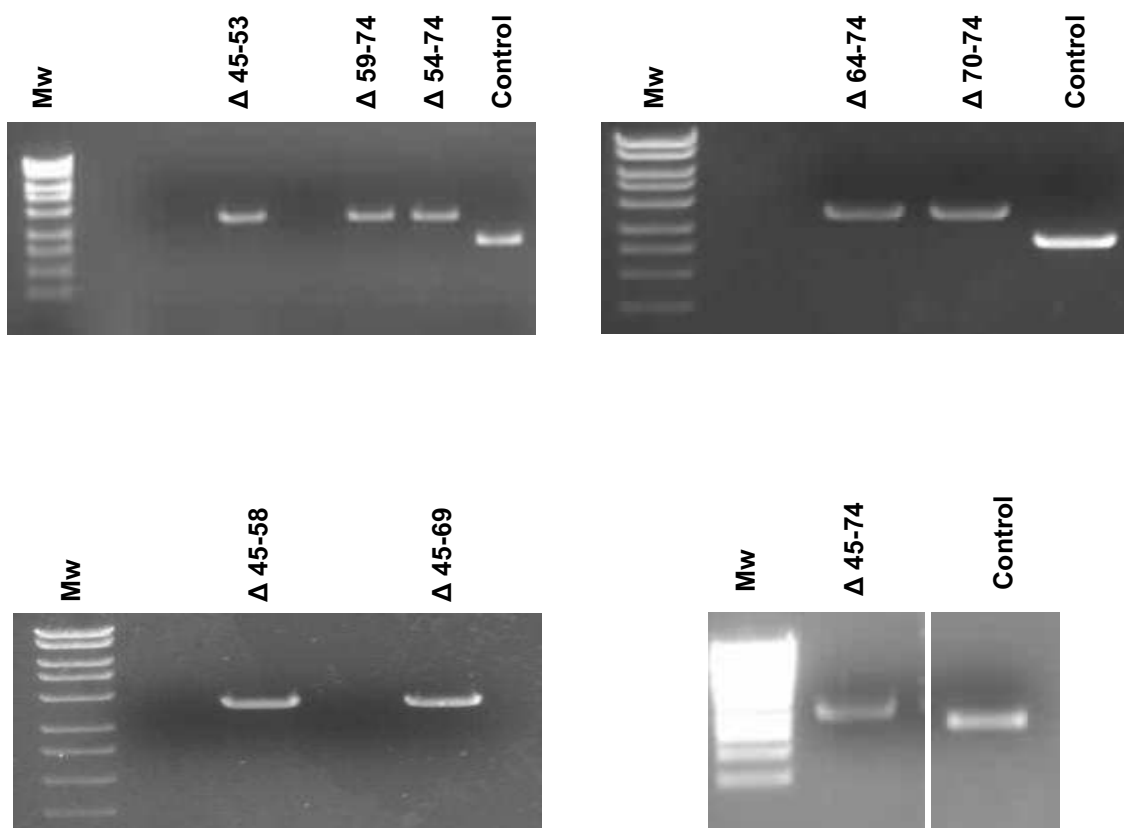


Abb. 5.1.2 PCR-Produkte der MscL-Deletionsmutanten nach der Mutagenese. Alle acht Konstrukte wurden erfolgreich hergestellt.

Expression und Aufreinigung der MscL-Deletionsmutanten

Die hergestellten Konstrukte wurden in *E.coli* M15 [pREP4] Zellen transformiert und die Proteinexpression erfolgte in LB Medium durch Zugabe von 1M IPTG in der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} \approx 0,5$). Es wurde in dieser Periode keine Einschränkung des Wachstums festgestellt, aber die Mutanten wiesen leicht unterschiedliche Expressionsraten auf. Pro Liter Expressionsmedium wurde durchschnittlich ca. 10-12 g Zellmasse (Nassgewicht) gewonnen.

Alle Proteine wurden unter nativen Bedingungen aufgereinigt, wodurch der Oligomerezustand der Proteine gewährleistet werden konnte. Für die Aufreinigungsschritte wurde 1% Triton X-100, ein nichtionisches Detergenz benutzt, welches sich als bestgeeignetes Detergenz für WT-MscL erwies. Die solubilisierten MscL-Proteine wurden mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt. Überschüssiger Salzgehalt der Proben konnte mittels einer Gelfiltrationssäule PD-25 (Amersham) entfernt und gleichzeitig gegen den gewünschten Puffer für die weiteren Untersuchungen ausgetauscht werden.

Nach erfolgreicher Expression und Aufreinigung aller Deletionsmutanten konnte die Richtigkeit der Proteinmasse mittels Immunodetektion und Massenspektrometrie bestätigt werden (Abb.5.1.3. und Tabelle 5.1.1).

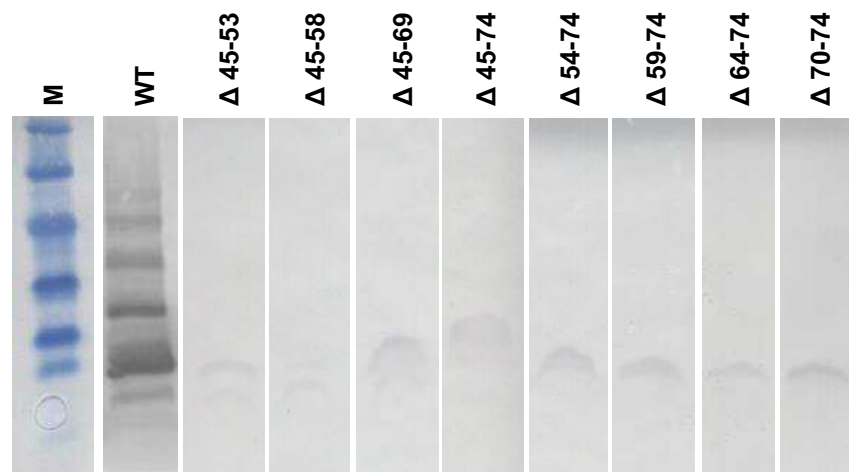


Abb. 5.1.3 a.) Immunologischer Nachweis der WT-MscL und Deletionsmutanten der Loop Region. Die molekularen Massen der Proteine im Vergleich zum Marker ist relativ, da die Proteine wegen hydrophobe Anteile anders als erwartet laufen. Die unteren Banden des WT-MscL und der mit Position 45 beginnenden Deletionen Mutanten entsprechen abgebauten Proteinen.

Mutant-MscL	Theoretical Mw (kDa)	Experimental Mw (kDa)
WT	16,1	16,1
Δ 45-53	15,2	15,2
Δ 45-69	13,5	13,5
Δ 45-74	12,9	12,9
Δ 54-74	13,8	13,8
Δ 59-74	14,4	14,4
Δ 64-74	15,0	15,0
Δ 70-74	15,6	14,6*

Tabelle 5.1.1 Proteinmassenbestimmung mittels MALDI-TOF. Die experimentellen Massen aller Proteine stimmen mit den theoretischen Werten überein. *- Eine Ausnahme ist das Δ70-74 Konstrukt, welches sich während der MALDI-TOF Messung als ein instabiles Protein herausstellte

Nachdem die Richtigkeit der hergestellten Proteine ermittelt werden konnte, wurden alle MscL-Proteinkonstrukte zu unserem Kooperationspartner Professor Boris Martinac geschickt, welcher sich freundlicherweise bereit erklärte die Funktionalität der Konstrukte mittels Patch-Clamp- zu untersuchen.

Funktionalitäts-Tests an MscL-Deletionsmutanten

Um festzustellen, ob eine Deletion in der Loop-Region einen Einfluss auf die Kanal-Aktivität hat, wurden alle rekombinant hergestellten MscL-Mutanten mittels Patch-Clamp untersucht.

Die Patch-Clamp-Technik ist eine elektrophysiologische Methode, mit der Ionenkanäle untersucht werden können. Sie gibt Auskunft über deren Leitfähigkeit

und Kinetik, außerdem können damit neue Klassen von Ionenkanälen detektiert werden.

Alle MscL-Proteine wurden rekombinant in Karlsruhe hergestellt und für das Patch-Clamp-Experiment bereitgestellt. Für die Untersuchungen wurden die Proteine in Azolectin-Liposomen in unterschiedlichen Protein-zu-Lipid-Verhältnissen rekonstituiert (Abb. 5.1.4).

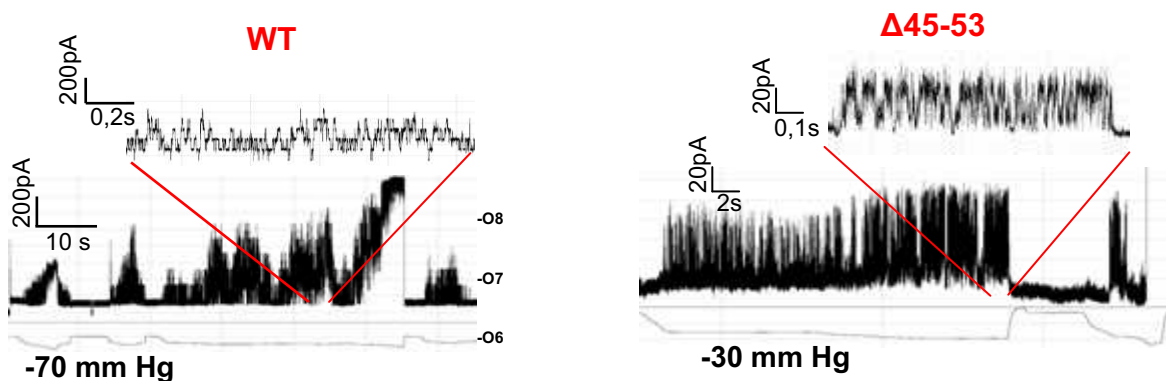


Abb. 5.1.4 Die Aktivität des WT-MscL Kanals wurde mittels Patch-Clamp beobachtet. Eine schrittweise Erhöhung der Leitfähigkeit wenn Saug-Druck auf die Pipette angelegt wurde, zeigt die Öffnung der MscL-Pore. (a.) WT-MscL wird bei -70 mm Hg Saug-Druck aktiviert und zeigt eine stabile Kinetik (b.) $\Delta 45-53$ reagiert sensibler auf den Saug-Druck und weist eine schnellere Kinetik auf.

Kanal-Aktivität wurde nur für WT-MscL und lediglich eine der Deletionsmutanten ($\Delta 45-53$) beobachtet, trotz des Versuchs zweier Protein-zu-Lipid-Verhältnisse und drei verschiedener Rekonstitutionsprotokolle (Tabelle 5.1.2).

Konstrukt	Protein: Lipid	Anzahl der Patches	Anzahl der aktiven Kanäle im Patch
WT	1:1000	13	8
$\Delta 45-53$	1:1000 1: 200	9 12 + 15	0 2
$\Delta 45-58$	1: 200	10	0
$\Delta 45-69$	1:1000 1: 200	7 10	0 0
$\Delta 45-74$	1:1000	12	0
$\Delta 54-74$	1:1000 1: 200	12 10	0 0

Δ 59-74	1:1000	13+17	0
	1: 200	9	0
Δ 64-74	1:1000	22+10	0
	1: 200	10	0
Δ 70-74	1:1000	18+12	0
	1: 200	11	0

Tabelle 5.1.2 Kanalaktivität wurde nur für Wildtyp MscL beobachtet. Nur der Kanal einer der Deletionsmutanten (Δ 45-53) zeigte Leitfähigkeit, obwohl zwei Protein-zu-Lipid-Verhältnisse und drei verschiedene Protokolle für die Rekonstitution versucht wurden.

5.2 Analyse der Sekundärstrukturunterschiede des MscL-Kanals

Die Sekundärstrukturanalyse des MscL-Proteins wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht. Als erstes wurden die CD-Spektren des Proteins in Detergens Mizellen aufgenommen um die Sekundärstrukturintegrität des aufgereinigten Proteins sicherzustellen. Dabei wurde ein anionisches Detergens mit 12 C-Atomen in der Kohlenwasserstoffkette (SDS) und zwei Lyso-Lipide mit 16 C-Atomen in der Kohlenwasserstoffkette als Detergens verwendet, wobei die Letzteren sich durch die Ladung unterscheiden (LPPC als zwitterionisches, LPPG als anionisches Detergens). Alle aufgenommenen CD-Spektren zeigen die für die α -helikale Struktur charakteristischen ausgeprägten Banden (Anhang/Abb. 9.1) (Kelly S. M. et al., 2005).

Um festzustellen, ob die Lipid-Zusammensetzung der Membranmodelle, die für die NMR-Untersuchungen verwendet wurden, einen Einfluss auf die Rekonstitution des Proteins hatte, wurde sowohl eine systematische Analyse der Kohlenwasserstoffkettenlänge, als auch des Sättigungsgrads und Ladung der Lipide durchgeführt (Anhang/Tab.: 9.1). Das WT-MscL Protein wurde in DMPC:DMPG-, DPPC:DPPG-, DOPC:DOPG- und POPC:POPG Lipid-Vesikeln rekonstituiert und CD-Spektren aufgenommen. Hierbei variieren die Anteile der negativen Ladung in der Zusammensetzung der jeweiligen Lipid-Vesikel folgendermaßen: PC:PG= 1:0; 3:1; 1:1; 1:3; 0:1.

Generell zeigen die in Lipid-Vesikeln aufgenommenen CD-Spektren die für eine α -helikale Struktur charakteristischen Banden, wobei in Abhängigkeit des Anteils der negativen Ladung und des Sättigungsgrads der Lipide eine allgemeine

Intensitätsvariation beobachtet wurde, im Gegensatz zu den CD-Spektren, die in Detergenz-Mizellen aufgenommen wurden. Der Intensitätsverlust in Zusammenhang mit der Ladung und des Sättigungsgrads ist bei ca. 208 nm bei fast allen Lipid-Zusammensetzungen eindeutig erkennbar.

Die CD-Spektren in Lipid-Vesikeln mit gesättigten Lipiden zeigen stärkere Intensitätsverluste bei 208 nm (Abb. 5.2.1 (a.) und (b.)) als in langkettigen und ungesättigten Lipid-Vesikeln (Abb. 5.2.1 (c.) und (d.)). Da in allen Proben gleiche Proteinmengen mit gleichem Protein-zu-Lipid Verhältnis verwendet wurden, kann die Intensitätsabschwächung nicht an einem geringeren Proteinanteil liegen. Dies deutet

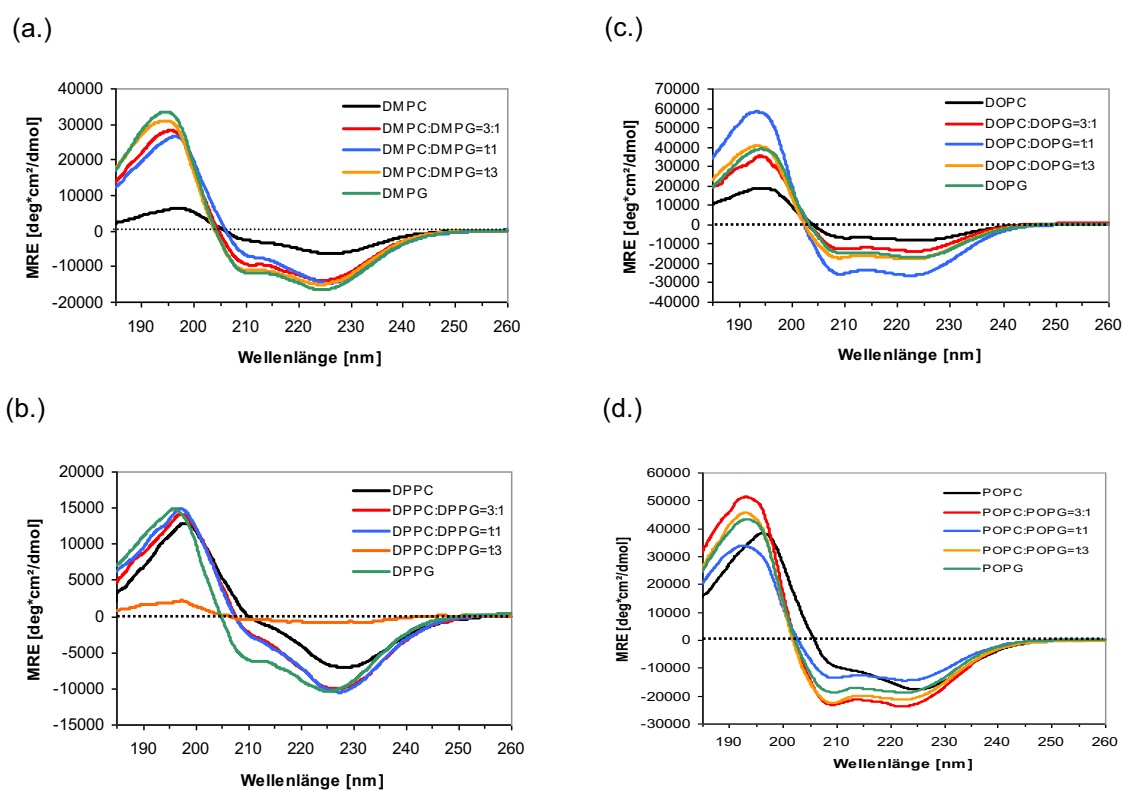


Abb. 5.2.1 CD-Spektren des WT-MscL Proteins unter Variationen Kettenlänge, Sättigungsgrad und negativer Ladung. (a.) WT-MscL in kurz-kettigen und gesättigten Lipid-Vesikeln unter Variation des negativen Ladungsanteils. (b.) WT-MscL in langkettigen und gesättigten Lipid-Vesikeln unter Variation des negativen Ladungsanteils. (c.) WT-MscL in langkettigen und ungesättigten Lipid-Vesikeln unter Variation des negativen Ladungsanteils. (d.) WT-MscL in langkettigen und gemischt-ungesättigten Lipid-Vesikeln unter Variation des negativen Ladungsanteils.

eine räumliche Nähe der MscL-Proteine an, welcher als „absorption flattening“- Effekt in den CD-Spektren zu sehen ist. Dieses Phänomen ist ausgeprägt bei den zwitterionischen Lipid-Vesikeln und nimmt in Gegenwart von negativen Lipiden ab,

unabhängig von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad (Anhang/Abb 9.2 und Abb. 9.3).

Die Spektren zeigen keine signifikanten Unterschiede bei der Variation der Kohlenwasserstoffkettenlänge unterschiedlicher Lipidmischungen. Dagegen zeigen die CD-Spektren der Proteine in langkettigen und ungesättigten Lipid-Vesikeln eine höhere Intensität (Abb. 5.2.1).

Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Rekonstitution des MscL-Kanals in Membranmodellen

Orientierte Zirkulardichroismus (*engl.* oriented circular dichroism, OCD) liefert Information über die räumliche Anordnung helikaler Peptide und Proteine in orientierten Lipid-Membranen. Das Prinzip dieser Methode basiert sich auf dem Zirkulardichroismus Phänomen, wobei Ausgenutzt wird, dass die Übergangsdipolmomente eines Peptids bzw. Proteins parallel oder senkrecht zur Helix-Achse ausgerichtet sind. Dadurch wird ein orientierungsabhängiges OCD-Spektrum erzeugt. Liegt eine Helix parallel zu der Lipid-Doppelschicht, wird ein OCD-Spektrum eines Proteins einen maximal negativen Wert bei 207 nm zeigen. Mit zunehmender Neigung der Helix in die Membran wird dieser Wert zur positiven Seite verschoben und das Signal kann als ein Indikator für die Orientierung benutzt werden.

