

**Biochemische und –physikalische Charakterisierung von  
rekombinanten Porinen aus den beiden pathogenen  
Bakterien *Nocardia farcinica* und *Vibrio cholerae* sowie  
von nativen Porinen aus drei *Streptomyces* Arten**

**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

***Christian Kläckta***

aus Coburg

Würzburg, 2009



**Biochemische und –physikalische Charakterisierung von  
rekombinanten Porinen aus den beiden pathogenen  
Bakterien *Nocardia farcinica* und *Vibrio cholerae* sowie  
von nativen Porinen aus drei *Streptomyces* Arten**

**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

***Christian Kläckta***

aus Coburg

Würzburg, 2009

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission: Vorsitzender: Prof. Dr. ....  
1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Roland Benz  
2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Kreft

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Diese Dissertation wurde von mir selbständig und nur mit den  
angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt.

Die von mir vorgelegte Dissertation hat noch in keinem früheren  
Prüfungsverfahren in ähnlicher oder gleicher Form vorgelegen.

Ich habe zu keinem früheren Zeitpunkt versucht,  
einen akademischen Grad zu erwerben.

Würzburg, ..... ..

*"Ich will Euch mein Erfolgsgeheimnis verraten:  
Meine ganze Kraft ist nichts anderes als Ausdauer."*

*Louis Pasteur*

---

---

## Publikationen

---

---

Barth, E., M. Agulló Barceló, C. Kläckta & R. Benz, (2009) Reconstitution experiments in lipid bilayers reveal two-component cell wall channels in *Corynebacteriae*.

*(Manuscript in revision at the Journal of Bacteriology)*

Kläckta, C., P. Knörzer, F. Rieß & R. Benz, (2009) Recombinant expression of the genes *nfa15890* and *nfa15900* coding for a hetero-oligomeric cell-wall channel (porin) of *Nocardia farcinica*.

*(Manuscript submitted to Molecular Microbiology)*

Kläckta, C., C. Beitzinger & R. Benz, (2009) Noise analysis of the sugar specific porin OmpS from *Vibrio cholerae* after purification procedure.

*(Manuscript in preparation for submission)*

---

---

# Inhaltsverzeichnis

---

---

<i>Publikationen</i> .....	7
<i>Inhaltsverzeichnis</i> .....	8
<i>Zusammenfassung</i> .....	13
<i>Summary</i> .....	16
<i>Referenzen</i> .....	19
<b>Kapitel 1 – Einleitung</b> .....	21
<b>1.1. Bakterielle Zellhülle</b> .....	21
<b>1.2. Cytoplasmamembran</b> .....	21
1.2.1. Amphiphatische Lipide .....	21
1.2.2. Cytoplasmamembran-Proteine .....	22
1.2.3. Fluid-Mosaic-Modell .....	22
<b>1.3. Zellwand</b> .....	23
1.3.1. Murein .....	24
1.3.2. Zellwand der Gram-positiven Bakterien .....	24
1.3.3. Äußere Membran (Sonderform: Mycolata) .....	25
1.3.4. Zellwand der Gram-negativen Bakterien .....	26
1.3.5. Äußere Membran (Gram-negative Bakterien) .....	27
<b>1.4. Porine</b> .....	28
1.4.1. Vorkommen und Aufbau .....	28
1.4.2. Allgemeine Diffusionsporen .....	29
1.4.3. Substratspezifische Poren .....	29
1.4.4. Kristallstrukturen von MspA und LamB .....	30
<b>1.5. Referenzen</b> .....	32

<b>Kapitel 2 – Rekombinante Expression der beiden Gene <i>nfa15890</i> und <i>nfa15900</i> ermöglicht die porenformende Zuordnung eines Hetero-Oligomers aus <i>N. farcinica</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1. Zusammenfassung .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2. Einleitung .....</b>	<b>37</b>
<b>2.3. Material und Methoden .....</b>	<b>39</b>
2.3.1. Verwendete Stämme und Wachstumsbedingungen .....	39
2.3.2. Proteinsequenzierung .....	41
2.3.3. Klonierung der Nfp-Monomere mittels PCR.....	42
2.3.4. Expression und Aufreinigung der Nfp-Monomere .....	44
2.3.5. Proteinrenaturierung der Nfp-Monomere.....	45
2.3.6. SDS-PAGE und Western-Blot .....	45
2.3.7. Black-Lipid-Bilayer Methode.....	46
<b>2.4. Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
2.4.1. Hypothetisch für Porine codierende Gene aus <i>N. farcinica</i> .....	49
2.4.2. Klonierung der Nfp-Monomere .....	51
2.4.3. Induktion und Expression der Nfp-Monomere in <i>E.coli</i> .....	54
2.4.4. Aufreinigung der Nfp-Monomere .....	57
2.4.5. Einzelkanalmessung der Nfp-Oligomere .....	59
2.4.6. Spannungsabhängigkeit der Nfp-Oligomere.....	61
2.4.7. pH-Abhängigkeit der Nfp-Oligomere .....	63
2.4.8. Proteinsequenzvergleich der Nfp-Monomere und MspA.....	64
<b>2.5. Diskussion .....</b>	<b>67</b>
2.5.1. Hypothetisch für Porine codierende Gene aus <i>N. farcinica</i> .....	67
2.5.2. Klonierung und Expression der Nfp-Monomere in <i>E. coli</i> .....	69
2.5.3. Aufreinigung der Nfp-Monomere .....	70
2.5.4. Biophysikalische Charakterisierung der Nfp-Oligomere bzw. die porenformende Zuordnung der rekombinanten Gene.....	70
2.5.5. Proteinsequenzvergleich der Nfp-Monomere und MspA.....	73
2.5.6. Ausblick .....	73
<b>2.6. Referenzen.....</b>	<b>75</b>

<b>Kapitel 3 – Charakterisierung eines Streptomycin-bindenden sowie eines Fruktose-induzierten Porins aus <i>Streptomyces</i> Arten .....</b>	<b>78</b>
3.1. Zusammenfassung .....	78
3.2. Einleitung .....	79
3.3. Material und Methoden .....	81
3.3.1. Verwendete Stämme und Wachstumsbedingungen .....	81
3.3.2. Isolierung von porenformenden Proteinen ganzer Zellen .....	81
3.3.3. Anionenaustauschersäule (FPLC) .....	82
3.3.4. Ultrafiltration .....	83
3.3.5. Streptomycin-Sepharose-Säule .....	83
3.3.6. Proteinfällungen und SDS-PAGE .....	85
3.3.7. Proteinsequenzierung.....	86
3.3.8. Black-Lipid-Bilayer Methode.....	86
3.4. Ergebnisse .....	89
3.4.1. Streptomycin-bindendes Porin aus <i>S. coelicolor</i> , <i>S. griseus</i> und <i>S. lividans</i> .....	89
3.4.2. Fruktose-induziertes Porin aus <i>S. griseus</i> und <i>S. lividans</i> .....	95
3.4.3. Proteinfällungen und SDS-PAGE .....	97
3.4.4. Spannungsabhängigkeit der Streptomycin-bindenden Pore .....	98
3.5. Diskussion .....	100
3.5.1. Streptomycin-bindendes Porin aus <i>S. coelicolor</i> , <i>S. griseus</i> und <i>S. lividans</i> .....	100
3.5.2. Sequenzierung und Strukturanalyse der Streptomycin- bindenden Pore .....	101
3.5.3. Spannungsabhängigkeit der Streptomycin-bindenden Pore .....	102
3.5.4. Fruktose-induziertes Porin aus <i>S. griseus</i> und <i>S. lividans</i> .....	103
3.5.5. Ausblick .....	104
3.6. Referenzen.....	106

<b>Kapitel 4 – Aufreinigung und Stromfluktuationsanalyse des zucker-spezifischen Porins OmpS aus <i>Vibrio cholerae</i>.....</b>	<b>109</b>
<b>4.1. Zusammenfassung .....</b>	<b>109</b>
<b>4.2. Einleitung.....</b>	<b>111</b>
<b>4.3. Material und Methoden .....</b>	<b>113</b>
4.3.1. Verwendete Stämme und Wachstumsbedingungen .....	113
4.3.2. Expression und Aufreinigung von OmpS in <i>E. coli</i> .....	114
4.3.3. SDS-PAGE .....	115
4.3.4. Black-Lipid-Bilayer Methode.....	115
<b>4.4. Ergebnisse .....</b>	<b>119</b>
4.4.1. Induktion und Expression von OmpS in <i>E. coli</i> .....	119
4.4.2. Aufreinigung und SDS-PAGE von OmpS.....	119
4.4.3. Einzelkanal-Leitfähigkeit von OmpS.....	121
4.4.4. Selektivitätsbestimmung von OmpS .....	123
4.4.5. Titrationsen mit Maltosederivaten von OmpS .....	124
4.4.6. Stromfluktuationsanalyse von OmpS .....	128
4.4.7. Asymmetrischer Zuckertransport von OmpS .....	131
4.4.8. Proteinsequenzvergleich zwischen OmpS und LamB.....	132
<b>4.5. Diskussion .....</b>	<b>135</b>
4.5.1. Induktion und Expression von OmpS in <i>E. coli</i> .....	135
4.5.2. Aufreinigung und SDS-PAGE von OmpS.....	135
4.5.3. Vergleich der biophysikalischen Daten von OmpS und LamB .....	136
4.5.4. Trimernachweis von OmpS.....	139
4.5.5. Asymmetrischer Zuckertransport von OmpS .....	140
4.5.6. Proteinsequenzvergleich zwischen OmpS und LamB.....	141
4.5.7. Proteinsequenzvergleich zwischen OmpS und ScrY .....	143
4.5.8. Ausblick .....	144
<b>4.6. Referenzen.....</b>	<b>145</b>

<b>Kapitel 5 – Anhang</b> .....	148
<b>5.1. Lebenslauf</b> .....	148
<b>5.2. Danksagung</b> .....	149

## Zusammenfassung

---

---

Die vorliegende Dissertation beschreibt detaillierte biochemische und biophysikalische Untersuchungen von rekombinanten Porinen aus den beiden pathogenen Bakterien *Nocardia farcinica* und *Vibrio cholerae* sowie von nativen Porinen aus drei *Streptomyces* Arten.