Die Berechnung des Neigungswinkels der Helices für die oligomere Proteine ist nicht möglich, weil die unterschiedlichen Schräglagen der verschiedenen Helices nur als Summe im Spektrum zu sehen sind. Daher wurde in dieser Arbeit die OCD-Spektroskopie nur zur Überprüfung des Rekonstitutions-Erfolges des MscL-Proteins benutzt, welches eine Voraussetzung für die Festkörper-NMR-Untersuchungen ist.

Um den Einfluss der Kettenlänge und negativer Ladung der Lipide auf die Rekonstitutions Verhalten des MscL-Proteins zu untersuchen, wurde WT-MscL in verschiedenen orientierten Membranmodellen mittels OCD-Spektroskopie untersucht. Hierfür wurden DMPC:DMPG (di-C14:0) als kurzkettenige und POPC:POPG (C16:0/C18:1) als langkettigen Lipid-Mischungen verwendet.

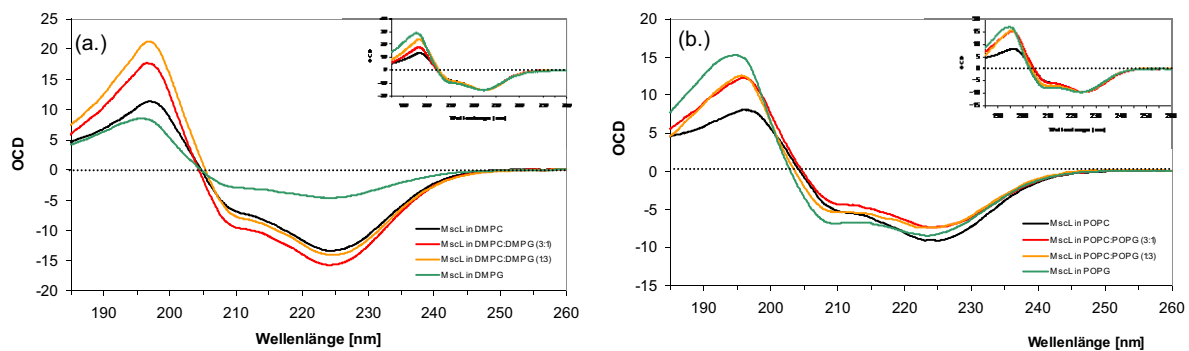


Abb. 5.2.2 OCD-Spektren des MscL-Proteins in orientierten Membranmodellen (a.) OCD-Spektren von WT-MscL in kurzketten Lipidmembranen mit unterschiedlichen negativen Ladungsanteilen (DMPC:DMPG) (b.) OCD-Spektren von WT-MscL in langkettigen Lipidmembranen mit unterschiedlichen negativen Ladungsanteilen (POPC:POPG). Zum besseren Vergleich wurden die Spektren bei 225 nm normiert.

Der Vergleich der aufgenommenen OCD-Spektren zeigt eine starke Abhängigkeit der Orientierung von den negativen Ladungsanteilen in der Lipidzusammensetzung. Die Kurven im Bereich zwischen 210 nm bis 260 nm verlaufen ähnlich für alle Proben, wobei im Bereich unter 200 nm trotz gleicher Proteinmenge bei einer Veränderung des Anteils der negativen Ladung eine Intensitätsabnahme beobachtet wurde. Dieser Effekt ist deutlich bei den normierten OCD-Spektren, sowohl für die kurzketten als auch für die langkettigen Lipid-Zusammensetzungen, zu beobachten. Allerdings verlaufen die Spektren, die in langkettigen Lipiddoppelschichten aufgenommen wurden ähnlich mit Ausnahme der zwitterionischen Lipiden (Abb. 5.2.2 (b)).

Die aufgenommenen OCD-Spektren zeigen, dass das MscL-Protein für eine bessere Rekonstitution in die Membran negative Ladung und langkettige Lipide braucht.

5.3 Isotopenmarkierung der Proteine für NMR-Untersuchungen

Die Strukturaufklärung von Membranproteinen ist eine Herausforderung, da sie in wässriger Umgebung unlöslich sind und zu Aggregation neigen. Ebenfalls ist es schwierig, Kristalle von Membranproteinen für Untersuchungen mittels Röntgenkristallographie, eine gebräuchliche Methode der Strukturaufklärung, zu züchten. Eine konzeptionell vielversprechende Möglichkeit für die Strukturaufklärung von Membranproteinen ist die Kernresonanzspektroskopie (*engl.* nuclear magnetic

resonance - NMR). Durch diese Methode können Membranproteine unter physiologische Bedingungen und in ihrer natürlichen Membranumgebung untersucht werden. Diese Eigenschaft gibt dieser Methode eine große biologische Relevanz, da die Proteine mehr ihrem biologischen Zustand entsprechen. Außerdem kann man die Beweglichkeit der Moleküle, Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Wechselwirkungen untersuchen. Öfters erschwert die Komplexität der NMR-Spektren die Untersuchung großer Proteine. Selektive Markierung der Proben ermöglicht dann einen Teil der gesamten Information herauszufiltern, wodurch die Untersuchung von größeren Proteinen erleichtert wird.

Die NMR-Spektroskopie basiert auf der Wechselwirkung zwischen einem magnetisch aktiven Kern und einem angelegten magnetischen Feld (siehe Abschnitt 5.4). Magnetisch aktiv sind Kerne mit einem Kernspin mit Spinquantenzahl $I > 1/2$. Die Hauptbausteine organischer Moleküle, wie Kohlenstoff (^{12}C), Stickstoff (^{14}N) und Sauerstoff (^{16}O), besitzen einen Kernspin $I=0$ oder 1, d.h. sie sind entweder nicht magnetisch aktiv oder besitzen eine Quadrupolwechselwirkung, die NMR-Untersuchungen unpraktikabel macht. Daher sind diese Elemente NMR-spektroskopisch nicht oder nur schwer nachweisbar. Deshalb werden andere Isotope dieser Elemente, ^{13}C , ^{15}N und ^{17}O , für NMR-Untersuchungen benutzt. Da diese Isotope in der Natur nicht häufig vorkommen, werden sie in die Moleküle gezielt eingebracht. Nur das Wasserstoff-Isotop ^1H , das häufigste Element in Proteinen, besitzt Kernspin $I = 1/2$, und damit einen magnetisch empfindlichen Kern. Es besitzt die höchste Empfindlichkeit aller in organischen Molekülen vorkommenden Isotope. Bezogen auf seine Empfindlichkeit sind die anderen, in biologischen Molekülen einsetzbare Isotope um ca. 10^2 - 10^3 weniger empfindlich als ^1H . Daher unterscheidet man zwischen „empfindlichen Kernen“ (^1H , ^{19}F , ^{31}P) und „unempfindlichen“ Kernen (^{13}C , ^{15}N , ^{17}O). Die Kerne außer ^1H werden auch als Heterokerne bezeichnet. Trotz ihrer hohen Empfindlichkeit können Wasserstoff-Atome in der NMR-Spektroskopie ungeeignet sein. Wegen der natürlichen Häufigkeit von nahe 100% entsteht in der Festkörper-NMR ein Netzwerk aus ^1H - ^1H Dipol-Dipol-Kopplungen, was zu einer starken Linienverbreiterung führt. In großen Proteinen kann auch in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie in Lösung die große Anzahl von ^1H NMR-Signalen eine Auflösung und Zuordnung vereiteln. Das wiederum erschwert die Strukturuntersuchungen von Proteinen mittels Festkörper- ^1H -NMR, oder von größeren Molekülen, weshalb hier die Isotope ^{13}C und ^{15}N statt oder zusätzlich zu ^1H

verwendet werden. Diese Kerne sind allerdings „unempfindlich“ und kommen nur in geringer natürlicher Häufigkeit vor, weshalb ^{13}C - und ^{15}N -NMR lange Messzeiten erfordern. Daher werden in der Flüssigkeits-NMR heteronukleare NMR-Experimente angewendet, welche es ermöglichen, unempfindliche Kerne invers, mit hoher Empfindlichkeit zu detektieren. Eine in der Flüssigkeits-NMR häufig benutzte und sehr empfindliche Methode ist das *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC) Experiment, welches auf der Übertragung der Magnetisierung von dem empfindlichen Kern ^1H auf einen unempfindlichen Kern, ^{13}C oder ^{15}N , und wieder zurück, basiert. Diese Kerne müssen hierzu über eine J-Kopplung miteinander gekoppelt sein, d.h. über eine chemische Bindung miteinander verbunden sein. Deshalb ist die NH-Gruppe in der Peptidbindung ein geeignetes Paar für die Protein Untersuchungen mittels eines ^{15}N -HSQC Experiments (Bodenhausen and Ruben 1980). Während des HSQC-Experiments wird ein zweidimensionales Spektrum aufgenommen, in dem jedes Signal einem an ein ^{15}N -Atom gebundenes Proton (H^{N}) entspricht. Daher stammen die Signale von den Amid-Gruppen der Peptidbindung, sowie von den Stickstoff-haltigen Seitenketten der Aminosäuren Asparagin, Glutamin, Arginin, Lysin, Histidin und Tryptophan.

Das HSQC-Experiment ist ein doppeltes INEPT (*engl.* Inensitive Nuclei Enhancement by Polarisation Transfer) -Experiment, in dem am Anfang ^1H -Magnetisierung auf die Heterokerne ^{15}N oder ^{13}C Kern durch einen INEPT-Schritt übertragen wird, und sich in folgenden t_1 -Zeit die Magnetisierung am Heterokern entwickelt. In dieser Zeit werden N-H-Kopplungen und chemische Verschiebungen

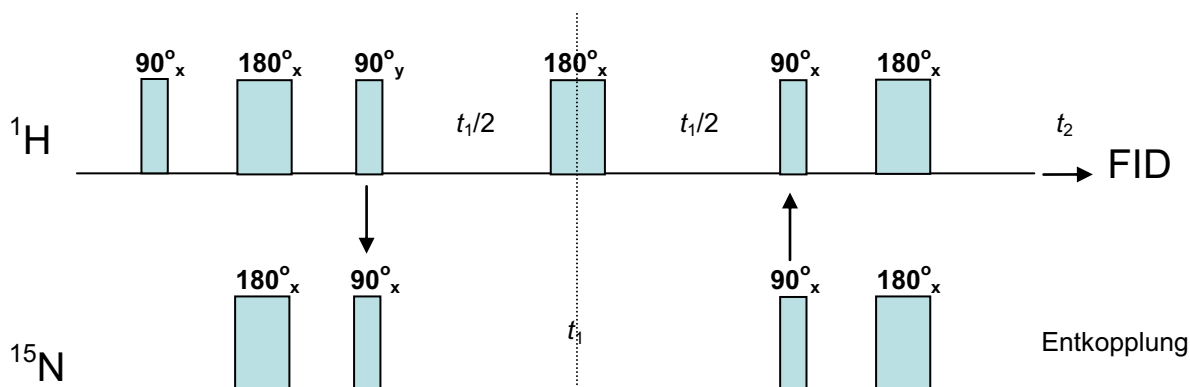


Abb. 5.3.1 Pulssequenz des HSQC-Experiments. Die Pfeile zeigen die Übertragung der Magnetisierung von einem Kern zu anderen. Während des Experiments werden in der t_1 - und t_2 -Zeit die beiden unterschiedlichen Kerne gemessen. Deshalb gibt es im 2D-Spektrum keine Diagonale, wie es bei einem homonuklearen Spektrum der Fall wäre.

durch einen 180° Puls in der Mitte der t1-Zeit unterdrückt. Durch einen inversen INEPT-Schritt wird die Magnetisierung zurück auf die Protonen übertragen. Anschließend werden die Heterokerne entkoppelt und die ^1H -Resonanzen detektiert (Abb. 5.3.1).

Im sich ergebenden HSQC-Spektrum werden zwei verschiedene chemische Verschiebungen aufgetragen: Die ^1H -chemische Verschiebung auf der x-Achse gegen die ^{15}N -chemische Verschiebung auf der y-Achse. Anhand der Signalverteilung kann abgeschätzt werden, ob die Proteine eine spezifische Sekundärstruktur eingenommen haben oder als aggregierte Proteine vorliegen. Letzteres führt zu einer Überlagerung der Signale, geringer Dispersion der chemischen Verschiebung und Linienverbreiterung.

Wegen der schnellen Messung wird das HSQC-Experimente häufig, wie auch in dieser Arbeit, für die Überprüfung der eingeführten Markierung benutzt. Die für Festkörper-NMR Experimente erforderlichen Isotopen-Markierungen wurde durch HSQC-Experimente überprüft.

Isotopen-Markierung von MscL

Für die NMR-Untersuchungen wurde voll und selektiv ^{15}N -markiertes MscL hergestellt. Protein Expression erfolgte in M9-Minimalmedium. Für die uniforme

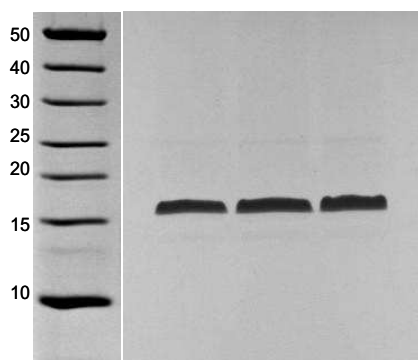


Abb. 5.3.2 12% SDS-PAGE des aufgereinigten ^{15}N -Isotopen-Markiertes MscL. Monomer Bande über die 15 kDa Marker-Bande. Die Monomer Masse des ^{15}N -Isotopen Voll-Markiertes Proteins beträgt ca. 16,3 kDa.

Markierung des Proteins wurde $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ in das Wachstumsmedium als einzige ^{15}N -Quelle zugegeben, wodurch alle Aminosäuren des Proteins ^{15}N -markiert waren.

Nach erfolgreicher Expression und Aufreinigung des ^{15}N -markierten Proteins wurde es in 0,4 % LPPG Detergenz rekonstituiert und der Probe 10% D_2O zugegeben. Die Proteinausbeute pro Liter

Kulturmedium betrug ca. 10 mg, womit kein Unterschied zur Expression von unmarkiertem Protein beobachtet wurde (Abb. 5.3.2).

Das exprimierte MscL besitzt 144 Aminosäuren (einschließlich sechs zusätzlicher C-terminaler Histidine, die als Aufreinigungs-„tag“ dienen), darunter sechs Proline, die wegen fehlender Amid-Protonen keine HSQC-Signale geben. Deshalb werden im HSQC-Spektrum 138 Signale von den Peptidbindungen des Proteins erwartet. Außerdem sollten die Seitenketten der sechs Asparagine, vier Glutamine, acht Arginine, neun Lysine und dreizehn Histidine zusätzliche 40 Signale ergeben. Die Seitenketten-Signale werden zwischen $\delta (^1\text{H}) \approx 6,4 - 7,7$ ppm bzw. $\delta (^{15}\text{N}) \approx 110 - 115$ ppm erwartet.

Im HSQC-Spektrum sind die Signale des ^{15}N -markierten Proteins zusehen (Abb. 5.3.3). Die erwarteten 178 Signale sind nicht einzeln aufgelöst, besonders in den Bereichen $\delta (^1\text{H}) \approx 7,6 - 8,4$ ppm bzw. $\delta (^{15}\text{N}) \approx 118 - 123$ ppm. Dies war zu

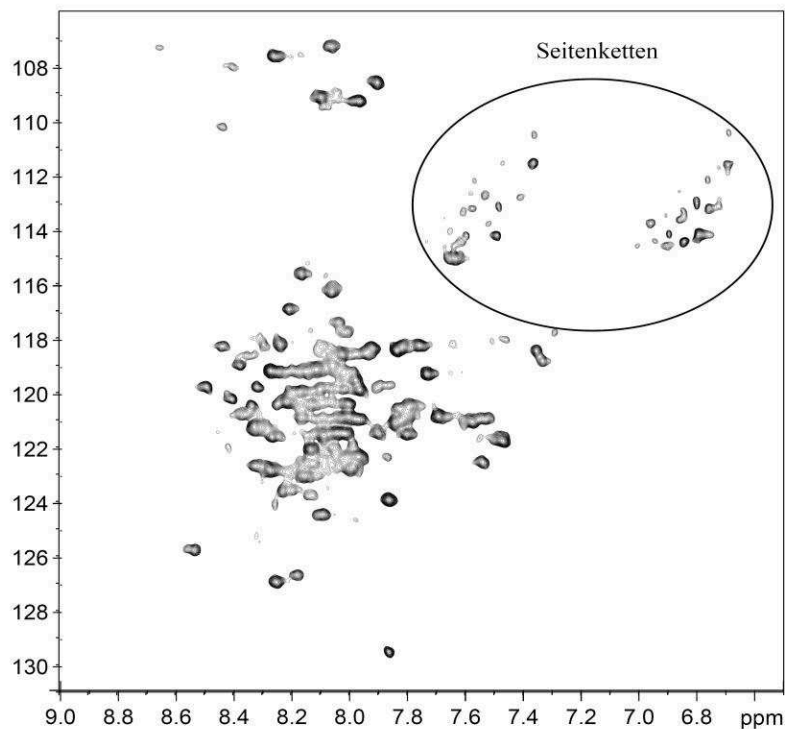


Abb. 5.3.3 HSQC-Spektrum des ^{15}N -Isotopen Voll-Markiertes MscL zeigt gut aufgelöste Signale von den Seitenketten- und evtl. Extramembranteile des Proteins.

erwarten, da MscL ein vergleichsweise großes Protein ist und die Signale gegenseitig überlappen können.

Zwar sind nicht alle Signale gut aufgelöst, dies war allerdings auch nicht das Ziel des Experiments. Es sollte die erfolgreiche Isotopen-Markierung des Proteins bestätigen, was auch gelungen ist. Es steht somit uniform ^{15}N -markiertes Protein für weitergehende Festkörper-NMR-Untersuchungen zu Verfügung.