Für die beiden pathogenen Vertreter sind bereits impermeable Zellwandstrukturen beschrieben worden (Daffe *et al.*, 1993; Rodriguez-Torres *et al.*, 1993). Für *Streptomyces* Arten ist keine vergleichbare, definierte äußere Zellwandbarriere bekannt. Im Fall von *S. griseus* konnten dennoch undefinierte, kovalente Lipidverknüpfungen mit der Peptidoglykanschicht nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 2001). Daher besteht die Notwendigkeit des Transports von Nährstoffen und anderer Moleküle auch bei *Streptomyces* Arten durch porenformende Proteine, so genannte Porine. Unter Porinen versteht man wassergefüllte Kanäle, die in zwei Klassen unterteilt werden können: allgemeine Diffusionsporen und substratspezifische Porine. Allgemeine Diffusionsporen filtern entsprechend der molekularen Masse der gelösten Substrate und weisen ein lineares Verhältnis zwischen Translokationsrate und Substratkonzentrationsgradient auf. Dagegen kann der Transport bestimmter Substanzen durch spezifische Porine mit einer Substrat-Bindestelle im Kanal durch die Michaelis-Menten-ähnliche Kinetik beschrieben werden. Diese Kanäle ermöglichen den schnellen Influx bestimmter Klassen von Substraten.

Die Gattung *Nocardia* umfasst strikt aerob lebende, stäbchenförmige Gram-positive Bakterien, die zur Familie der *Nocardiaceae* innerhalb der Unterordnung *Corynebacterineae* gezählt werden. Einer aktuellen Studie zur Folge ist *Nocardia farcinica* der am häufigsten isolierte Stamm aus der Familie *Nocardiaceae* und wurde in Japan als Erreger der Nocardiose klassifiziert (<http://nocardia.nih.go.jp/>; Beaman *et al.*, 1992; Muñoz *et al.*, 2007). Unter Nocardiose versteht man laut Definition „eine nicht selten akute oder chronische abszedierende Entzündung der Lunge, des Gehirns oder der Haut“ (Tsukamura und Ohta, 1980; Beaman, 1992; Schmoekel, 1996). Die Sequenz des Genoms von *N. farcinica* IFM 10152 ist seit 2004 bekannt (Ishikawa *et al.*, 2004). In den Arbeiten von Rieß *et al.* (1998) konnte ein dimeres Porin aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) identifiziert werden, das einer partiellen Sequenzanalyse nach Edman unterzogen wurde. Die Sequenzanalyse des Porins aus *N. farcinica* ergab insgesamt drei verschiedene Teilsequenzen. Innerhalb von **Kapitel 2** dieser Arbeit konnten durch eine BLAST-Suche (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) sechs hypothetische Proteine aus *N. farcinica* IFM 10152 identifiziert werden, die allesamt Homologien zu MspA (*Mycobacterium smegmatis porin A*), einem bekannten Porin, aufweisen. Zudem besitzen sie Signalpeptide, welche sie als Proteine der äußeren Membran charakterisieren

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) und die obligatorisch für Proteine sind, die über den *Sec* Apparat transportiert werden (Freudl, 1992). Diese Proteine sind im einzelnen Nfa15890, Nfa15900, Nfa33390, Nfa33400, Nfa49580 und Nfa49590. Jeweils zwei der zu diesen Proteinen zugehörigen Gene liegen direkt hintereinander im Chromosom von *N. farcinica* IFM 10152. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die beiden Gene *nfa15890* und *nfa15900* jeweils mithilfe des Vektors pARAJ2 rekombinant in *E. coli* BL21DE3Omp8 exprimiert und über eine Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Die beiden rekombinant exprimierten Proteine Nfa15890 und Nfa15900 zeigten die stärksten Homologien zu allen generierten Teilssequenzen und wurden im folgenden als NfpA<sub>NH<sub>2</sub></sub> und NfpB<sub>NH<sub>2</sub></sub> (*Nocardia farcinica porin A und B N-terminal Histidin-tag*) bezeichnet. Biophysikalische Untersuchungen zeigten, dass die beiden in *E. coli* exprimierten Proteine NfpA<sub>NH<sub>2</sub></sub> und NfpB<sub>NH<sub>2</sub></sub> nur *zusammen* einen Kanal in der Lipiddoppelschicht bilden können. Demnach wird das Porin aus *N. farcinica* als Hetero-Oligomer gebildet. Insbesondere nach denaturierender Reinigung und anschließender Renaturierung in die aktive Konformation kann für das Hetero-Oligomer ein zu MspA strukturell verwandter Kanal postuliert werden.

*Streptomyces* sind Gram-positive Bakterien, die in Wäldern große ökologische Bedeutung besitzen können (Nkanga und Hagedorn, 1978). Durch ihre spezielle Wachstumsform bilden sie dort im Boden ein verzweigtes Netzwerk, das Mycel. Große Bedeutung haben sie insbesondere in der Industrie erlangt, da sie die Hauptproduzenten vieler Antibiotika und Enzyme sind. *Streptomyces* Arten bilden 60% aller bekannter, mikrobiell synthetisierter Antibiotika wie Streptomycin, Anthracyclin, Erythromycin, verschiedener Tetracycline und Makrolide (Kieser *et al.*, 2000). Kim *et al.* (2001) konnten in *Streptomyces griseus* ein Streptomycin-bindendes Porin (0,8 nS in 1 M KCl) außerhalb der Cytoplasmamembran nachweisen. Das Streptomycin-bindende Porin wurde zudem in *S. coelicolor* und *S. lividans* bestätigt (Dörner, 2004 *Dissertation*; Klug, 2005 *Diplomarbeit*). In **Kapitel 3** konnte für diese 0,8 nS Pore eine Spannungsabhängigkeit, sowie eine gerichtete Membran-Insertion nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal ein Fruktose-induziertes Protein in *S. griseus* (2,1 nS in 1 M KCl) identifiziert werden. Eine Fruktose-induzierte Pore war bis dato nur in *S. lividans* beschrieben worden (Dörner, 2004 *Dissertation*). Die Kanalgröße der Fruktose-induzierten Pore bildet eine Diffusionspore und ist daher unspezifisch für Substrate. Weiterhin konnte die Fruktose-induzierte Pore einwandfrei von der Streptomycin-bindenden Pore aufgrund der unterschiedlichen biochemischen Ladungseigenschaften im Kanal mithilfe der FPLC (fast protein liquid chromatography) getrennt werden. Die Fruktose-induzierte Pore war bereits im basischen Bereich (pH 10,5) ungeladen, die Streptomycin-bindende Pore hingegen erst im neutralen Bereich (pH 7,5).

*Vibrio cholerae* ist ein Gram-negatives, fakultativ aerobes Stäbchenbakterium mit aquatischer Lebensweise in Süßwasserhabitaten. *Vibrio cholerae* ist der Erreger der Cholera (Turnbull *et al.*, 1985). Diese potentiell tödliche Krankheit tritt vor allem in Gebieten als Epidemie auf, in denen schlechte hygienische Zustände vorliegen und wird daher oft nach Katastrophen ausgelöst (Glass *et al.*, 1991). Die Symptome äußern sich in Form einer ernsthaften Diarrhoe, die zum Elektrolytverlust und einer Dehydrierung des Körpers führt (Abuaita und Withey, 2009). Ohne eine medizinische Versorgung, tritt der Tod bereits nach kurzer Zeit ein. Das OmpS-Porin (**O**uter **m**embrane **p**rotein **S**ugar) steht im Zusammenhang mit dem Maltosetransport und wurde bereits als wachstumsphasenabhängiges Porin in der äußeren Membran von *Vibrio cholerae* beschrieben (Lang und Palva, 1993). OmpS zeigt eine starke Homologie zum Maltoporin LamB aus *Escherichia coli* (30% Identität), sowie zum Sucroseporin ScrY, aus enterischen Gram-negativen Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* (bis zu 20% Identität). Sowohl für LamB (Benz *et al.*, 1986; 1987; Andersen *et al.*, 1995), als auch für ScrY (Andersen *et al.*, 1998) wurden bereits die Bindekonstanten für verschiedene Zucker untersucht. In **Kapitel 4** dieser Arbeit wurde die Aufreinigung von rekombinantem OmpS optimiert, so dass mithilfe eines Amylose-Resin-Batches aus cytoplasmatischen Extrakten detektierbare Proteinkonzentrationen des aufgereinigten monomeren OmpS im SDS-Gel erhalten werden konnten. Das aufgereinigte Protein wurde anschließend mithilfe der Black-Lipid-Bilayer Methode hinsichtlich seiner biophysikalischen Eigenschaften charakterisiert und die generierten biophysikalischen Daten denen von LamB gegenübergestellt. Darüber hinaus konnte nach dem Vergleich der beiden Sekundärstrukturen von OmpS und LamB unter der Berücksichtigung der Tertiärstruktur von LamB (Schirmer *et al.*, 1995) eine strukturelle Verwandtschaft festgestellt werden.