Wegen der Größe des Proteins wurden Aminosäuren selektiv ^{15}N -markiert. Damit ist es möglich, die Zahl der NMR-Signale zu reduzieren, und aufzulösen. Für die selektive Markierung wurde der gewünschte Aminosäuretyp als ^{15}N -markierte Aminosäure und $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ als Stickstoffquelle ins Medium zugegeben. Weiterhin wurden invers markierte Proteinproben hergestellt, in welchen die gewünschte Aminosäure mit ^{14}N und NH_4Cl mit ^{15}N markiert war. Dadurch sollte die gewünschte Aminosäure im HSQC-Spektrum nicht sichtbar sein, während alle restlichen Aminosäuren ein Signal geben sollten. Überlagert sollten die HSQC-Spektren von selektiv- und invers-markiertem Protein sich gegenseitig ergänzen und das Spektrum

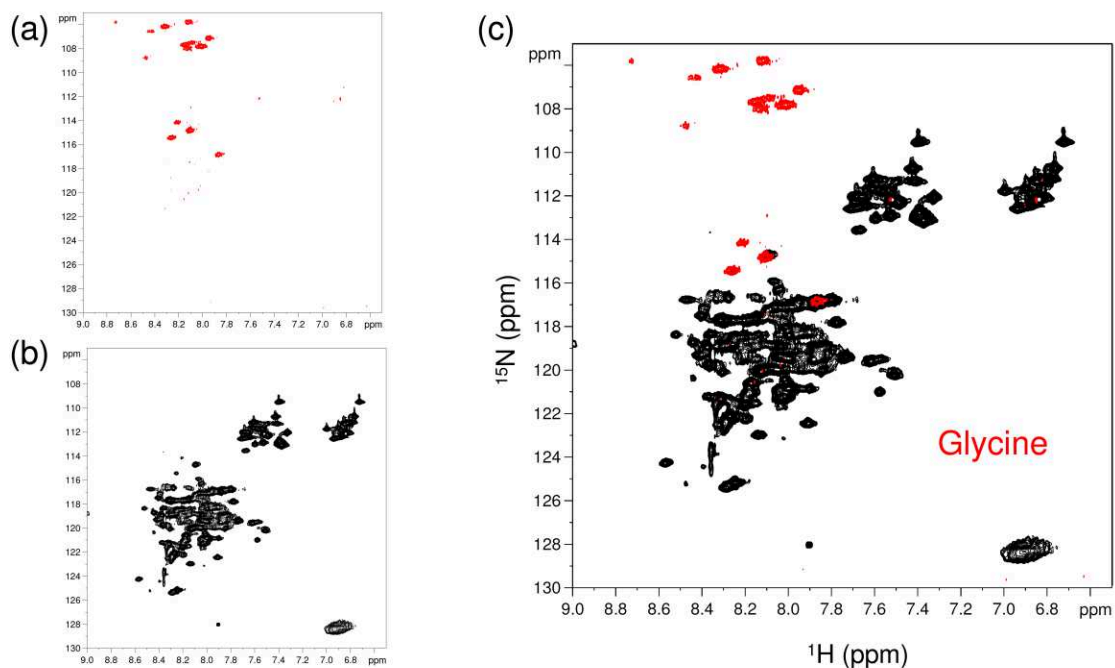


Abb. 5.3.4 Selektive und inverse Markierung der Glycine in ^{15}N -MscL. (a) ^{15}N -Glycin Isotopenmarkiertes MscL (b) inverse Markierung der Glycine: ^{14}N -Glycin in ^{15}N -Isotopen-markierten MscL (c) Überlagerte Spektren der selektiv- und invers-markierten Glycine.

des uniform ^{15}N -markierten Proteins geben. Diese Strategie wurde für Glycine, Isoleucine und Phenylalanine durchgeführt.

Es sind neun Glycine in der MscL Protein-Sequenz vorhanden, fünf in den Extramembransegmenten und vier im transmembranen Bereich des Proteins. Daher werden im HSQC-Spektrum auch neun Signale erwartet. In Abbildung 5.3.4 (a) sind 12 gut aufgelöste Signale zu erkennen, d. h. drei mehr als erwartet. Die fünf starken Signale zwischen $\delta (^1\text{H}) \approx 7,9 - 8,3$ ppm bzw. $\delta (^{15}\text{N}) \approx 106 - 108$ ppm sollten den fünf Glycinen ausserhalb der Membran entsprechen und die vier starken Signale zwischen $\delta (^1\text{H}) \approx 7,9 - 8,3$ ppm bzw. $\delta (^{15}\text{N}) \approx 114 - 117$ ppm den Glycinen der transmembranen Helices. Drei zusätzliche schwächere Signalen, die zwischen $\delta (^1\text{H}) \approx 8,5 - 8,7$ ppm bzw. $\delta (^{15}\text{N}) \approx 106 - 109$ vorkommen, sind evtl. „scrambling“ Effekte. Im *E.coli* Metabolismus kann Glycin bei Bedarf direkt in Serin oder Threonin umgewandelt werden. Es kommen in der MscL Protein-Sequenz vier Serine und drei Threonine vor. Deshalb kann angenommen werden, dass die drei zusätzlichen Signale den Threoninen entsprechen. Diese Annahme wird noch bestärkt dadurch, dass zwei Threonine in der S3-Helix und eines in der Loop-Region des Proteins

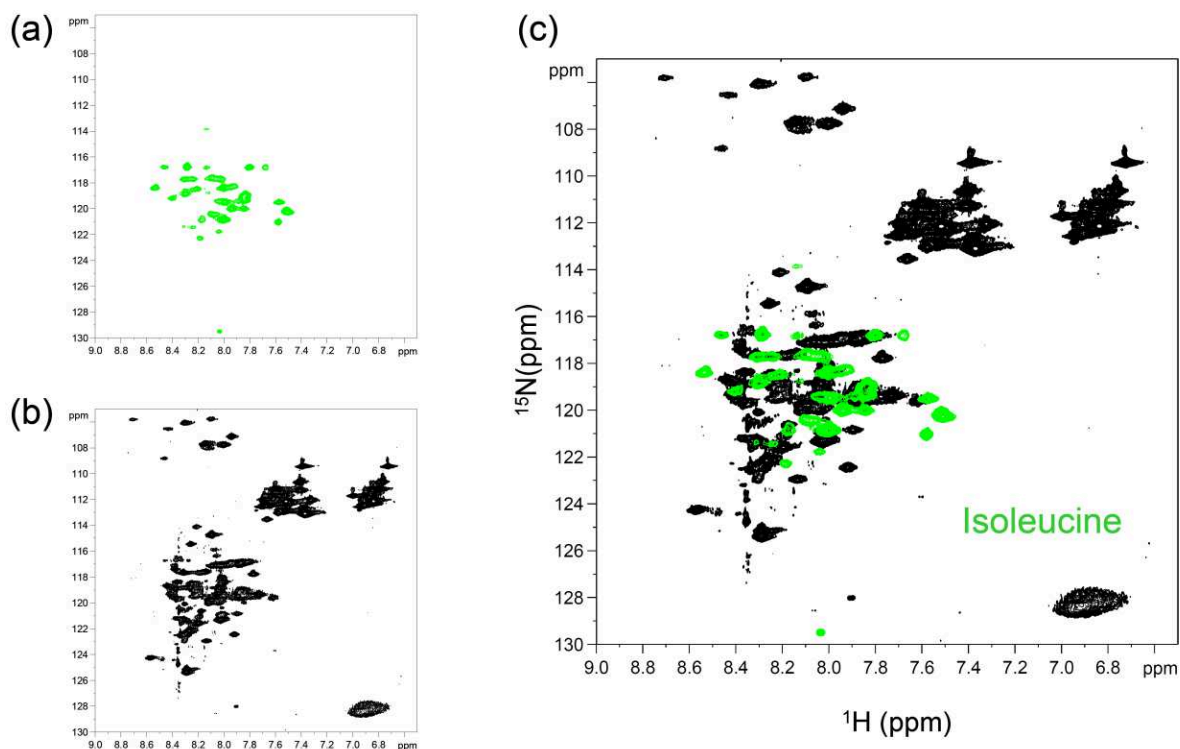


Abb. 5.3.5 Selektive und inverse Markierung der Isoleucine in ^{15}N -MscL. (a) ^{15}N -Isoleucin Isotopen-markiertes MscL (b) inverse Markierung der Isoleucine: ^{14}N -Isoleucin in ^{15}N -markierten MscL (c) Überlagerte Spektren der selektiv- und invers-markierten Isoleucine.

liegen. Sie würden eine unterschiedliche Umgebung besitzen, welches die leichte Separation eines der drei Signale von den anderen beiden erklären könnte.

Die gleiche Markierungsstrategie wie bei Glycin wurde für die Isoleucine durchgeführt. In Abbildung 5.3.5 (a) sind ca. 30 Signale für die ^{15}N -markierten Isoleucine zu sehen. Es übersteigt fast um das doppelte die Zahl der Isoleucine in der Protein-Sequenz, indem nur 16 Isoleucine vorkommen. Daraus kann man schließen, dass Isoleucin in der Biosynthese von mehreren Aminosäuren beteiligt ist und daher einen ausgeprägten „Scrambling“-Effekt hat.

Im HSQC-Spektrum der invers markierten Isoleucine (Abb. 5.3.5 (b)) sind die Signale nicht vollständig aufgelöst.

Nach dem Durchführen der selektiven und inversen Markierung der Phenylalanine konnte festgestellt, dass diese Aminosäure sehr hohe „Scrambling“-Eigenschaften hat und deshalb für selektive Markierung des Proteins nicht geeignet war (Abb 5.3.6).

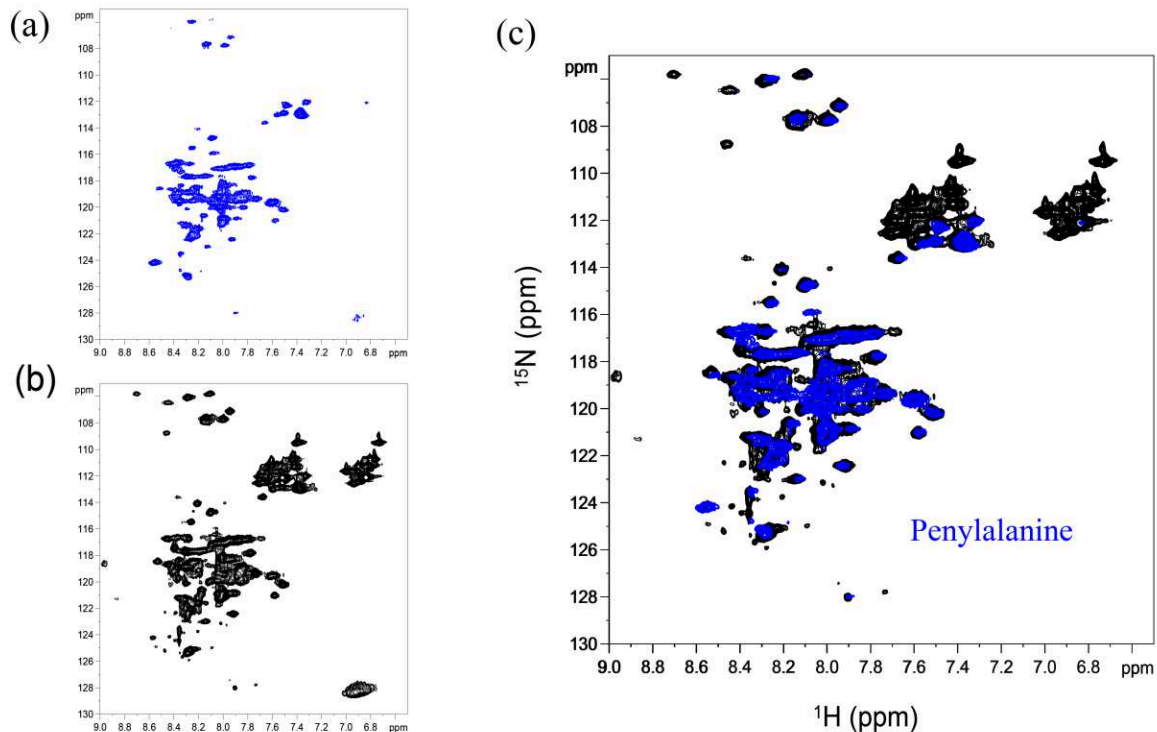


Abb. 5.3.6 Selektive und inverse Markierung der Phenylalanine in ^{15}N -MscL. (a) ^{15}N -Phenylalanin Isotopen-markiertes MscL (b) inverse Markierung der Phenylalanine: ^{14}N -Phenylalanin in ^{15}N -markieren MscL (c) Überlagerte Spektren der selektiv- und invers-markierten Phenylalanine.

Wie es in den oben beschriebenen Experimenten gezeigt wurde, ist der „Scrambling“-Effekt ein großes Problem bei der selektiven Markierung der Aminosäuren. Die Markierung zusätzlicher Aminosäuren war für die späteren Festkörper-NMR-Untersuchungen unerwünscht, weshalb nach Möglichkeiten gesucht wurde, dieses Problem zu beheben.

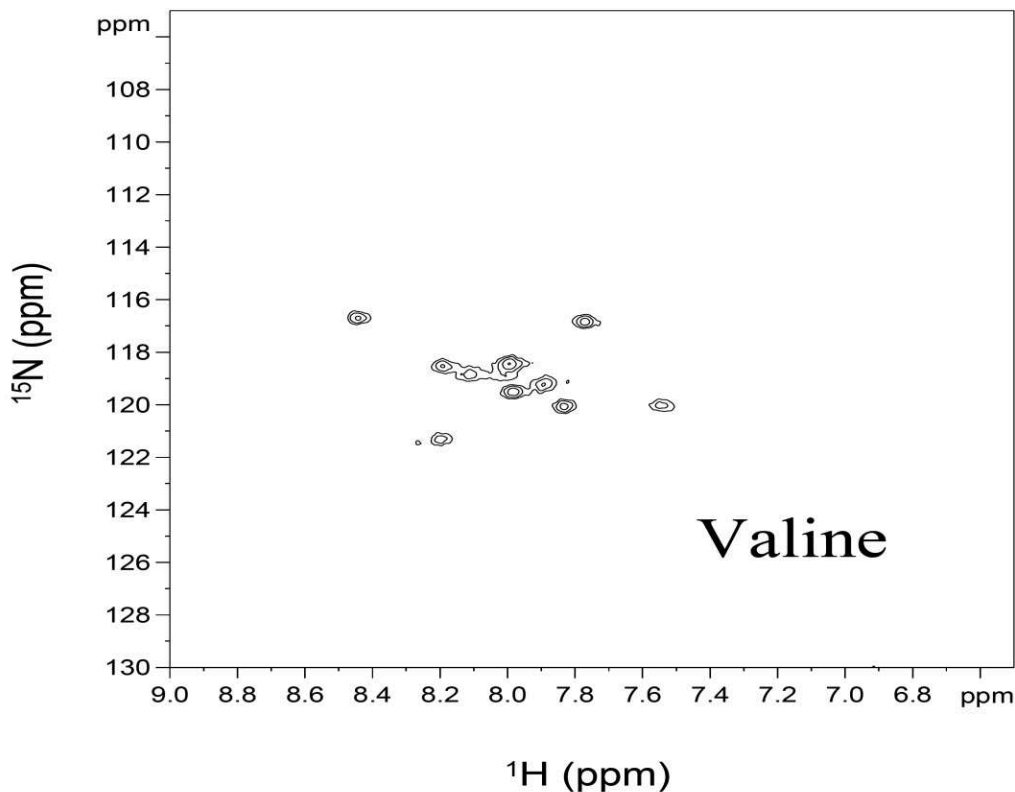


Abb. 5.3.7 HSQC-Spektrum des selektiv mit ^{15}N -Valin markierten MscL-Proteins.

In Bakterien wird eine Aminosäure in eine andere umgebaut, wenn es einen Bedarf dafür gibt. Eine zusätzliche Zugabe von unmarkierten Aminosäuren, mit Ausnahme der zu markierenden Aminosäure, ins Expressionsmedium sollte den Metabolismus der markierten Aminosäuren verhindern.

Dafür wurde ein Aminosäuren-Cocktail ins M9-Minimalmedium zugegeben, der alle Aminosäuren in ausreichender Menge enthielt, um die Umwandlung ineinander zu verhindern. Nur die gewünschte Aminosäure trug eine ^{15}N -Markierung, wohingegen alle anderen ^{14}N -markiert waren. Ein Beispiel dieser Markierungsstrategie ist in Abbildung 5.3.7 gezeigt. ^{15}N -markierte Valine wurden mit dieser Methode ins MscL-Protein eingeführt.

Im HSQC-Spektrum sind zehn gut aufgelöste Signale zu sehen, die von den ^{15}N -markierten Valinen stammen. In der Protein-Sequenz kommen 13 Valine vor und die selektive Markierungsstrategie war erfolgreich, nimmt man eine geringe Überlappung der Signale an.

Es war uns damit gelungen, selektiv-markiertes Protein für weitere NMR-Untersuchungen herzustellen.

5.4 Schräglage der Helices des MscL-Kanals in der Membran

Die Orientierung von Segmenten von Membranproteinen, wie beispielsweise Transmembranhelices, bezüglich der Membran kann mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht werden.

Wegen der ausgeprägten anisotropen Wechselwirkungen beinhaltet ein Festkörper-NMR-Spektrum im Gegensatz zu Flüssigkeits-NMR-Spektren Information über die Orientierung eines Moleküls. Zwar läßt sich mit Festkörper-NMR nicht dieselbe Auflösung erzielen wie in der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie, jedoch kann mit ihrer Hilfe die Schräglage von Proteinsegmenten in der Membran bestimmt werden. Wichtig für ein Verständnis des Öffnungsmechanismus von MscL ist die Charakterisierung der strukturellen Unterschiede im geschlossenen und offenen Zustand. Hierbei sagen Modellierungen der offenen Struktur vor allem eine Änderung der Schräglage der transmembranen Helices vorher. Deshalb sollte Festkörper-NMR als besonders geeignete Methode zur genauen Bestimmung der Schräglage der Transmembranhelices von MscL in der Membran benutzt werden.

Die für die NMR-Experimente erforderliche Isotopen-Markierungen von MscL wurde erfolgreich durchgeführt (siehe Abschnitt 5.3), wobei MscL uniform oder selektiv mit ^{15}N markiert wurde. Als Membranmodelle wurden makroskopischorientierte Lipiddoppelschichten („Glasplättchen“-Proben) und Bizellen benutzt. Die Probenorientierung erfolgt hierbei auf mechanischem („Glasplättchen“) oder magnetischem (Bizellen) Weg (Abb. 5.4.1).

„Glasplättchen“-Proben werden durch De- und Rehydratisierung der Proteinhaltigen Vesikel auf Glasplättchen hergestellt. Sie werden in zwei Orientierungen bezüglich

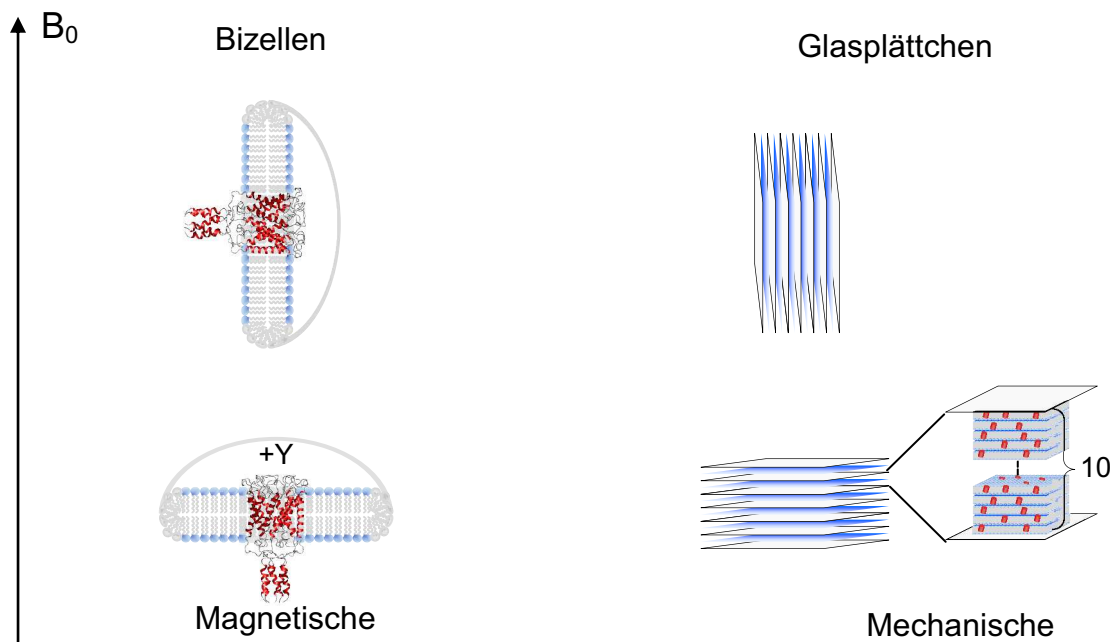


Abb. 5.4.1 Orientierte Membranmodelle für Festkörper-NMR-Experimente

des Magnetfelds gemessen, zum einen mit der Membrannormalen entlang (0° -Anordnung), zum anderen mit der Membrannormalen senkrecht zum Magnetfeld (90° -Anordnung).