Erkenntnisse aus dieser Arbeit leisten einen großen Beitrag zur Aufklärung der Nährstoffaufnahme über Außenmembranen dieser biotechnologisch interessanten Bakterienarten. Dennoch müssen weitere Untersuchungen wie genetische Manipulationen, Wachstumsanalysen und Röntgenstrukturauflösungen von Proteinkristallen durchgeführt werden, um die Strukturen und die Funktionen der untersuchten Porine in allen Einzelheiten zu verstehen. Ein fundiertes Wissen über oberflächenexponierte Proteine -wie Porine- ist Voraussetzung für die Herstellung erfolgreicher Therapeutika gegen die beiden untersuchten pathogenen Stämme *Nocardia farcinica* und *Vibrio cholerae*.

---

---

## Summary

---

---

This thesis describes detailed biochemical and biophysical investigations of recombinant porins of both pathogenic bacteria *Nocardia farcinica* and *Vibrio cholerae* besides native porins of three *Streptomyces* strains.

For both pathogenic strains used in this work impermeable cell-wall structures have already been described (Daffe *et al.*, 1993; Rodriguez-Torres *et al.*, 1993). However, there is little known about cell-wall composition in *Streptomyces* strains yet. It was shown that *Streptomyces griseus* contains lipids that are covalently linked to the peptidoglycan layer (Kim *et al.*, 2001). Therefore it is conceivable that the transport of nutrients and other molecules across the outer membrane of *Streptomyces* strains is also enabled by pore-forming proteins, so called porins. Porins are water-filled channels which can be subdivided into two different classes, general diffusion pores and substrate-specific porins. General diffusion pores sort mainly according to the molecular mass of the solutes and show a linear relation between translocation rate and solute concentration gradient. Specific porins with a substrate-binding site inside the channel exhibit Michaelis-Menten-like kinetics for the transport of certain solutes and are responsible for the rapid uptake of different classes of solutes.

*Nocardia* is a genus of Gram-positive, strictly aerobic rod-shaped bacteria belonging to the family *Nocardiaceae* of the suborder *Corynebacterineae*. *Nocardia farcinica* is the most frequently isolated species of *Nocardiaceae* in Japan and represents the main causative organism for nocardiosis (<http://nocardia.nih.go.jp/>; Beaman *et al.*, 1992; Muñoz *et al.*, 2007). Pulmonary nocardiosis, systemic nocardiosis and local extrapulmonary infections intensely characterize the clinical symptoms which can be caused by pathogenic *Nocardia* strains (Tsukamura and Ohta, 1980; Beaman, 1992; Schmoekel, 1996). The genome sequence of *N. farcinica* IFM 10152 was solved in 2004 (Ishikawa *et al.*, 2004). Rieß *et al.* (1998) identified a dimeric channel-forming protein in the cell-wall of *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318). The purified protein was partially sequenced by N-terminal Edman degradation procedure. The results of the amino acid analysis of the N-terminal end of the *N. farcinica* cell-wall channel revealed three different partial peptide sequences. BLAST analyzes (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) identified six hypothetical proteins coded by genes of *N. farcinica* IFM 10152 (Ishikawa *et al.*, 2004). They all revealed a certain homology to the well-known, channel-forming protein MspA (*Mycobacterium smegmatis* **p**orin **A**) of *M. smegmatis*. In **chapter 2**, computational analyses of the six hypothetical proteins (Nfa15890, Nfa15900, Nfa33390, Nfa33400, Nfa49580 and Nfa49590) suggested putative signal peptides

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) at the N-termini of the proteins, obligatory for proteins that are exported by the *Sec* apparatus (Freudl, 1992). Two of these genes (*nfa15890* and *nfa15900*) were separately expressed in the *E. coli* BL21DE3Omp8 strain containing an N-terminal His<sub>10</sub>-tag. The proteins were purified to homogeneity using immobilized metal affinity chromatography and designated NfpA<sub>NHis</sub> and NfpB<sub>NHis</sub>, for *Nocardia farcinica* **porin A and B N-terminal Histidin-tag**. The two proteins were checked for channel formation in lipid bilayers. The results indicated that the proteins NfpA<sub>NHis</sub> and NfpB<sub>NHis</sub> expressed in *E. coli* were only *together* able to form channels in lipid bilayer membranes. This means that the cell-wall channel of *N. farcinica* is formed by a hetero-oligomer. Nfa15890 and Nfa15900 form a channel that may structurally be related to MspA porin of *Mycobacterium smegmatis* after a denaturation and renaturation procedure.

The genus *Streptomyces* belongs to the Gram-positive actinomycetes, which can participate in an ecological system (e.g., forest) (Nkanga and Hagedorn 1978). Thus, the complex cell cycle of *Streptomyces* species can lead to the development of a branching vegetative mycelium in soil. In particular, there exists interest in certain *Streptomyces* species, because of their ability to produce 60% of total microbial synthetic antibiotics, such as streptomycin, anthracycline, erythromycin, diverse tetracyclines, and macrolides (Kieser *et al.*, 2000). Interestingly, Kim *et al.* (2001) identified a channel in the cell-wall of *S. griseus* with a single-channel conductance of about 0.8 nS in 1 M KCl. This porin contains a binding site for streptomycin. This channel-forming protein was also found in *S. coelicolor* and *S. lividans* (Dörner, 2004 *dissertation*; Klug, 2005 *diploma thesis*). In **chapter 3**, it was shown that this 0.8 nS pore shows a voltage-dependence and a directed membrane insertion. Moreover, the first fructose-induced porin has been identified in *S. griseus*. So far, a fructose-induced porin was only described in *S. lividans* (Dörner, 2004 *dissertation*). The channel size of 2.1 nS favours a general diffusion pore which is unspecific for any substrate. The fructose-induced porin was separated from streptomycin-binding porin using **fast protein liquid chromatography**. Both pore-forming proteins exhibit different charges inside their channels. The fructose-induced porin displayed an isoelectric point of pH 10.5, whereas the streptomycin-binding porin held an isoelectric point of pH 7.5.

*Vibrio cholerae* is a Gram-negative, facultative aerobic, rod-shaped bacteria with an aquatic mode of living in fresh-water. *Vibrio cholerae* elicits cholera (Turnbull *et al.*, 1985). This potentially lethal disease often assumes epidemic dimensions after catastrophes or under unhygienic conditions (Glass *et al.*, 1991). The symptoms include intense diarrhoea which results in the loss of electrolytes and dehydration (Abuaita and Withey, 2009). Without medical treatment, death can occur after a short period of time. OmpS (**O**uter **m**embrane **p**rotein **S**ugar) is a growthphase dependent porin of *Vibrio cholerae*, which is responsible for the uptake of maltose derivatives

(Lang and Palva, 1993). The amino acid sequence of OmpS is similar to that of LamB, the *Escherichia coli* maltoporin (30% identity), and to sucroseporin ScrY of enteric, Gram-negative bacteria *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (up to 20% identity). The binding parameters of different sugars have already been described for LamB (Benz *et al.*, 1986; 1987; Andersen *et al.*, 1995) and ScrY (Andersen *et al.*, 1998). **Chapter 4** introduces a new method, the amylose-resin-batch with cytoplasmatic extracts, to achieve detectable protein concentration rates in SDS-gel during purification of OmpS in *E. coli* cells. Purified OmpS has been characterized using the black lipid bilayer technique and biophysical data were compared to those which have been generated for LamB. Additionally, by comparison of the secondary structure of both OmpS and LamB considering the tertiary structure of LamB (Schirmer *et al.*, 1995) revealed structural similarity of those proteins.

These findings represent an important step towards the understanding of outer membrane pathways for nutrient uptake of these biotechnological important species. Further studies, including genetic manipulations, growth experiments and X-ray analyses of protein crystals remain to be done to understand the structure and functionality of these porins introduced here in detail. A profound knowledge of surface-exposed proteins, such as porins, is one precondition for drug design against diseases caused by *Nocardia farcinica* and *Vibrio cholerae*.

- Abuaita, B. H. & J. H. Withey, (2009) Bicarbonate induces *Vibrio cholerae* virulence gene expression by enhancing ToxT activity. *Infect Immun.*
- Andersen, C., M. Jordy & R. Benz, (1995) Evaluation of the rate constants of sugar transport through maltoporin (LamB) of *Escherichia coli* from the sugar-induced current noise. *J Gen Physiol* **105**: 385-401.
- Andersen, C., R. Cseh, K. Schülein & R. Benz, (1998) Study of sugar binding to the sucrose-specific ScrY channel of enteric bacteria using current noise analysis. *J Membr Biol* **164**: 263-274.
- Beaman, B. L., (1992) *Nocardia* as a pathogen of the brain: mechanisms of interactions in the murine brain--a review. *Gene* **115**: 213-217.
- Beaman, B. L., P. Boiron, L. Beaman, G. H. Brownell, K. Schaal & M. E. Gombert, (1992) *Nocardia* and nocardiosis. *J Med Vet Mycol* **30**: 317-331.
- Benz, R., A. Schmid, T. Nakae & G. H. Vos-Scheperkeuter, (1986) Pore formation by LamB of *Escherichia coli* in lipid bilayer membranes. *J Bacteriol* **165**: 978-986.
- Benz, R., A. Schmid & G. H. Vos-Scheperkeuter, (1987) Mechanism of sugar transport through the sugar-specific LamB channel of *Escherichia coli* outer membrane. *J Membr Biol* **100**: 21-29.
- Daffe, M., M. McNeil & P. J. Brennan, (1993) Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp. *Carbohydr Res* **249**: 383-398.
- Dörner, U., (2004) Lipids and Porins in the Cell Wall of Actinomycetes. *Dissertation.*
- Freudl, R., (1992) Protein secretion in gram-positive bacteria. *J Biotechnol* **23**: 231-240.
- Glass, R. I., M. Claeson, P. A. Blake, R. J. Waldman & N. F. Pierce, (1991) Cholera in Africa: lessons on transmission and control for Latin America. *Lancet* **338**: 791-795.
- Ishikawa, J., A. Yamashita, Y. Mikami, Y. Hoshino, H. Kurita, K. Hotta, T. Shiba & M. Hattori, (2004) The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 14925-14930.
- Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, & D.A. Hopwood, (2000) Practical *Streptomyces* genetics. *The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom*: Buch.
- Kim, B. H., C. Andersen & R. Benz, (2001) Identification of a cell wall channel of *Streptomyces griseus*: the channel contains a binding site for streptomycin. *Mol Microbiol* **41**: 665-673.
- Klug, M., (2005) Untersuchung der wachstumsabhängigen Porinexpression in *Streptomyces*. *Diplomarbeit.*