Bizellen bestehen aus einer Mischung aus langkettigen Lipiden (DMPC), die eine Doppelschicht bilden, und kurzkettigen Lipiden (DHPC) oder Detergenz (z.B. CHAPSO), die die Seiten der Lipiddoppelschicht abschließen. Hierbei bilden sich scheibenförmige Membransegmente, oder perforierte Lipiddoppelschichten, die sich mit der Membrannormalen senkrecht zur Magnetfeldrichtung ausrichten. Das Verhältnis zwischen den lang- und kurzkettigen Lipiden (q) bestimmt die Größe des planaren Bereichs der Bizelle. In dieser Arbeit wurden Bizellen mit $q = 3,0 - 3,5$ und Bizellen-Proben mit einem Lipidgehalt von insgesamt 20% benutzt. Auch Bizellen lassen sich in zwei Orientierungen bezüglich des Magnetfelds messen. Durch ihre Suszeptibilität ordnen sie sich mit der Membran normal senkrecht zum Magnetfeld an. Durch Zugabe von Lanthanoidionen (z.B. Yb^{3+}) lassen sie sich mit ihrer Normalen entlang des Magnetfelds ausrichten.

Voraussetzung für Festkörper-NMR-Untersuchungen an MscL ist die Etablierung der Rekonstitution des Proteins in orientierte Membranen. Hierzu wurde in einem ersten Schritt die Präparation von mittels Glasplättchen orientierten Proben mit MscL

optimiert. Dabei wurde ^{31}P -NMR und ^{15}N -NMR verwendet, um den Orientierungsgrad der Lipide und des Proteins abzuschätzen. Hierbei entspricht ein ^{31}P -NMR-Signal bei ca. 25-30 ppm orientierten Lipiden, ein ^{31}P -Signal bei ca 12-15 ppm nicht orientierten Membranbereichen. In ^{15}N -NMR-Spektren kann der Orientierungsgrad des Proteins aus der Abweichung von einem Pulverspektrum, und den Unterschieden zwischen den Spektren verschiedener Probenorientierungen abgeschätzt werden.

In ersten Versuchen, MscL in mechanisch orientierte Membranen zu rekonstituieren, wurde ein erheblicher Einfluss von Salz auf die Lipidorientierung festgestellt. So zeigen die ^{31}P -Spektren von MscL in orientierten POPC:POPG Membranen, die aus Puffer-haltigen Vesikelsuspensionen hergestellt wurden, einen hohen Anteil nicht orientierter Lipide (Abb. 5.4.2). Um diesen Effekt zu beseitigen, wurden die Proben vor dem Aufbringen auf die Glasplättchen mit reinem H_2O gewaschen. Wie in Abbildung 5.4.2 zusehen ist, konnte die Orientierung der Lipide hierdurch deutlich verbessert werden.

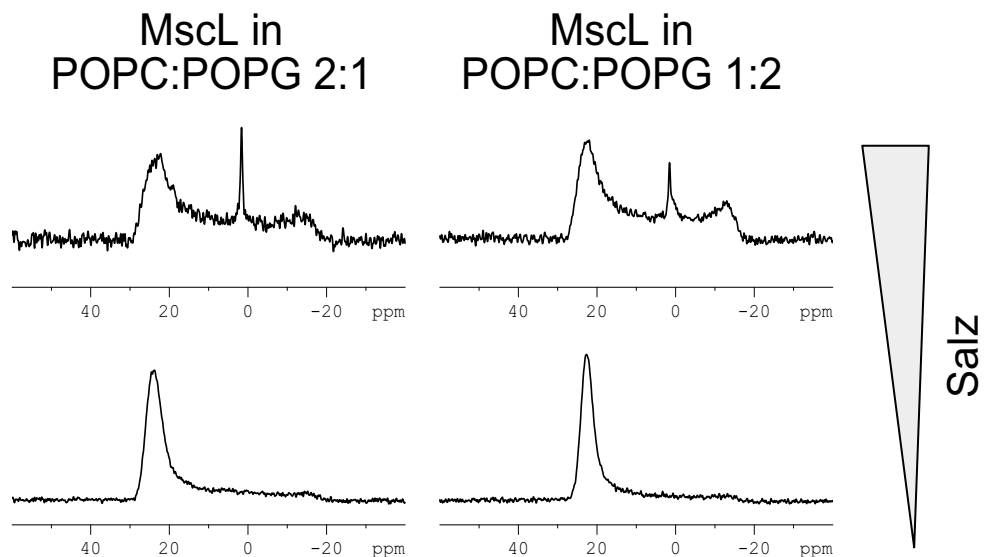


Abb. 5.4.2 Hohe Salz-Konzentration im Proben-Puffer führt zu unvollständiger Orientierung, die sich im ^{31}P -NMR-Spektrum als Intensität ausserhalb des Peaks bei ca. 25ppm äussert. Nachdem Waschen der Probe wird dieser Effekt nicht mehr beobachtet. (Das ^{31}P -NMR-Signal bei ca. 0 ppm stammt vom Phosphatpuffer).

Nachdem der unerwünschte Salz-Effekt beseitigt war, wurde der Einfluss des Proteins auf die Lipid-Orientierung getestet. Verschiedene Lipid-Zusammensetzungen wurden untersucht. In ^{31}P -NMR-Spektrum wurde ein für orientierte Lipide charakteristisches Signal beobachtet, Signale, die auf unvollständige Orientierung hindeuten, waren vernachlässigbar.

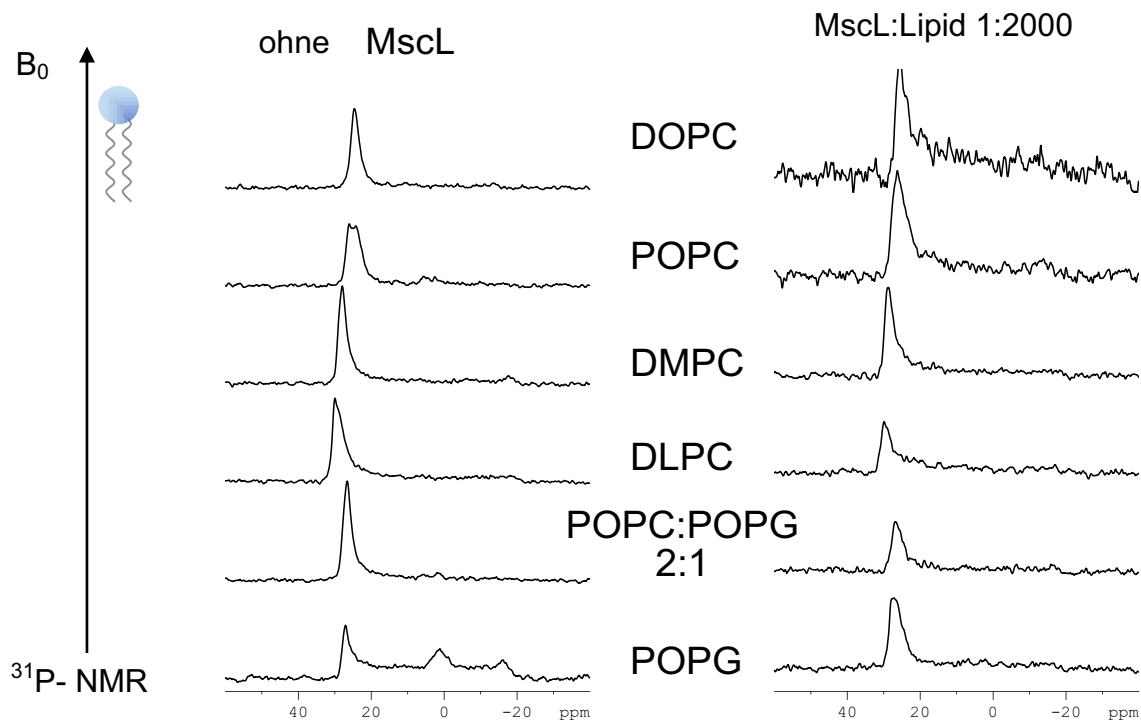


Abb. 5.4.3 ^{31}P -NMR-Spektren von orientierten Membranen verschiedener Lipidzusammensetzung. MscL-Protein zeigt keinen Einfluss auf die Orientierung der Lipide. (Substrat-unterstützte orientierte Proben).

Es wurde in diesem Experiment gezeigt, dass MscL keinen signifikanten Einfluss auf die Lipid-Orientierung hatte (Abb. 5.4.3). Somit konnte mit Untersuchungen an ^{15}N -Isotopen-markiertem Protein fortgefahren werden.

Der Tensor der ^{15}N chemischen Verschiebung ist beinahe axial-symmetrisch und sein Hauptachsensystem liegt in einer Helix etwa so, dass die δ_{33} -Achse mit der Helixachse zusammenfällt. Deshalb ist das ^{15}N -NMR Signal einer aufrecht in der Membran stehenden Transmembranhelix auf der Tieffeld-Seite des ^{15}N chemischen Verschiebungsbereichs bei ca. 200 ppm zu finden, wenn die Probe mit ihrer

Normalen parallel zu B_0 ausgerichtet ist. Wenn die Probe um 90° gedreht wird, sollte sich dieses Signals zu höherem Feld auf Werte um ca. 75 ppm verschieben. In Abbildung 5.4.4 sind die ^{15}N -NMR-Spektren von zwei Proben in unterschiedlichen Proben-Orientierungen bezüglich des B_0 -Felds zu sehen. Die Proben unterschieden sich im Sättigungsgrad der Lipide. Nach dem Drehen der Proben in die senkrechte Position waren die Maxima der Spektren nicht verschoben, und die Linienform unverändert. Keine Änderung in den Spektren deutet, dass das Protein in den Proben in allen möglichen Orientierungen vorkam. Deshalb ergaben sich nach dem Wechsel der Anordnung im Magnetfeld in der Summe keine Veränderungen in den NMR-Spektren.

Im Experiment wurde ebenfalls beobachtet, dass die beiden verwendeten zwitterionischen Lipide sich ähnlich verhielten und der Sättigungsgrad keinen Einfluss auf die Protein-Orientierung hatte.

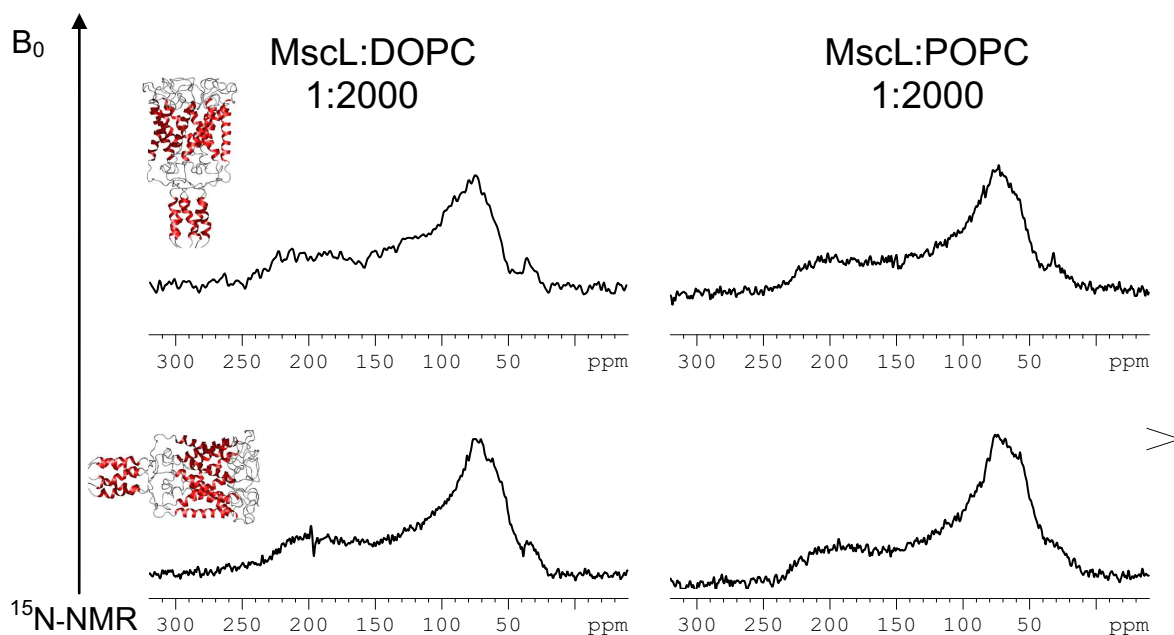


Abb. 5.4.4 ^{15}N -NMR-Spektren des MscL-Proteins rekonstituiert in orientierte zwitterionische Lipiddoppelschichten. Die Spektren zeigen eine für Pulver-Spektren charakteristische Linienform, die auf eine fehlende Orientierung des Proteins hindeutet.

Daher wurde überlegt, ob negativ geladene Lipide eine Rolle in der Protein-Orientierung spielen würden, und dadurch die Orientierung verbessern könnten.

Dafür sprach die Tatsache, dass bakterielle Membranen überwiegend einen hohen Anteil negativ geladener Lipide besitzen und daher ein Membranmodell mit negativen Ladungen die natürliche Umgebung des Proteins besser imitieren könnte. Ein zweites Argument war, dass der MscL-Kanal in *E. coli* eine hohe Zahl positiv geladener Aminosäuren in seinem cytoplasmatischen Loop-Bereich besitzt. Daher könnten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Lipid-Kopfgruppen und positiv geladenen Aminosäuren des Proteins relevant sein für eine erfolgreiche Rekonstitution. Eine solche Protein-Lipid Interaktion könnte daher helfen, die Proteinorientierung in der Membran zu verbessern.

Einen Einfluss negativ geladener Lipide auf das Verhalten des Proteins in der Membran wurde in CD-Messungen beobachtet, in welchen MscL eine ausgeprägte α -helikale Struktur in den Vesikeln zeigte, die einen gewissen Anteil negativer Ladungen enthielten. In Abbildung 5.4.5 sind die ^{15}N -NMR-Spektren zweier Proben dargestellt, in denen MscL-Proteine in eine POPC:POPG Lipid-Mischung rekonstituiert waren. Die beiden Lipid-Zusammensetzungen unterschieden sich

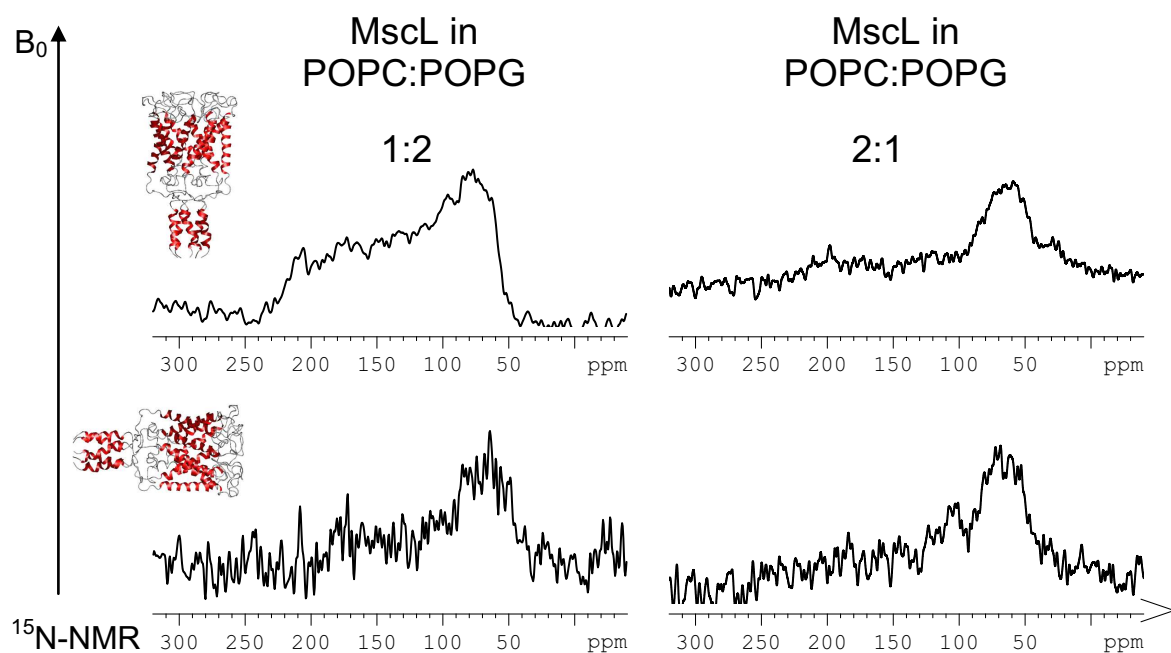


Abb. 5.4.5 ^{15}N -NMR-Spektren des MscL Proteins rekonstituiert in negativ geladenen Lipiddoppelschichten. Veränderte Spektren zeigen eine teilweise Orientierung des Proteins.

voneinander durch einen unterschiedlichen Anteil negativ geladener Lipide. Die für zwei Probenorientierungen aufgenommenen ^{15}N -NMR-Spektren zeigen einen

leichten Unterschied nach dem Orientierungswechsel der Proben. Trotz des Unterschiedes erscheint die Orientierung des Proteins heterogen, da die Linienform noch deutliche Anzeichen eines Pulverspektrums aufweist.

Nachdem sich mechanisch auf Glasplättchen orientierte Proben als ungeeignet erwiesen, um MscL zu orientieren, wurden magnetisch orientierende Bizellen als Alternative evaluiert. In dieser Arbeit wurden DMPC:DHPC und DMPC:CHAPSO Bizellen auf ihre Verwendbarkeit getestet. In Abbildung 5.4.6 sind in den ^{31}P -NMR-Spektren zwei Signale zu erkennen, die den beiden Lipidsorten zugeordnet werden können. In DMPC:CHAPSO Bizellen hingegen gibt nur das DMPC Lipid ein Signal, da CHAPSO keinen Phosphat besitzt.