- Lang, H. & E. T. Palva, (1993) The ompS gene of *Vibrio cholerae* encodes a growth-phase-dependent maltoporin. *Mol Microbiol* **10**: 891-901.
- Munoz, J., B. Mirelis, L. M. Aragon, N. Gutierrez, F. Sanchez, M. Espanol, O. Esparcia, M. Gurgui, P. Domingo & P. Coll, (2007) Clinical and microbiological features of nocardiosis 1997-2003. *J Med Microbiol* **56**: 545-550.
- Nkanga, E. J. & C. Hagedorn, (1978) Detection of antibiotic-producing *Streptomyces* inhabiting forest soils. *Antimicrob Agents Chemother* **14**: 51-59.
- Rieß, F. G., T. Lichtinger, R. Cseh, A. F. Yassin, K. P. Schaal & R. Benz, (1998) The cell wall porin of *Nocardia farcinica*: biochemical identification of the channel-forming protein and biophysical characterization of the channel properties. *Mol Microbiol* **29**: 139-150.
- Rodriguez-Torres, A., M. C. Ramos-Sanchez, A. Orduna-Domingo, F. J. Martin-Gil & J. Martin-Gil, (1993) Differential scanning calorimetry investigations on LPS and free lipids A of the bacterial cell wall. *Res Microbiol* **144**: 729-740.
- Schirmer, T., T. A. Keller, Y. F. Wang & J. P. Rosenbusch, (1995) Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**: 512-514.
- Schmoekel, C., (1996) Lexikon der Differentialdiagnose und der klinischen Dermatologie, 2. aktualisierte und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Tsukamura, M. & M. Ohta, (1980) *Nocardia farcinica* as a pathogen of lung infection. *Microbiol Immunol* **24**: 237-241.
- Turnbull, P. C., J. V. Lee, M. D. Miliotis, C. S. Still, M. Isaacson & Q. S. Ahmad, (1985) In vitro and in vivo cholera toxin production by classical and El Tor isolates of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol* **21**: 884-89

## **1.1. Bakterielle Zellhülle**

Die Zellhülle grenzt die bakterielle Zelle als physikalische Barriere gegen das Außenmedium ab und dient dadurch der Aufrechterhaltung eines lebenswichtigen hypotonischen Milieus. Dadurch hat die Zellhülle Anteil an nahezu sämtlichen wichtigen Vorgängen der Zelle, wie Energie-Konversion, Stofftransport, Wachstum und Vermehrung. Die Zellhülle besteht im Allgemeinen aus der das Zellinnere umgebenden Cytoplasmamembran und der dem äußeren Milieu zugewandten Zellwand.

## **1.2. Cytoplasmamembran**

### **1.2.1. Amphiphatische Lipide**

Die Cytoplasmamembranen von Tieren, Pflanzen und Bakterien sind sich sehr ähnlich, weswegen man von einer Elementarmembran mit einheitlichem Aufbau spricht. Diese stellt eine etwa 6 – 10 nm dicke Doppellamelle amphiphatischer Lipide mit eingelagerten Proteinen dar, welche durch nicht kovalente Wechselwirkungen zusammen gehalten werden. Da sich der äußere und der innere Monolayer durch Zusammensetzung ihrer Lipide und Orientierung ihrer Proteine unterscheiden, spricht man von einer asymmetrischen Membran. Aufgrund ihrer hydrophoben Struktur wirkt die Cytoplasmamembran als selektive Permeabilitätsbarriere, welche vor allem hydrophile und große geladene Moleküle abhält. Die verschiedenen Transportmechanismen, anhand welcher Moleküle die Membran passieren können, sind Diffusion und der Transport über integrale Membranproteine. Bei letzterem wird aktiver Transport, welcher zelluläre Stoffwechselenergie benötigt, von passivem Transport, welcher von Stoffwechselenergie unabhängig ist, unterschieden. Während der passive Transport hauptsächlich dem Transport von Salzen und, über daraus resultierende osmotische Effekte, dem Transport von Wasser dient, werden über den aktiven Transport hauptsächlich große polare Moleküle wie organische Säuren oder Aminosäuren transportiert. Transportproteine werden ebenfalls anhand ihres Energiebedarfs in die beim aktiven Transport beteiligten Carrier oder Pumpen und die beim passiven Transport beteiligten Kanäle unterschieden. Membranlipide sind größtenteils Phospho- und Glykolipide. Durch ihren amphiphilen Charakter, den Besitz einer hydrophoben

und einer hydrophilen Region, lagern sie sich in einer hydrophilen Umgebung spontan zusammen. Die dabei wirkenden Kräfte sind Van-der-Waals-Kräfte im hydrophoben Bereich und elektrostatische Bindungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen im hydrophilen Bereich.