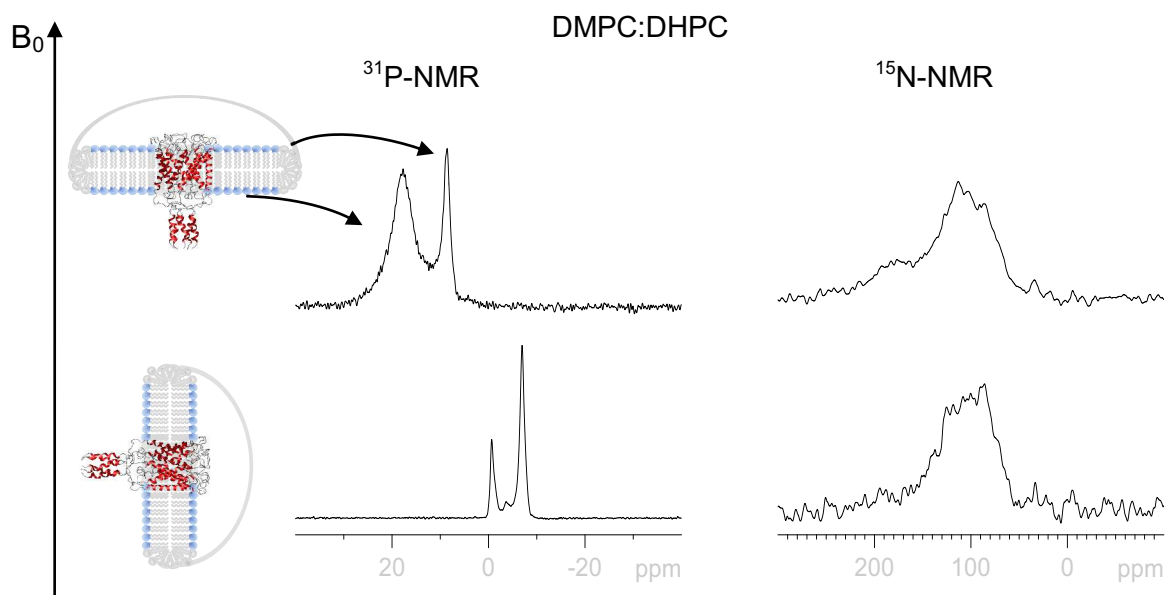


Abb. 5.4.6 ^{15}N - und ^{31}P -Spektren des MscL Proteins in DMPC:DHPC Bizellen.

Die ^{15}N -Spektren des Proteins in DMPC:DHPC Bizellen zeigten keine nennenswerte Orientierung des Proteins. Hier ergaben beide Bizellenausrichtungen im Magnetfeld nur kleine Unterschiede im ^{15}N -NMR-Spektrum, d.h. es liegt eine nahezu gleichförmige Verteilung von Proteinorientierungen vor. In den DMPC:CHAPSO Bizellen unterschieden sich die ^{15}N -NMR-Spektren nicht signifikant voneinander, so dass hier eine Vorzugsausrichtung des Proteins in der Membran nicht eindeutig vorliegt. Es wurde daher mit DMPC:CHAPSO Bizellen weitergearbeitet, welches

ausserdem eine vereinfachte Handhabung des Proteins ermöglichte. Da es, anders als DHPC, in der Lage war, MscL zu solubilisieren, konnte es durch Detergensaustausch während der Aufreinigung eingebracht werden (Abb.5.4.7).

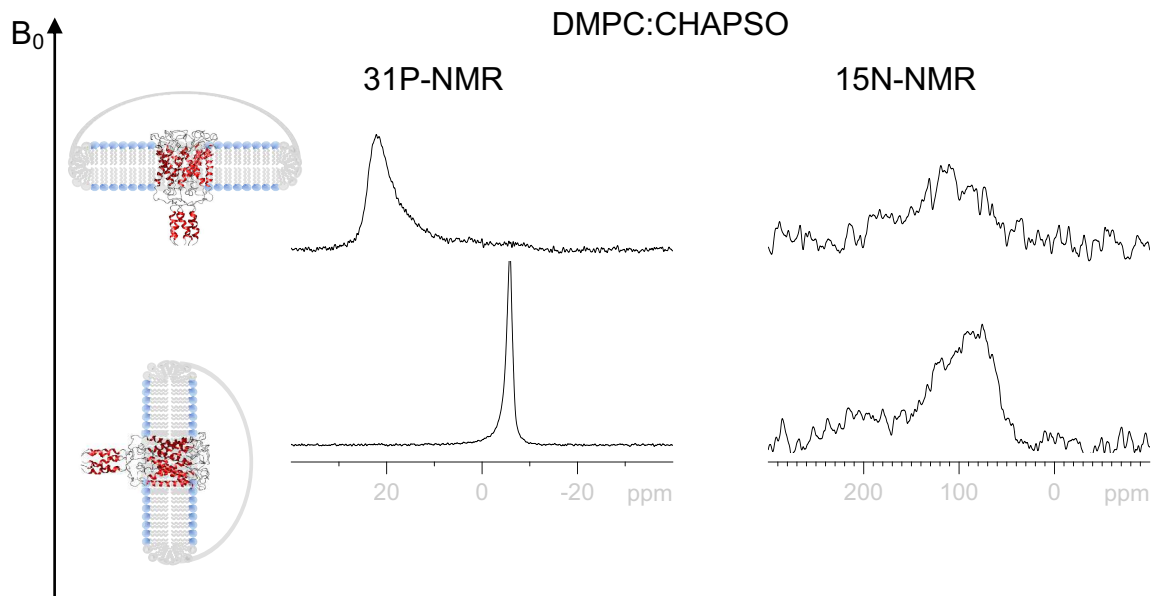


Abb. 5.4.7 ^{15}N - und ^{31}P -Spektren des MscL Proteins in DMPC:CHAPSO Bizellen.

Die Spektren des ^{15}N -Valin Isotopen-markierten Proteins zeigten vergleichsweise schmale Linien im Spektrum, welches durch die schnelle Beweglichkeit der Bizelle, und Reduktion der Markierungen in der selektiv markierten Probe verursacht wird (Abb.5.4.8).

Insgesamt erwies sich die Orientierung des MscL-Kanals, insbesondere in mechanisch orientierten Proben, als problematisch. Der höchste Orientierungsgrad wurde in Bizellen erzielt, wobei auch hier die Auflösung für eine weitergehende Strukturuntersuchung nicht ausreicht.

Der Unterschied in der Orientierbarkeit des Proteins in planaren Lipiddoppelschichten und Bizellen könnte auf eine mögliche Ursache dieser Problematik hindeuten. Möglicherweise sind Protein-Protein Wechselwirkungen und eine damit verbundenen Selbstassoziation der Grund für die Probenheterogenität. In Bizellen, in denen der planare Membranbereich deutlich kleiner ist als in den

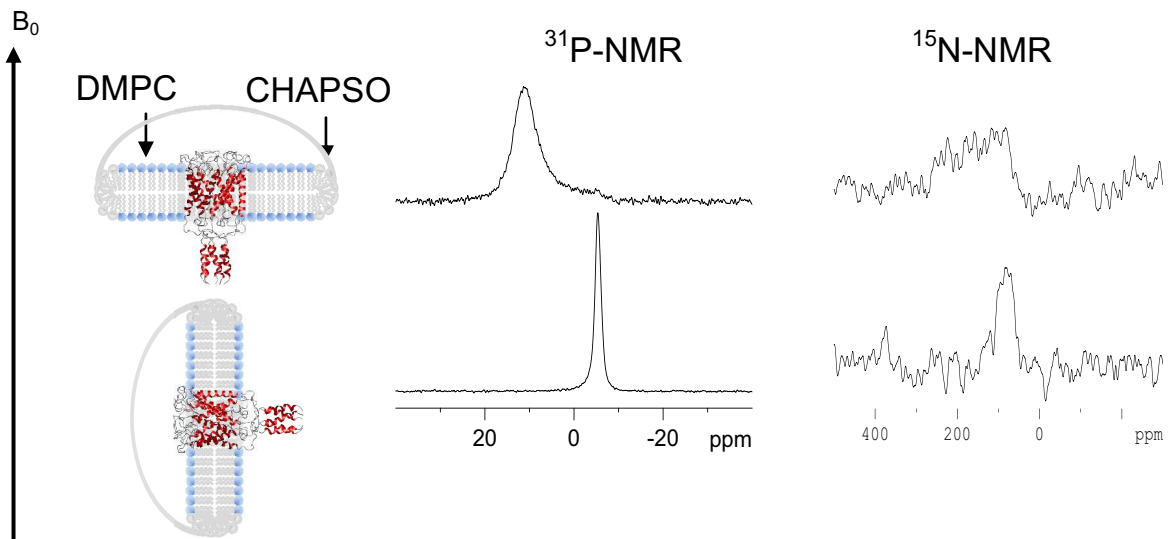


Abb. 5.4.8 ^{15}N - und ^{31}P -Spektren des selektiv Isotopen-markierten MscL Proteins in DMPC:CHAPSO Bizellen.

mechanisch orientierten Proben, könnten solche Wechselwirkungen zwischen den Proteinen reduziert sein. Da für MscL derartige Protein-Assoziationen noch nicht bekannt waren, wurde einer möglichen Bildung von Clustern aus MscL im weiteren Verlauf der Arbeit nachgegangen.

5.5 Änderung der Form und Größe des Proteinkanals beim Öffnen

Die Veränderungen in Größe und Form während der Kanalöffnung und die Proteinverteilung in den Vesikeln wurde mittels Kleinwinkel-Neutronenstreuung (*engl.* Small angle neutron scattering- SANS) untersucht.

Diese Methode basiert auf der Analyse des Streuverhaltens von Neutronen, die auf die Probe eingestrahlt werden. Neutronen interagieren hierbei hauptsächlich mit den Atomkernen des Streuobjekts, weshalb sich verschiedene Isotope hinsichtlich ihrer Streuung voneinander deutlich unterscheiden. Insbesondere die Isotope des Wasserstoffs streuen stark unterschiedlich. So ist es möglich, durch Deuterierung die Streueigenschaften von Teilen der Probe gezielt zu verändern, und den Kontrast zwischen verschiedenen Bereichen der Probe einzustellen. Besitzen Teile der Probe die gleichen Streueigenschaften, so spricht man von „contrast match“. Diese Eigenschaft hat für die Untersuchung komplexer Objekte, wie Membranproteine

große Relevanz. Z. B. kann in Untersuchungen an deuterierten Proteinen in einer protonierten Lipidmembran die Information über das Protein oder die Membran herausgefiltert werden. Hierzu passt man die Streustärke der wässrigen Phase durch Wahl einer geeigneten Mischung aus D₂O und H₂O an entweder das deuterierte Protein, oder die protonierten Lipide an, womit der jeweilige Bestandteil im Streuexperiment „unsichtbar“ wird.

Durch Interaktion mit der Probe können Neutronen ihre Energie und ihren Impuls mit der Probe austauschen, was zur ihrer Beugung führt. Wenn es dabei zu keinem Energieaustausch kommt, wird dieser Prozess als elastische Streuung bezeichnet. Der Winkel (θ) zwischen eingestrahlem und gebeugtem Impulsvektor gibt Information über die Größe des Streuobjekts (Abb. 5.5.1). Je größer das Streuobjekt ist, desto kleiner ist der Beugungswinkel θ und umgekehrt. Äquivalent zum Beugungswinkel θ wird oft der sogenannte Impulsübertrag Q betrachtet, der sich aus der Differenz von gebeugtem und eingestrahlem Impulsvektor ergibt. Aus der Intensitätsverteilung $I(Q)$ kann die Information über die Größe und Form des Streuobjekts gewonnen werden.

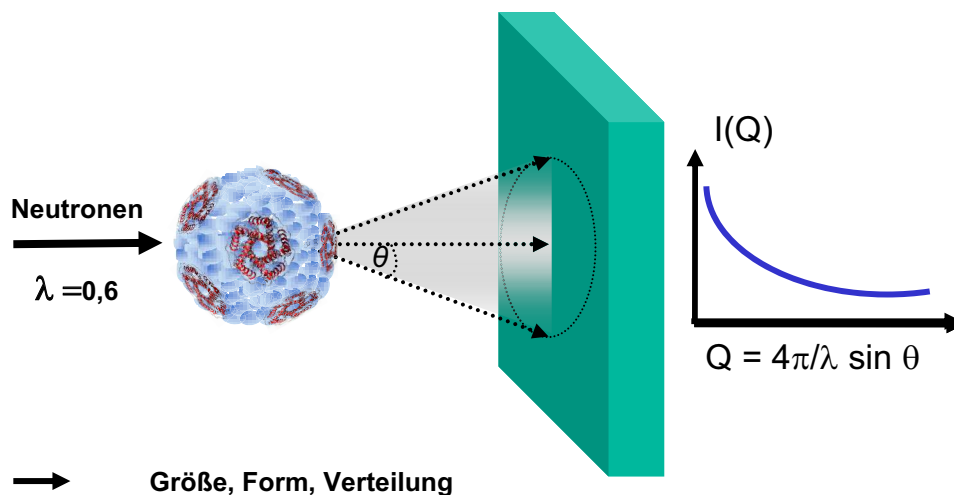


Abb. 5.5.1 Schematische Darstellung des Prinzips der Kleinwinkel-Neutronenstreuung. Man erhält Information über Intensitätsverteilung $I(Q)$, welche eine Funktion des Streuvektors Q ist. Eine schnell abfallende Kurve deutet auf große Streuobjekte.

Die SANS-Experimente wurden auf dem Hochfluss-Instrument D22 am Institut Laue Langevin, Grenoble, mit freundlicher Unterstützung von Dr. Roland May, durchgeführt.

Durch SANS-Experiment konnten Änderungen der Größe des MscL-Kanals beim Öffnen untersucht werden. Hierfür wurde deuteriertes MscL hergestellt, und in DOPC Vesikeln rekonstituiert. Das Protein zu Lipid Verhältnis wurde von 1:3000 bis zu 1:1000 (mol/mol) variiert. Die Proben-Puffer beinhalteten 13% D₂O, um den „contrast match“ mit den Lipiden zu erzielen, und so das Signal des deuterierten Proteins zu isolieren. Ein Öffnen des Kanals wurde durch Zugabe von 20% Lysophosphatidylcholin (LPC) (bezogen auf die Lipidmenge, mol/mol) ermöglicht Referenz.

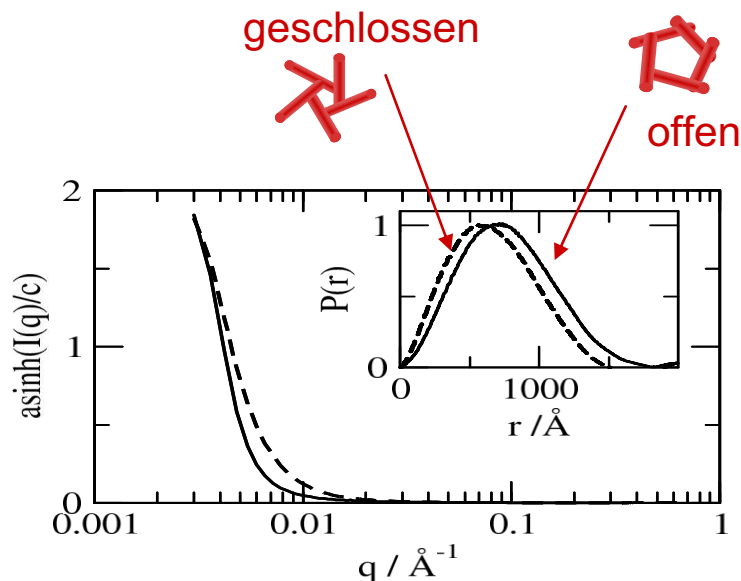


Abb. 5.5.2 Die Streukurven des geschlossenen und geöffneten Zustands des MscL-Kanals. Die Flächenänderung wird durch Verschiebung des Maximums der Abstands-Verteilung $P(r)$ von ~ 60 nm auf 75 nm beobachtet.

Im Experiment konnte eine Flächenänderung von ca. 30-50% beobachtet werden. Dieser Wert liegt etwas unterhalb der 60% Vergrößerung, die in EPR-Experimenten beobachtet wurde. Wie im Folgenden noch näher untersucht werden wird, rührt die Flächenänderung von Gesamtheit der Kanäle eines Vesikels her. Die gemessene Flächenänderung könnte somit bedeuten, dass ein Großteil, aber nicht alle Kanäle geöffnet wurden. (Abb. 5.5.2)

Allgemein fällt ein deutlich schnellerer Abfall der Streuintensität als Funktion von Q auf, als er für einen einzelnen Kanal zu erwarten wäre. Die Streukurve entspricht vielmehr einem größeren Streuobjekt als einem einzelnen Protein. Das wiederum bedeutet, dass MscL Protein-Domänen in den DOPC-Vesikeln bildet.

Um dieser Hypothese auf den Grund zu gehen, wurde der MscL Kanal auf Clusterbildung hin untersucht.

5.6 Funktionelle Cluster-Bildung von MscL

Kleinwinkel-Streuung (SANS) Experimenten deuteten auf die Bildung größerer Streuobjekte hin. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Bildung von Proteindomänen sein. Dieser postulierten Cluster-Bildung von MscL-Kanälen soll im Folgenden nachgegangen werden.

Aus dem Abfall der Streukurven der SANS-Messungen an MscL konnte eine Größe der Streuobjekte von ca. 50 nm ermittelt werden. Ein Grund für diese unerwartete Größe der Streuobjekte könnte eine große Anzahl von Kanälen in den Vesikel sein. Hierbei muss beachtet werden, dass die vereinfachte Annahme von einzelnen, unabhängig streuenden MscL-Kanälen auch ohne Cluster-Bildung nicht aufrechterhalten werden kann. Die Anzahl der Kanäle in einem Vesikel ist selbst bei gleichmäßig verteilten Proteinen zu hoch, um zu einer voneinander unabhängigen Streuung zu führen. Vielmehr müssen alle Proteine in einem Vesikel als ein Gesamtstreuobjekt

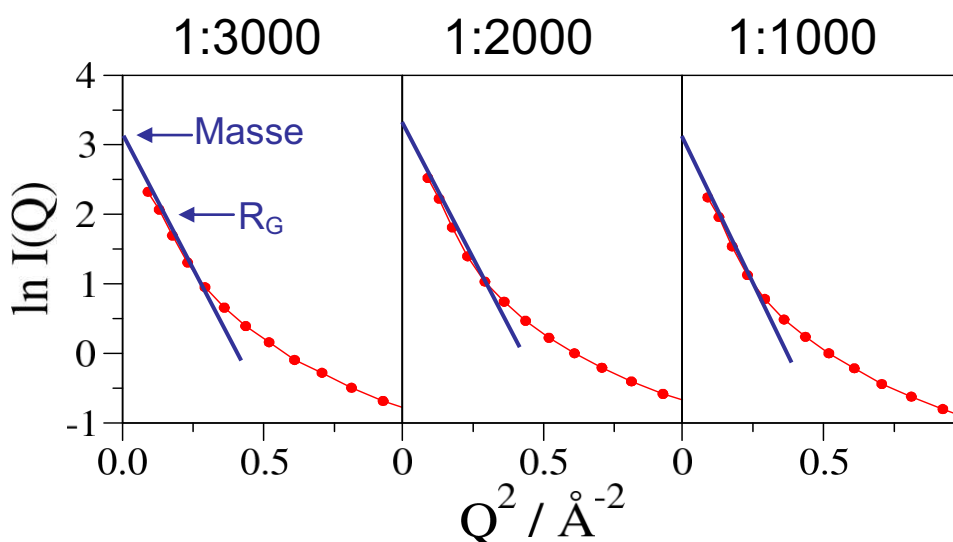


Abb. 5.6.1 Streukurven wurden für drei Protein-zu-Lipid Verhältnisse 1:1000, 1:2000, 1:3000 gemessen. Mithilfe der Guinier-Auftragung $\ln(I(Q))$ vs. Q^2 kann die Intensität der Vorwärtsstreuung $I(0)$, und aus dieser das Molekulargewicht der Streuobjekte ermittelt werden. Aus der Steigung von $\ln(I(Q))$ vs. Q^2 ergibt sich eine Abschätzung des Gyrationradius der Streuobjekte.

betrachtet werden. Aus der beobachteten Größe der Streuobjekte an sich läßt sich deshalb nicht auf Cluster-Bildung schließen. Die entscheidende Frage zur Klärung, ob MscL in Clustern vorliegt, ist vielmehr, ob die Proteine in den Vesikeln gleichmäßig verteilt sind.

Hierfür wurden die Proteinkonzentrationen variiert, um den Einfluss der Proteinkonzentration auf die Cluster Bildung zu untersuchen. Wenn die Proteine verdünnt werden, d.h. in unterschiedlichen Protein-zu-Lipid Verhältnissen vorliegen, sollte dies zu einem veränderten Streuverhalten der Probe führen. MscL wurde hierfür in drei Protein-zu-Lipid Verhältnissen, 1:1000, 1:2000 und 1:3000 (mol/mol), gemessen (Abb 5.6.1).

Ein erster Hinweis auf eine Cluster-Bildung ergibt sich aus einer Betrachtung der Zahl der Kanäle pro Vesikel, bzw. der Gesamtmasse an MscL pro Vesikel, der aus der Vorwärtsstreuung $I(Q=0)$ berechnet werden kann (Abb. 5.5.1). Die in der Messung verwendeten DOPC Lipid Vesikel hatten einen Durchmesser von ca. 120 nm, womit sich bei gleichmäßiger Verteilung der Proteine im Vesikel, 110, 60 und 40 Kanäle pro Vesikel ergeben würden.

Mittels der Streuintensität $I(0)$ kann die Masse des Streuobjekts (M_s) ermittelt werden (Serdyuk et al. 2007).

$$I(0) = M_s c \Delta\rho^2/d^2 = M_s^2 N_s \Delta\rho^2/(Vd^2)$$

$I(Q)$: Streuintensität, M_s : Masse des Streuobjekts, c : Massenkonzentration des Proteins in der Probe, N_s : Zahl der Streuobjekte, d : Dichte des Proteins, $\Delta\rho$: Differenz der Streulängendichten von Protein und Umgebung, V : Volumen der Probe

Dadurch konnte die molekulare Masse der Streuobjekte (M_s) im Experiment ermittelt werden. Sie entsprachen $M_s \approx 22$ MDa (1:1000), $M_s \approx 20$ MDa (1:2000) und $M_s \approx 15$ MDa (1:3000) für die jeweiligen Messungen. Umgerechnet auf die Zahl von MscL Kanälen in einem Streuobjekt, d.h. einem proteinhaltigen Vesikel, entspricht dies jeweils 275, 245 und 185 MscL Kanälen pro proteinhaltigem Vesikel. Diese Zahlen übersteigen ein Vielfaches dessen, was man für eine Gleichverteilung erwarten würde. Somit scheinen die MscL-Kanäle auf wenige Vesikel konzentriert zu sein.

Abstandsverteilung der Streuobjekte

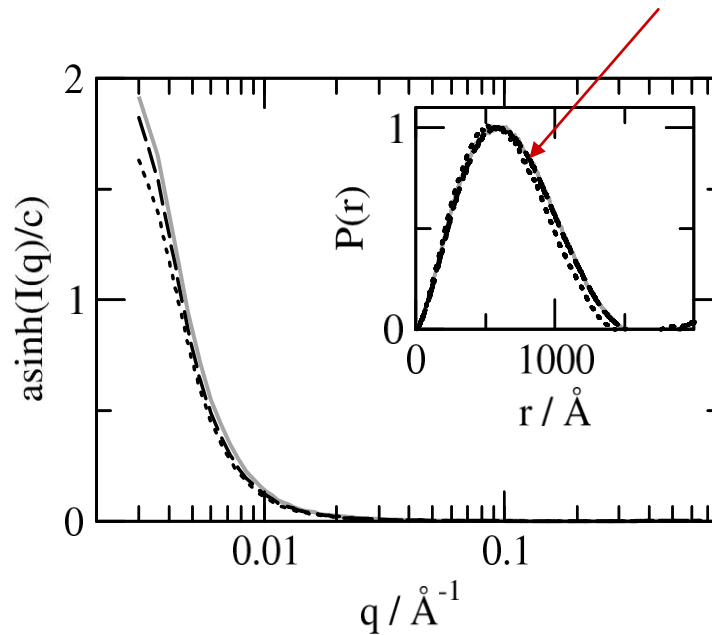


Abb. 5.6.2 Streukurven des geschlossenen MscL-Kanal, rekonstituiert in der DOPC Vesikeln. Drei verschiedenen Proteinkonzentrationen 1:1000 (grau); 1:2000 (gestrichelt), 1:3000 (gepunktet) wurden untersucht.

Ein weiterer Hinweis für eine Ungleichverteilung von MscL in der Membran stammt aus einer Betrachtung der Variation der Streuintensität in Abhängigkeit des Protein-zu-Lipid Verhältnisses. Für den Fall einer Gleichverteilung der Kanäle über alle Vesikel würde sich das Molekulargewicht des Streuobjekts (alle Proteine auf einem Vesikel) linear mit dem Protein-zu-Lipid Verhältnis ändern (vorausgesetzt der Vesikeldurchmesser bleibt gleich, was durch SANS bestätigt wurde). Nach obiger Gleichung wäre dann $I(0)/c \sim M_s$ linear abhängig vom Protein zu Lipid Verhältnis. Für den Fall, dass MscL sich in Vesikeln derart konzentriert, dass es nur maximal mit Protein beladene und unbeladene Vesikel gibt, wäre das Molekulargewicht der Streuobjekte (beladene Vesikel) unabhängig vom Protein-zu-Lipid Verhältnis. Stattdessen würde sich die Anzahl der Streuobjekte (beladene Vesikel) verändern. Damit wäre $I(0)/c \sim M_s$ in diesem Fall für alle Protein-zu-Lipid Verhältnisse konstant. Wie in Abb. 5.6.2 ersichtlich ist, ändern sich die Streuintensitäten normiert auf die Konzentration der Proteine in der Probe, $I(Q)/c$, nicht, und es liegt der zweite Fall vor, d.h. MscL ist nicht gleichmäßig über alle Vesikel verteilt. Vielmehr scheint MscL eine starke Tendenz zur Zusammenlagerung zu besitzen, und in Clustern vorzuliegen, die große Teile der proteinhaltigen Vesikel bedecken. Wichtig in diesem Zusammenhang

ist die Beobachtung des vorherigen Kapitels, dass die Kanäle nach wie vor funktionsfähig waren, d.h. sich öffnen ließen, es sich bei der Selbstassemblierung von MscL also nicht um degeneriertes Protein handelt.

In den Arbeiten von Kooperationspartnern konnte die Cluster-Bildung von MscL auch mit anderen Methoden, wie Atomkraftmikroskopie, patch clamp und Fluoreszenz, bestätigt werden. Die Ergebnisse sind in einer gemeinsamen Veröffentlichung einander gegenübergestellt (Grage et al. 2011).

6. Diskussion

6.1 Die Bedeutung der Loop-Region für die Funktion des Kanals

Die periplasmatische Loop-Region des MscL-Kanals fungiert als Linker zwischen den TM1- und TM2-Helices. Im Vergleich zu den transmembranen Bereichen des Proteins ist sie nicht gut konserviert und variiert ziemlich stark zwischen verschiedenen Organismen (Maurer and Dougherty 2003; Moe et al. 2000; Pivetti et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass auch nach dem Durch- oder Abschneiden der Loop-Region der Kanal noch aktiv ist. Deshalb wurde angenommen, dass der periplasmatische Loop für die Poren-Bildung und -Öffnung keine direkte Rolle spielt (Park et al. 2004). Trotzdem reagierten die so manipulierten Kanäle unterschiedlich auf mechanischen Reiz, was auf einen Einfluss der Loop-Region auf die Funktionalität hindeutete. Es wurde eine „Feder“-Rolle des periplasmatischen Loops postuliert, wobei der Loop wie eine Feder den geschlossenen Zustand des Kanals stabilisiert (Ajouz et al. 2000)

In der Kristallstruktur des Tb-MscL war die Loop-Region nicht gut aufgelöst, auch in Untersuchungen des Öffnungsmechanismus mittels MD-Simulation wurde die Loop-Region oft vernachlässigt. Die Struktur und Funktion der Loop-Region ist daher nicht gut verstanden. Nur für Eco-MscL wurde im geschlossenen Kanal eine kleine Helix postuliert. Hier konnte unser Kooperationspartner Prof. Boris Martinac basierend auf EPR-Experimenten und MD-Simulationen Hinweise für eine Helix zwischen den Aminosäuren 48-58 im geschlossenen Kanal, sowie für zwei Helices in den Bereichen 44-53 und 59-69 im offenen Zustand des Kanals, finden.

In dieser Arbeit wurden Mutanten mit verschiedenen Deletionen in der periplasmatischen Loop-Region hergestellt. Sie wurden so entworfen, dass die für den geschlossenen (AS 48-58) und offenen (AS 44-54, 59-69) Zustand des Kanals postulierten Helices in der Loop-Region entweder enthalten waren oder fehlten. Die Mutanten wurden erfolgreich exprimiert, was bedeutet, dass sie keine ausgeprägten GOF-Mutanten („gain of function“) darstellten, die eine Zellyse verursacht hätten. Hieraus kann man schließen, dass sie entweder voll funktionsfähig oder LOF-Phenotypen („loss of function“) waren. Mittels Patch-Clamp wurde die Funktionalität der veränderten Kanäle untersucht. Von acht Mutanten wurde nur für WT-MscL und

die Δ 45-53 Deletionsmutante eine Kanal-Aktivität beobachtet. Die strukturelle Integrität des Kanals wurde mittels Circular dichroismus überprüft, und alle Mutanten wiesen in LPPG-Detergenz eine ausgeprägte α -helikale Struktur auf. Die Mutation hatte somit keinen Einfluß auf die Sekundärstruktur des Kanals. Rekonstituiert in Lipid-Vesikel (POPC:POPG=3:1) verhielten sich die Mutanten unterschiedlich. Hier wurde ein Effekt beobachtet, der in der optischen Spektroskopie als „Absorption Flattening“ bekannt ist. Die Unterschiede in den CD-Spektren könnten auch daher rühren, dass die Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen. Die Proteinkonzentration wurde unter Anwendung der Bradford-Methode bestimmt, was gewisse Abweichungen von den tatsächlichen Mengen ergibt. Daher wurden die Spektren auf die Intensität bei 225 nm normiert, um den Einfluss der Konzentrationsunterschiede zu eliminieren. In den normierten Spektren ist deutlich zu sehen, dass es in der Δ 45-74 Mutante (komplette Deletion des Loops) zu starkem „Absorption Flattening“ kommt, während die anderen Mutanten eine ähnliche helikale Struktur wie WT-MscL annehmen, d.h. die Struktur dieser Mutanten war erhalten geblieben. Der Verlust der Funktionalität der meisten Deletionsmutanten scheint daher im Fehlen der entfernten Aminosäuren selbst zu liegen und nicht in einer fehlerhaften Faltung oder Membran-einbettung. Aus der Literatur sind Hinweise bekannt, dass die Länge der Loop-Region öfters einen wichtigeren Einfluss auf die Funktionalität hatte als die Sequenz selbst (Lee et al. 2009). In dieser Arbeit konnte zwar nicht ermittelt werden, ob die Veränderung der Länge des Loops oder seiner Sequenz verantwortlich für den Funktionsverlust war. Es ist jedoch eindeutig, dass die Loop-Region eine wichtige Rolle beim Kanal-Öffnen spielt, auch wenn sie nicht für die Ausbildung der korrekten Struktur von MscL notwendig zu sein scheint.

6.2 Durchführbarkeit von 3D Strukturuntersuchungen an MscL

Für NMR-spektroskopische Untersuchungen wurden ^{15}N -markierte MscL-Proteine hergestellt. Da MscL für die angestrebten Festkörper-NMR-Messungen ein großes Protein darstellt, wurden neben uniformer Markierung ebenfalls selektive Isotopen-Markierungen einzelner Aminosäuretypen durchgeführt. Wie durch HSQC-Experimente bestätigt werden konnte, war die Vollmarkierung des Proteins mit ^{15}N erfolgreich. In Versuchen, einen bestimmten Aminosäuretyp mit ^{15}N selektiv zu

markieren, wurde unterschiedlich stark ausgeprägtes „Scrambling“ beobachtet. Hierbei wird die ¹⁵N-Markierung, die über nur einen Aminosäuretyp im Wachstumsmedium während der Expression zugeführt wird, über Stoffwechselkreisläufe auch in weitere Aminosäuretypen verbreitet. Da in Bakterien Aminosäuren auf verschiedenen Stoffwechselwegen umgebaut werden, ergaben sich für die verschiedenen Aminosäuren unterschiedliche „Scrambling“-Effekte. Dieses Phänomen ist für die weitere Strukturuntersuchung ein Hindernis. Durch Zugabe unmarkierter Aminosäuren zum Wachstumsmedium konnte dieser Effekt behoben, da die Bakterien dann im Medium vorhandene Aminosäuren nutzen anstatt Aminosäuren ineinander umzuwandeln.

CD-Spektren von WT-MscL in Membranen verschiedener Lipidzusammensetzungen zeigten unterschiedliches Verhalten. Allgemein war zu erkennen, dass eine negative Ladung der Membran zu CD-Spektren mit ausgeprägteren α -Helix-Merkmalen führte. Dies ist auch in der physiologischen Umgebung zu erwarten, da bakterielle Membranen negativ geladene Lipide besitzen. Allerdings verhält sich MscL in ausschließlich negativ geladenen Lipiden ähnlich wie in zwitterionischen Lipiden. In CD-Experimenten wurden auch die Lipidkettenlänge und der Sättigungsgrad variiert, und es wurden ausgeprägtere helikale Merkmale in langkettigen und ungesättigten Lipiden beobachtet.

Diese Lipidmischungen wurden auch für Festkörper-NMR-Experimente in orientierten Membranen benutzt. Im Gegensatz zu den erfolgreichen CD-Messungen wurde hier jedoch für alle Lipid-Mischungen und Lipid-zu-Protein Verhältnisse ein Pulverspektrum gefunden. Dies bedeutet, dass MscL alle möglichen Orientierungen bezüglich der Membrannormalen angenommen hat. Da das Protein seine Sekundärstruktur im Rekonstitutionsprozess beibehalten hat und der Verlust der Struktur ausgeschlossen werden konnte, könnte ein Zusammenlagern von MscL die Ursache dafür sein, dass in orientierten Proben keine einheitliche Proteinorientierung erhalten werden konnte. In der Tat konnte mit weiteren biophysikalischen Methoden (AFM, SANS, Patch-clamp) die Ausbildung von Protein-Clustern aus MscL-Kanälen beobachtet werden, die eine Strukturbestimmung mittels Festkörper-NMR in orientierten Membranen verhindern.

6.3 Cluster-Bildung

Die Bildung von Clustern aus MscL-Kanälen wurde mit verschiedenen Methoden beobachtet. In SANS-Experimenten konnte anhand der Intensitäten der Neutronenstreuung an Proben mit verschiedenem Protein-zu-Lipid Verhältnis eindeutig widerlegt werden, dass MscL gleichmäßig in der Membran verteilt ist. In CD-Spektren von MscL in Vesikeln aus zwitterionischem Phosphatidylcholin wurde „Absorption Flattening“ beobachtet, was auf eine hohe lokale Dichte der Proteine hindeutet. Außerdem wurde die Cluster-Bildung von MscL auch von unseren Kooperations-partnern in Patch-Clamp-Experimenten und AFM beobachtet. Die Beobachtung der Cluster-Bildung mit verschiedenen Techniken wurde in einer Veröffentlichung zusammengefasst (Grage et al. 2010).

Die Bildung von Clustern in CD-Experimenten konnte verhindert werden, wenn negativ geladene Lipide in die Vesikel eingebracht wurden. Möglicherweise führt die Wechselwirkung mit dem sogenannten „Ladungs-Cluster“ im cytoplasmatischen Loop zu einer Stabilisierung des Proteins in geladenen Lipiden. Der Einfluss von negativ geladenen Lipiden wurde auch in anderen Arbeiten beobachtet (Powl et al. 2005). Trotzdem konnte gezeigt werden, dass der Kanal auch in zwitterionischen Vesikeln wie DOPC aktiv war. Dies bestätigen auch unsere Ergebnisse der SANS-Experimente, die eine Cluster-Bildung in DOPC zeigten, in welchen die Kanäle aber trotzdem funktionsfähig waren.

Die Bildung von Clustern erklärt, warum in Festkörper-NMR-Experimenten in orientierten Membranen nur Pulvespektren, die auf einen geringen Orientierungsgrad des Proteins hindeuten, erhalten wurden. Eine gewisse Ausnahme waren magnetisch orientierte Membranen, sogenannte Bizellen, in denen das Protein den höchsten Orientierungsgrad zeigte. Die verwendeten Bizellen bestanden aus DMPC Lipiden und CHAPSO-Detergenz, wobei das MscL-Protein unter Verwendung von CHAPSO Detergenz aufgereinigt und prozessiert werden musste. Ein Grund für die bessere Orientierung in Bizellen könnte die räumliche Begrenzung im Bizellensystem sein, die eine Ausbildung von Clustern verhindert.

6.4 Ursache der Cluster-Bildung

Eine plausible Erklärung der Cluster-Bildung von MscL sind Protein-Protein-Wechselwirkungen, die durch Protein-Lipid-Wechselwirkungen vermittelt werden (Abbildung 6.4.1). Entspricht die Membrandicke nicht der Dicke des hydrophoben Bereichs des Kanals, so kann sich die Membran in ihrer Dicke dem transmembranen Bereich des Proteins anpassen. Es entsteht ein Übergangsbereich um den Kanal, in dem die Dicke der Membran von ihrer Gleichgewichtsdicke zur Dicke des hydrophoben Proteinbereichs variiert. Dieser energetisch ungünstige Grenzflächenbereich kann verringert werden, wenn MscL-Kanäle sich räumlich nahe kommen. Hierdurch entsteht eine anziehende Kraft zwischen Kanälen, die zur Zusammenlagerung der MscL-Kanäle zu Clustern führen kann. Hierbei kann die Proteindicke größer oder kleiner sein als die Membrandicke. Somit ist eine Lipid-vermittelte Protein-Protein Wechselwirkung sowohl für geschlossene, als auch offene Kanäle denkbar, die sich wegen der unterschiedlichen Schräglage der Transmembranhelices deutlich in der Dicke ihres hydrophoben Bereichs unterscheiden.

Energetische Berechnungen von K.C. Huang untermauern die Hypothese einer Lipid-vermittelten Protein-Protein-Wechselwirkung (Grage et al. 2011).

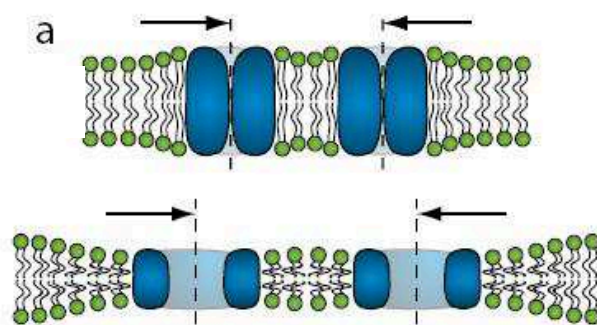


Abb. 6.4.1. Lipid-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkungen führen zu anziehenden Kräften zwischen MscL-Kanälen im geschlossenen und ggf. auch im offenen Zustand.

6.5 Bedeutung der Cluster-Bildung

In Bakterien kommen ca. fünf MscL-Kanäle pro Zelle vor (Li et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass bei der Überexpression von MscL die Kanäle als Cluster

vorkommen, besonders im mesosomalen Bereich. Diese Region des Bakteriums ist osmotisch empfindlich, was die Häufung der MscL Kanäle in diesem Bereich erklären könnte (Hartmann et al.).

Es ist auch bekannt, dass andere mechanosensitive Ionenkanäle, wie z.B. Kanäle in Pflanzen, zur Clusterbildung neigen (Haswell 2007). Cluster-Bildung könnte demnach ein gemeinsames und funktionell wichtiges Merkmal der mechanosensitiven Ionenkanäle sein.

Ob MscL-Cluster tatsächlich eine Rolle in der Physiologie der Bakterien spielen, bleibt spekulativ. Allerdings können die Schlussfolgerungen dieser Arbeit von grosser experimenteller Bedeutung sein. Man geht in der Regel davon aus, dass Membranproteine nach der Rekonstitution in Membranen homogen verteilt sind. Dies ist aber nicht notwendigerweise der Fall, wie diese Arbeit gezeigt hat. Eine ungleichmäßige Verteilung ist nicht aus allen Experimenten sofort evident, da beispielsweise MscL trotz Cluster-Bildung in Patch-clamp Experiment funktionsfähig ist. Allerdings kann das Verhalten von Membranproteinen falsch interpretiert werden, wie z. B. durch „absorption flattening“ in der CD-Strukturanalyse, wenn die räumliche Verteilung in der Membran nicht berücksichtigt wird. Festkörper-NMR Untersuchungen an orientierten Membranen sind unter diesen Umständen praktisch nicht möglich.

Insgesamt stellt die Bildung von Clustern aus Membranproteinen ein interessantes biophysikalisches Phänomen dar. In MscL konnten Protein-Protein-Wechselwirkungen beobachtet werden, die durch die Lipidumgebung vermittelt werden. Dieses Prinzip könnte eine weitreichende Rolle für das Verhalten auch anderer Membranproteine spielen, insbesondere wenn man bedenkt, dass ein beträchtlicher Teil einer natürlichen Membran aus Proteinen besteht.

7. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit Strukturuntersuchungen an mechanosensitiven Kanal MscL aus *E.coli* für den bislang nur ein 3D-Modell im geschlossenen Zustand vorliegt. Das erste Ziel war es, Einblicke in die funktionelle Rolle der periplasmatischen Loop-Region und in die strukturellen Veränderungen während des Öffnens des Kanals zu bekommen. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Deletionsmutanten in der Loop-Region hergestellt, und deren strukturelle Integrität und Aktivität wurde mittels Circular dichroismus-Spektroskopie und Patch-Clamp-Experimenten untersucht. Überraschenderweise zeigte nur eine einzige der acht Deletionsmutanten eine Kanal-Aktivität. Ein intakter periplasmatischer Loop scheint daher essentiell für die Protein-Funktion zu sein, obwohl er in CD-Messungen keinen Einfluss auf die Gesamtstruktur des Proteins zu haben schien.

Strukturelle Unterschiede zwischen dem offenen und geschlossenen Zustand des Kanals sollten mit Hilfe von Festkörper-NMR an orientierten Membranen charakterisiert werden. Die hierfür notwendige Isotopen-Markierung des MscL-Proteins wurde erfolgreich durchgeführt, wobei uniform und Aminosäuren-selektiv ¹⁵N-markiertes Protein hergestellt werden konnte. Die für die Festkörper-NMR notwendige uniforme Ausrichtung von MscL in orientierten Membranen gelang jedoch nicht. Einer möglichen Ursache hierfür, der Bildung von MscL-Clustern, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nachgegangen.

Die Validierung der Bildung von MscL-Clustern in der Membran, die sich in vielen der durchgeführten strukturellen Experimente bereits andeutete, bildete den zweiten Schwerpunkt dieser Dissertation. Mittels Kleinwinkel-Neutronstreuung wurde hierzu die Verteilung der Kanäle in der Membran charakterisiert. Hierbei stellte sich heraus, dass MscL nicht gleichmäßig in der Membran verteilt ist, und dass die MscL-Kanäle auch im Cluster nach wie vor funktionsfähig sind. Die Ergebnisse der Neutronenstreuungs-Experimente konnten auch durch weitere Methoden bestätigt werden. Eine Ursache für das Zusammenlagern des Proteins könnten durch Protein-Lipid-Wechselwirkungen vermittelte Protein-Protein-Interaktionen sein. Eine physiologische Relevanz der Bildung von MscL-Clustern ist möglicherweise nicht gegeben, jedoch könnten die zugrundeliegenden biophysikalischen Prinzipien für das Verhalten vieler Membranproteine von Bedeutung sein. Zusammenfassend war es

möglich, die Bildung von Clustern, wie sie in letzter Zeit für eine Reihe von Membranproteinen beobachtet wurde, erstmals auch für MscL zu belegen.

8. Literatur

- Ajouz B, Berrier C, Besnard M, Martinac B, Ghazi A (2000) Contributions of the different extramembraneous domains of the mechanosensitive ion channel MscL to its response to membrane tension. *Journal of Biological Chemistry* 275:1015-1022
- Ajouz B, Berrier C, Garrigues A, Besnard M, Ghazi E (1998) Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells. *Journal of Biological Chemistry* 273:26670-26674
- Akitake B, Anishkin A, Sukharev S (2005) The "dashpot" mechanism of stretch-dependent gating in MscS. *Journal of General Physiology* 125:143-154
- Anishkin A, Gendel V, Sharifi NA, Chiang CS, Shirinian L, Guy HR, Sukharev S (2003) On the conformation of the COOH-terminal domain of the large mechanosensitive channel MscL. *Journal of General Physiology* 121:227-244
- Balleza D, Gomez-Lagunas F (2009) Conserved motifs in mechanosensitive channels MscL and MscS. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 38:1013-1027
- Bass RB, Strop P, Barclay M, Rees DC (2002) Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* 298:1582-1587
- Belyy V, Kamaraju K, Akitake B, Anishkin A, Sukharev S (2010) Adaptive behavior of bacterial mechanosensitive channels is coupled to membrane mechanics. *Journal of General Physiology* 135:641-652
- Berrier C, Besnard M, Ajouz B, Coulombe A, Ghazi A (1996) Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *Journal of Membrane Biology* 151:175-187
- Blount P, Ou X, Hoffman RJ, Kung C (1998a) Characterization of randomly generated mutants of MscL, a mechanosensitive channel in bacteria, identifies a functional region of the protein. *Biophysical Journal* 74:A324-A324

-
- Blount P, Schroeder MJ, Kung C (1997) Mutations in a bacterial mechanosensitive channel change the cellular response to osmotic stress. *Journal of Biological Chemistry* 272:32150-32157
- Blount P, Shroeder MJ, Kung C (1998b) Mutations in MscL, a bacterial mechanosensitive channel, can change the cellular response to osmotic stress. *Biophysical Journal* 74:A239-A239
- Blount P, Sukharev S, Schroeder M, Nagle S, Kung C (1996a) Mutations that change gating properties of a mechanosensitive channel in E-coli. *Biophysical Journal* 70:WAMD7-WAMD7
- Blount P, Sukharev SI, Moe PC, Martinac B, Kung C (1999) Mechanosensitive channels of bacteria. *Methods Enzymol* 294:458-82
- Blount P, Sukharev SI, Moe PC, Nagle SK, Kung C (1996b) Towards an understanding of the structural and functional properties of MscL, a mechanosensitive channel in bacteria. *Biology of the Cell* 87:1-8
- Blount P, Sukharev SI, Moe PC, Schroeder MJ, Guy HR, Kung C (1996c) Membrane topology and multimeric structure of a mechanosensitive channel protein of *Escherichia coli*. *Embo Journal* 15:4798-4805
- Blount P, Sukharev SI, Schroeder MJ, Nagle SK, Kung C (1996d) Single residue substitutions that change the gating properties of a mechanosensitive channel in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:11652-11657
- Bodenhausen G, Ruben DJ (1980) Natural Abundance N-15 Nmr by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 69:185-189
- Booth IR, Louis P (1999) Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 2:166-9
- Brehm P, Kidokoro Y, Moodycorbett F (1984a) Acetylcholine-Receptor Channel Properties During Development of *Xenopus* Muscle-Cells in Culture. *Journal of Physiology-London* 357:203-217

-
- Brehm P, Kullberg R, Moodycorbett F (1984b) Properties of Non-Junctional Acetylcholine-Receptor Channels on Innervated Muscle of *Xenopus-Laevis*. *Journal of Physiology-London* 350:631-648
- Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW (2002) The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 111:967-79
- Call ME, Schnell JR, Xu C, Lutz RA, Chou JJ, Wucherpfennig KW (2006) The structure of the zeta transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor. *Cell* 127:355-68
- Chalfie M (2009) Neurosensory mechanotransduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10:44-52
- Chang G, Spencer RH, Lee AT, Barclay MT, Rees DC (1998) Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: A gated mechanosensitive ion channel. *Science* 282:2220-2226
- Chapman D (1975) Phase-Transitions and Fluidity Characteristics of Lipids and Cell-Membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* 8:185-235
- Chou PY, Fasman GD (1978) Empirical Predictions of Protein Conformation. *Annual Review of Biochemistry* 47:251-276
- Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung ELM, Derfler BH, Duggan A, Geleoc GSG, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS (2004) TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432:723-730
- Cramer WA, Engelman DM, Vonheijne G, Rees DC (1992) Forces Involved in the Assembly and Stabilization of Membrane-Proteins. *Faseb Journal* 6:3397-3402
- Daleke DL (2003) Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *Journal of Lipid Research* 44:233-242

-
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77
- Ernstrom GG, Chalfie M (2002) Genetics of sensory mechanotransduction. *Annual Review of Genetics* 36:411-453
- Grage SL, Keleshian AM, Turdzieladze T, Battle AR, Tay WC, May RP, Holt SA, Antoranz Contera S, Haertlein M, Moulin M, Pal P, Rohde PR, Forsyth VT, Huang KC, Watts A, Ulrich AS, Martinac B (2010) Clustering and functional interaction of MscL channels. *Biophys. J.* in revision
- Gullingsrud J, Kosztin D, Schulten K (2001) Structural determinants of MscL gating studied by molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal* 80:2074-2081
- Gurezka R, Laage R, Brosig B, Langosch D (1999) A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments. *Journal of Biological Chemistry* 274:9265-9270
- Haeger S, Kuzmin D, Detro-Dassen S, Lang N, Kilb M, Tsetlin V, Betz H, Laube B, Schmalzing G (2010) An intramembrane aromatic network determines pentameric assembly of Cys-loop receptors. *Nature Structural & Molecular Biology* 17:90-U116
- Hartmann M, Berditsch M, Hawecker J, Ardakani MF, Gerthsen D, Ulrich AS Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54:3132-3142
- Hase CC, Ledain AC, Martinac B (1995) Purification and Functional Reconstitution of the Recombinant Large Mechanosensitive Ion-Channel (MscI) of Escherichia-Coli. *Journal of Biological Chemistry* 270:18329-18334
- Hase CC, LeDain AC, Martinac B (1997) Molecular dissection of the large mechanosensitive ion channel (MscL) of E-coli: Mutants with altered channel gating and pressure sensitivity. *Journal of Membrane Biology* 157:17-25

-
- Haswell ES (2007) MscS-like proteins in plants. In: Hamill OP (ed) In In Mechanosensitive Ion Channels Part A. Academic Press, Amsterdam, pp 329-359
- Haswell ES, Meyerowitz EM (2006) MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 16:1-11
- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse JM (2008) Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root. *Current Biology* 18:730-734
- Henderson R, Baldwin JM, Ceska TA, Zemlin F, Beckmann E, Downing KH (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* 213:899-929
- Iscla I, Wray R, Blount P (2008) On the structure of the N-terminal domain of the MscL channel: Helical bundle or membrane interface. *Biophysical Journal* 95:2283-2291
- J. M. Graham, Higgins JA (1998) *Molekularbiologische Membrananalyse*. Spektrum Akademischer Verlag
- Kelly M. S., Jess T.J., Price N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751: 119-139
- Kim S, Jeon TJ, Oberai A, Yang D, Schmidt JJ, Bowie JU (2005) Transmembrane glycine zippers: Physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:14278-14283
- Kloda A, Ghazi A, Martinac B (2006) C-terminal charged cluster of MscL, RKKEE, functions as a pH sensor. *Biophysical Journal* 90:1992-1998
- Kloda A, Martinac B (2001) Structural and functional differences between two homologous mechanosensitive channels of *Methanococcus jannaschii*. *Embo Journal* 20:1888-1896

-
- Krieger F, Moglich A, Kiefhaber T (2005) Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of loop formation in polypeptide chains. *Journal of the American Chemical Society* 127:3346-3352
- Kumamoto CA (2008) Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. *Nature Reviews Microbiology* 6:667-673
- Kumanovics A, Levin G, Blount P (2002) Family ties of gated pores: evolution of the sensor module. *Faseb Journal* 16:1623-1629
- Kung C (2005) A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* 436:647-654
- Lafleur M, Cullis PR, Bloom M (1990) Modulation of the Orientational Order Profile of the Lipid Acyl Chain in the L-Alpha Phase. *European Biophysics Journal* 19:55-62
- Landoltmarticorena C, Williams KA, Deber CM, Reithmeier RAF (1993) Nonrandom Distribution of Amino-Acids in the Transmembrane Segments of Human Type-I Single Span Membrane-Proteins. *Journal of Molecular Biology* 229:602-608
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988) The Leucine Zipper - a Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA-Binding Proteins. *Science* 240:1759-1764
- Lee JH, Kim HJ, Kim HD, Lee BC, Chun JS, Park CS (2009) Modulation of the conductance-voltage relationship of the BK(Ca) channel by shortening the cytosolic loop connecting two RCK domains. *Biophys J* 97:730-7
- Levin G, Blount P (2004) Cysteine scanning of MscL transmembrane domains reveals residues critical for mechanosensitive channel gating. *Biophysical Journal* 86:2862-2870
- Levina N, Totemeyer S, Stokes NR, Louis P, Jones MA, Booth IR (1999) Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *Embo Journal* 18:1730-1737

-
- Li YZ, Moe PC, Chandrasekaran S, Booth IR, Blount P (2002) Ionic regulation of MscK, a mechanosensitive channel from *Escherichia coli*. *Embo Journal* 21:5323-5330
- Li YZ, Wray R, Blount P (2004) Intragenic suppression of gain-of-function mutations in the *Escherichia coli* mechanosensitive channel, MscL. *Molecular Microbiology* 53:485-495
- Liu Y, Gerstein M, Engelman DM (2004) Transmembrane protein domains rarely use covalent domain recombination as an evolutionary mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3495-7
- Liu ZF, Gandhi CS, Rees DC (2009) Structure of a tetrameric MscL in an expanded intermediate state. *Nature* 461:120-U132
- Lyu PC, Liff MI, Marky LA, Kallenbach NR (1990) Side-Chain Contributions to the Stability of Alpha-Helical Structure in Peptides. *Science* 250:669-673
- MacKenzie KR, Prestegard JH, Engelman DM (1997) A transmembrane helix dimer: Structure and implications. *Science* 276:131-133
- Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N (2002) Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:1943-1948
- Martinac B (2004) Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *Journal of Cell Science* 117:2449-2460
- Martinac B, Buechner M, Delcour AH, Adler J, Kung C (1987) Pressure-Sensitive Ion Channel in *Escherichia-Coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:2297-2301
- Maurer JA, Dougherty DA (2003) Generation and evaluation of a large mutational library from the *Escherichia coli* mechanosensitive channel of large conductance, MscL: implications for channel gating and evolutionary design. *J Biol Chem* 278:21076-82

-
- Maurer JA, Elmore DE, Clayton D, Xiong L, Lester HA, Dougherty DA (2008) Confirming the revised C-terminal domain of the MscL crystal structure. *Biophysical Journal* 94:4662-4667
- Maurer JA, Elmore DE, Lester HA, Dougherty DA (2000) Comparing and contrasting *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* mechanosensitive channels (MscL) - New gain of function mutations in the loop region. *Journal of Biological Chemistry* 275:22238-22244
- McLaggan D, Jones MA, Gouesbet G, Levina N, Lindey S, Epstein W, Booth IR (2002) Analysis of the kefA2 mutation suggests that KefA is a cation-specific channel involved in osmotic adaptation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 43:521-536
- McMahon HT, Gallop JL (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438:590-596
- Melchior DL, Steim JM (1976) Thermotropic transitions in biomembranes. *Annu Rev Biophys Bioeng* 5:205-38
- Moe P, Blount P (2005) Assessment of potential stimuli for mechano-dependent gating of MscL: effects of pressure, tension, and lipid headgroups. *Biochemistry* 44:12239-12244
- Moe PC, Blount P, Kung C (1998) Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Molecular Microbiology* 28:583-592
- Moe PC, Levin G, Blount P (2000) Correlating a protein structure with function of a bacterial mechanosensitive channel. *Journal of Biological Chemistry* 275:31121-31127
- Mokrab Y, Stevens TJ, Mizuguchi K (2009) Lipophobicity and the residue environments of the transmembrane alpha-helical bundle. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 74:32-49
- Moore DT, Berger BW, DeGrado WF (2008) Protein-protein interactions in the membrane: sequence, structural, and biological motifs. *Structure* 16:991-1001

-
- Nakayama Y, Fujiu K, Sokabe M, Yoshimura K (2007) Molecular and electrophysiological characterization of a mechanosensitive channel expressed in the chloroplasts of *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:5883-5888
- Niegowski D, Eshaghi S (2007) The CorA family: Structure and function revisited. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64:2564-2574
- Nikaido H (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:593-656
- Ou XR, Blount P, Hoffman RJ, Kung C (1998) One face of a transmembrane helix is crucial in mechanosensitive channel gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:11471-11475
- Park KH, Berrier C, Martinac B, Ghazi A (2004) Purification and functional reconstitution of N- and C-halves of the MscL channel. *Biophysical Journal* 86:2129-2136
- Patel AJ, Honore E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *Embo J* 17:4283-90
- Perozo E (2006) Gating prokaryotic mechanosensitive channels. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:109-119
- Perozo E, Cortes DM, Sompornpisut P, Kloda A, Martinac B (2002a) Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels. *Nature* 418:942-948
- Perozo E, Cortes DM, Kloda A, Sompornpisut P, Martinac B (2002b) Structure of MscL in the open state and the molecular mechanism of gating in mechanosensitive channels. *Biophysical Journal* 82:1299
- Perozo E, Kloda A, Cortes DM, Martinac B (2002c) Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nature Structural Biology* 9:696-703

-
- Pivetti CD, Yen MR, Miller S, Busch W, Tseng YH, Booth IR, Saier MH (2003) Two families of mechanosensitive channel proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:66-+
- Pop OI, Soprova Z, Koningstein G, Scheffers DJ, van Ulsen P, Wickstrom D, de Gier JW, Luirink J (2009) YidC is required for the assembly of the MscL homopentameric pore. *Febs Journal* 276:4891-4899
- Popot JL, Engelman DM (1990) Membrane-Protein Folding and Oligomerization - the 2-Stage Model. *Biochemistry* 29:4031-4037
- Powl AM, East JM, Lee AG (2005) Heterogeneity in the binding of lipid molecules to the surface of a membrane protein: Hot spots for anionic lipids on the mechanosensitive channel of large conductance MscL and effects on conformation. *Biochemistry* 44:5873-5883
- Sackin H (1995) Mechanosensitive Channels. *Annual Review of Physiology* 57:333-353
- Saint N, Lacapere JJ, Gu LQ, Ghazi A, Martinac B, Rigaud JL (1998) A hexameric transmembrane pore revealed by two-dimensional crystallization of the large mechanosensitive ion channel (MscL) of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 273:14667-14670
- Sal-Man N, Gerber D, Bloch I, Shai Y (2007) Specificity in transmembrane helix-helix interactions mediated by aromatic residues. *J Biol Chem* 282:19753-61
- Samatey FA, Xu CB, Popot JL (1995) On the Distribution of Amino-Acid-Residues in Transmembrane Alpha-Helix Bundles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:4577-4581
- Serdyuk IN, Zaccai NR, Zaccai J, Zaccai G (2007) *Small-angle scattering Methods in molecular biophysics*. Cambridge University Press, pp 794-836
- Stauffer EA, Holt JR (2007) Sensory transduction and adaptation in inner and outer hair cells of the mouse auditory system. *Journal of Neurophysiology* 98:3360-3369

-
- Steinbacher S, Bass R, Strop P, Rees DC (2007) Structures of the prokaryotic mechanosensitive channels MscL and MscS *Mechanosensitive Ion Channels, Part A*, vol 58, pp 1-24
- Stock D, Leslie AGW, Walker JE (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286:1700-1705
- Sukharev S (2002) Purification of the small mechanosensitive channel of *Escherichia coli* (MscS): the subunit structure, conduction, and gating characteristics in liposomes. *Biophysical Journal* 83:290-298
- Sukharev S, Anishkin A (2004) Mechanosensitive channels: what can we learn from 'simple' model systems? *Trends in Neurosciences* 27:345-351
- Sukharev S, Betanzos M, Chiang CS, Guy HR (2001a) The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature* 409:720-724
- Sukharev S, Durell SR, Guy HR (2001b) Structural models of the MscL gating mechanism. *Biophysical Journal* 81:917-936
- Tang Y, Yoo J, Yethiraj A, Cui Q, Chen X (2008) Gating mechanisms of mechanosensitive channels of large conductance, II: systematic study of conformational transitions. *Biophys J* 95:581-96
- Tsai IJ, Liu ZW, Rayment J, Norman C, McKinley A, Martinac B (2005) The role of the periplasmic loop residue glutamine 65 for MscL mechanosensitivity. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 34:403-412
- van den Bogaart G, Krasnikov V, Poolman B (2007) Dual-color fluorescence-burst analysis to probe protein efflux through the mechanosensitive channel MscL. *Biophys J* 92:1233-40
- van der Wel PCA, Strandberg E, Killian JA, Koeppe RE, II (2002) Geometry and Intrinsic Tilt of a Tryptophan-Anchored Transmembrane alpha-Helix Determined by 2H NMR. *Biophys. J.* 83:1479-1488
- Vasquez V, Perozo E (2004) Voltage dependent gating in MscS. *Biophysical Journal* 86:545A-545A

-
- Wang CX, Ge HX, Hou XP, Li YQ (2007) Roles of larger conductance mechanosensitive channels (MscL) in sporulation and Act secretion in *Streptomyces coelicolor*. *J Basic Microbiol* 47:518-24
- Wang WJ, Black SS, Edwards MD, Miller S, Morrison EL, Bartlett W, Dong CJ, Naismith JH, Booth IR (2008) The structure of an open form of an *E. coli* mechanosensitive channel at 3.45 angstrom resolution. *Science* 321:1179-1183
- White SH, Wimley WC (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28:319-65
- Whitley P, Nilsson I, von Heijne G (1994) De novo design of integral membrane proteins. *Nat Struct Biol* 1:858-62
- Yoshimura K, Batiza A, Kung C (2001) Chemically charging the pore constriction opens the mechanosensitive channel MscL. *Biophysical Journal* 80:2198-2206
- Yoshimura K, Batiza A, Schroeder M, Blount P, Kung C (1999) Hydrophilicity of a single residue within MscL correlates with increased channel mechanosensitivity. *Biophysical Journal* 77:1960-1972
- Zhou XL, Stumpf MA, Hoch HC, Kung C (1991) A Mechanosensitive Channel in Whole Cells and in Membrane Patches of the Fungus *Uromyces*. *Science* 253:1415-1417

9. Anhang

Lipid	Kettenlänge : Sättigung	Ladung
DMPC 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	14:0	0
DMPG 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)	14:0	-1
DPPC 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	16:0	0
DPPG 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)	16:0	-1
DOPC 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	18:1	0
DOPG 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)	18:1	0
POPC 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	16:0-18:1	0
POPG 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)	16:0-18:1	-1

Tab. 9.1 Verwendete Lipide für die angewendeten Membranmodelle.

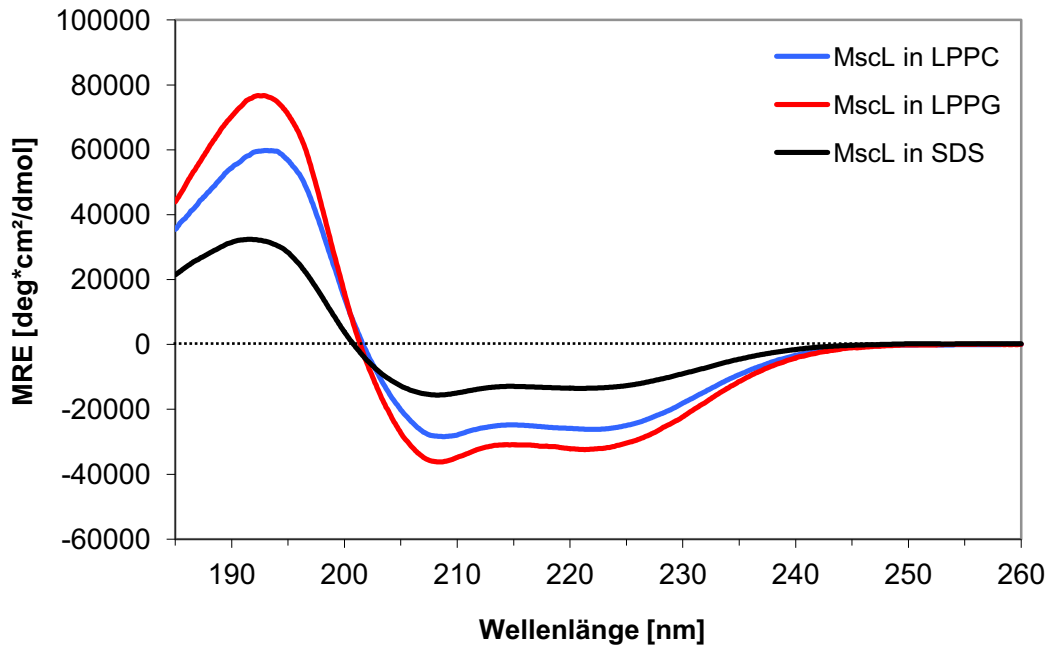


Abb. 9.1 CD-Spektren des WT-MscL in den verschiedenen Detergens-Mizellen. Die CD-Spektren zeigen ausgeprägten für α -helikale Struktur charakteristischen Banden.

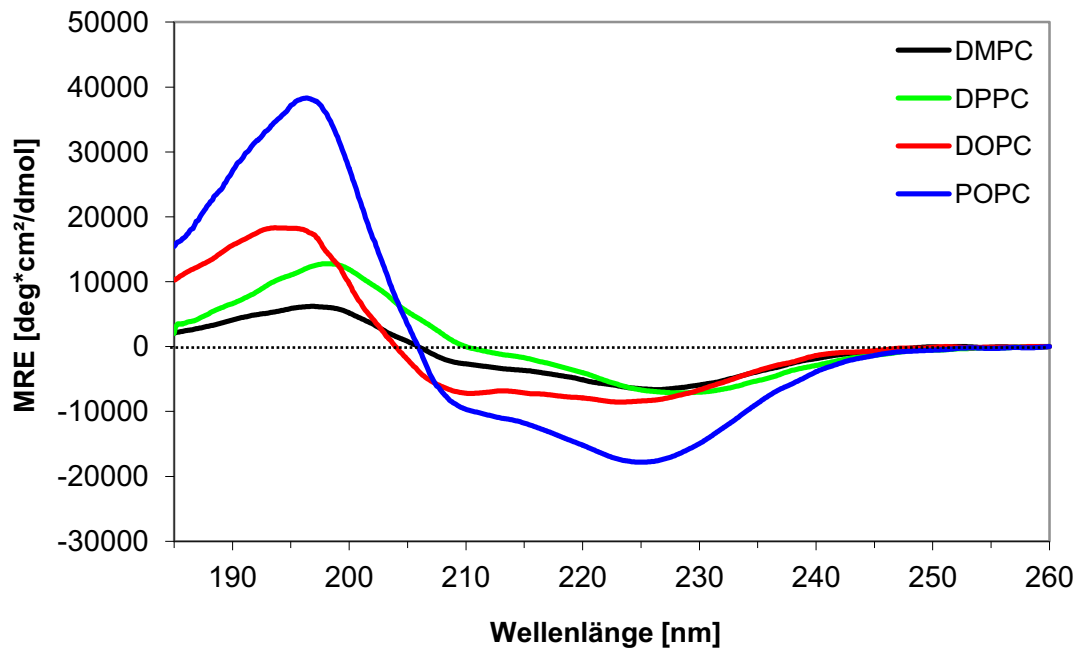


Abb. 9.2 CD-Spektren von WT-MscL in zwitterionischen Lipid-Vesikeln. Die Spektren zeigen einen starken „absorption flattening“-Effekt.

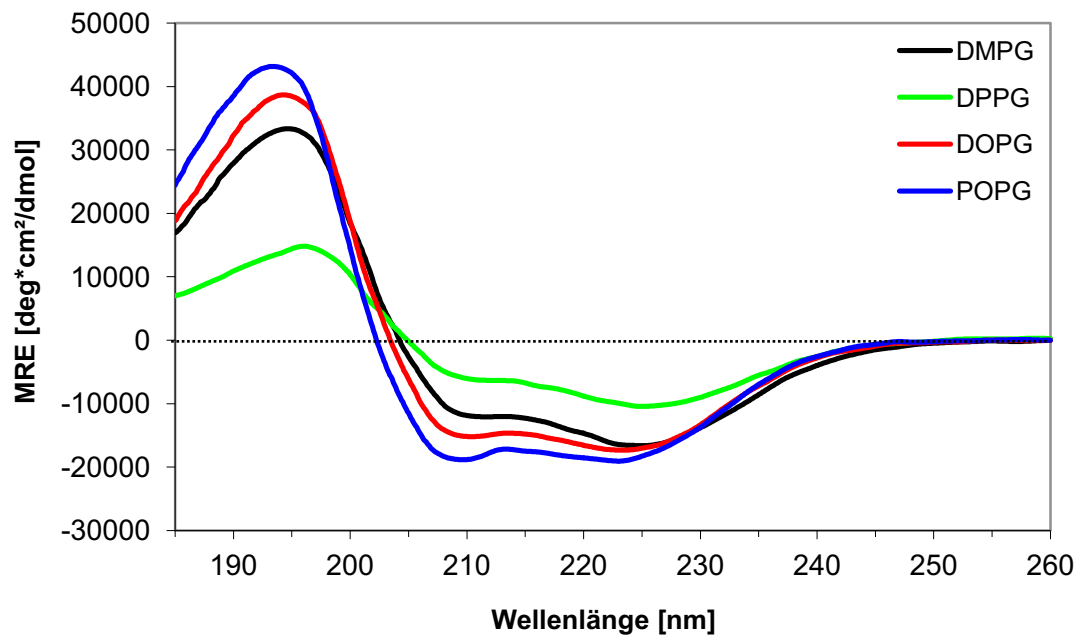


Abb. 9.3 CD-Spektren von WT-MscL in negativgeladenen Lipid-Vesikeln. Die Spektren zeigen die für eine α -helikale Struktur charakteristischen Banden, wobei eine Abnahme der Intensität in Abhängigkeit zum Sättigungsgrad beobachtet wird.

Liste der Veröffentlichungen

1. S. L. Grage, A. M. Keleshian, T. Turdzeladze, A. R. Battle, W. C. Tay, R. P. May, S. A. Holt, S. Antoranz Contera, M. Haertlein, M. Moulin, P. Pal, P. R. Rohde, V. T. Forsyth, K. C. Huang, A. Watts, A. S. Ulrich, B. Martinac.
“Bilayer-mediated clustering and functional interaction of MscL channels”.
Biophys. J., (2011), 100 (5): 1252-1260
2. Kelshian, A.M.; Grage, S.L.; Turdzeladze, T.; Battle, A.R.; Tay, W.C.; Holt, S.A.; Antoranz Contera, s.; Haertlein, M.; Moulin, M.; Pal, P.; Rohde, P.R.; Huang, K.C.; Watts, A.; Ulrich, A.S.; Martinac, B.
“Clustering and functional interaction of MscL channels”.
54th Annual Meeting of the Biophysical Society, San Francisco, Calif., February 20-24, 2010
Vortrag
3. Turdzeladze, T.; Heidenreich, N.; Haertlein, M.; May, R.P.; Moulin, M.; Afonin, S.; Petrov, E.; Battle, A.; Rhode, P.; Buerck, J.; Martinac, B.; Ulrich, A.S.; Grage, S.L.
“Opening transition and clustering of the mechanosensitive channel MscL”.
CFN Summer School on Nano-Biology, Bad Herrenalb, September 8-11, 2009
Poster
4. Grage, S.L.; May, R.P.; Haertlein, M.; Moulin, M.; Turdzeladze, T.; Forsyth, V.T.; Watts, A.; Martinac, B.; Ulrich, A.S.
“Channel opening of the mechanosensitive channel MscL studied by small angle neutron scattering”.
Neutrons and Muons User Meeting, Nottingham, GB, April 18-19, 2008
Poster
5. Turdzeladze, T.; Petrov, E.; Battle, A.; Heidenreich, N.; Rohde, P.R.; Grage, S.L.; Martinac, B.; Ulrich, A.S.
„The role of the periplasmic loops in the opening mechanism of mechanosensitive channel MscL”.
Joint Meeting of the Biophysical Society, 52nd Annual Meeting and 16th Internat. Biophysics Congress, Long Beach, Calif., February 2-6, 2008
Poster
6. Turdzeladze, T.; Heidenreich, N.; Haertlein, M.; May, R.; Moulin, M.; Afonin, S.; Rhode, P.; Martinac, B.; Ulrich, A.S.; Grage, S.L.
“Exploring the opening mechanism of the mechanosensitive channel MscL in lipid model membranes”.
CFN Summer School on Nanobiology, Bad Herrenalb, August 20-23, 2007
Poster

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: TURDZELADZE TAMTA

Geburtsdatum: 06.07.1976
Anschrift: Schützenstraße 50
76137 Karlsruhe

SCHULBILDUNG

1982-1991 Nr. 21 Mittelschule, Rustavi, Georgien

1991-1993 Nr.1 Gymnasium, Rustavi, Georgien.
Chemisch-biologisches Profil

AKADEMISCHER WERDEGANG

1993-1997 Iw. Dschavachischvili Staatliche Universität. Tbilissi, Georgien.
Fakultät für Biologie und Medizin.
Bachelor of Science in Biologie

1996-1999 Iw. Dschavachischvili Staatliche Universität. Tbilissi, Georgien.
Fakultät für Kunst und Geisteswissenschaften.
Neben- Diplom

1998-2000 Iw. Dschavachischvili Staatliche Universität. Tbilissi, Georgien.
Fakultät für Biologie und Medizin.
Master of Science in Zell- und Molekularbiologie.
Master Thesis: „Trainingsprogramm für Ultrasonographie“

2001-2003 Vhs-Heilbronn, Deutschland
Sprachkurs – Deutsch als Fremdsprache

2003-2006 Universität Karlsruhe, Deutschland.
Fakultät für Chemie und Biowissenschaften.
Hauptstudium in Biologie

2006-2010 Universität Karlsruhe, Deutschland
Institut für Organische Chemie, LS Biochemie.
Promotion

BERUFLICHER WERDEGANG

- 2000-2001 Iw. Dschavachischvili Staatliche Universität. Tbilissi, Georgien.
Fakultät für Biologie und Medizin.
Zell- und Molekularbiologie, Computer Modellierungslabor.
Ährenamtliche Mitarbeiterin.
- 2003-2004 Universität Karlsruhe, Deutschland.
Institut für Zoologie I.
Freiwillige Mitarbeiterin
- 2004-2006 Forschungszentrum Karlsruhe, Deutschland.
Institut für biologische Grenzflächen 2.
Hilfswissenschaftlerin
- 2006-2009 Universität Karlsruhe, Deutschland.
Institut für Organische Chemie, LS -Biochemie
Lehrdeputat
- 2010 - Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Deutschland
Campus Nord, Institut für Biologischen Grenzflächen 2.
Assistentin der Geschäftsleitung

SPRACHKENNTNISSE

- Georgisch - Muttersprache
Deutsch - Verhandlungssicher
Englisch - Verhandlungssicher
Russisch - Verhandlungssicher

WEITERBILDUNG:

- 2005 Workshop „Challenging the Membrane Proteins“
Paris, Frankreich
- 2006 Workshop „Expression Systems and Purification of the Proteins“
Heidelberg, Deutschland
- 2006 Fortbildung „Sicherheitsbeauftragte- Schwerpunkt Universitäten
und Hochschulen“
Eppingen, Deutschland

2007	Kurs "Event management - Organisation of the international CFN Summer School on Nanobiology 2007" Bad Herrenalb, Deutschland
2008	Sprachkurs- Spanisch Rápido 1 Karlsruhe, Deutschland
2009	Sprachkurs- Arabisch I Karlsruhe, Deutschland
2009	Kurs "Event management - Organisation of the international CFN Summer School on Nanobiology 2009" Bad Herrenalb, Deutschland