### **1.2.2. Cytoplasmamembran-Proteine**

Proteine sind ein wichtiger Bestandteil aller biologischen Membranen, da durch sie besondere Membranfunktionen wie Transport (Carrier und Kanäle), Kommunikation (Rezeptoren) oder Energie-Konversion ausgeübt werden (Evans und Graham, 1991). Membranproteine werden in fünf unterschiedliche Klassen eingeteilt:

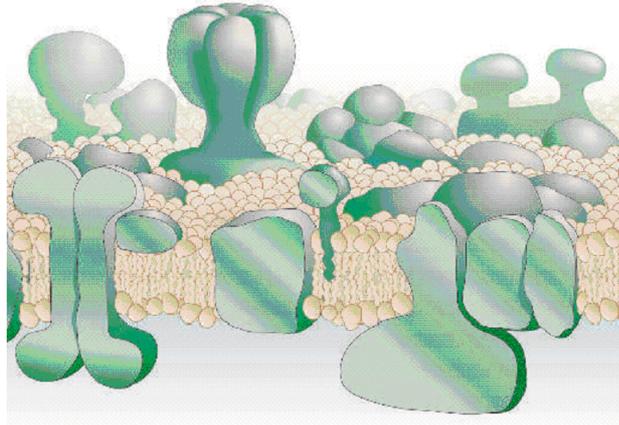
- Klasse I: Periphere über ionische Kräfte gebundene Proteine
- Klasse II: Proteine mit hydrophoben Peptid-Anker
- Klasse III: Transmembranproteine mit einer integralen Proteindomäne
- Klasse IV: Transmembranproteine mit mehreren integralen Proteindomänen
- Klasse V: Periphere über einen Glykolipid-Anker kovalent gebundene Proteine

### **1.2.3. Fluid-Mosaic-Modell**

S. Jonathan Singer und Garth Nicolson entwarfen 1972 das bis heute gültige Modell zur Organisation biologischer Membranen (Singer und Nicolson, 1972). Dieses besagt, dass Membranen zweidimensionale Lösungen gerichteter Proteine und Lipide darstellen, die folgende Charakteristika aufweisen:

1. Die meisten Phospholipid- und Glykolipidmoleküle der Membran liegen als bimolekulare Schicht vor. Diese Lipiddoppelschicht hat folgende Funktionen: Sie ist einerseits das Lösungsmittel für wichtige Membranproteine und zum anderen Permeabilitätsbarriere.
2. Ein kleiner Teil der Membranlipide arbeitet spezifisch mit bestimmten Membranproteinen zusammen und ist möglicherweise für deren Funktion verantwortlich.
3. Membranproteine können ungehindert lateral in der Lipidmatrix diffundieren, es sei denn, dies wird durch gezielte Vorgänge unterbunden. Dagegen können sie die Membran nicht von einer Oberfläche in Richtung zur anderen durchqueren.

4. Die Membranfluidität wird durch die Zusammensetzung der verschiedenen Lipide, deren molekularen Struktureigenschaften (z. B. Kettenlänge, Grad der Sättigung) und der Temperatur beeinflusst.
5. Transversale Diffusion (Flip-Flop) ist für Proteine gar nicht und für Lipide selten möglich (Stryer, 1996).



**Abb.1.1.** Fluid-Mosaic-Modell biologischer Membranen, verändert nach Engelman (Engelman, 2005).

Nach neueren Ergebnissen ist die Membran jedoch weniger fluid als gedacht. So gibt es strukturell und funktionell distinkte Bereiche, die sich in ihrer Dicke und Zusammensetzung der Lipide unterscheiden (Engelman, 2005).

### **1.3. Zellwand**

Prokaryoten lassen sich in die zwei großen Gruppen Archaea und Eubakterien einteilen, von welchen letztere anhand ihrer Zellwandstruktur in die drei Kategorien Gram-positive, Gram-negative und zellwandlose Mycoplasmen unterschieden werden (Holt *et al.*, 1994). Die ersten beiden Gruppen besitzen eine Zellwand, anhand welcher sie über die auf Hans Christian Gram zurück gehende Gramfärbung differenziert werden können. Die elastische Zellwand der Bakterien verleiht der Zelle entsprechend dem anliegenden osmotischen Innendruck (ca. 3,5 bar) ihre Form. Im Gegensatz zur Cytoplasmamembran, die als osmotische Schranke fungiert, ist die Zellwand für Salze und zahlreiche niedermolekulare Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 100 kDa durchlässig (Nikaido, 1994). Das Grundgerüst der bakteriellen Zellwand besteht aus Peptidoglykan (Murein).

### **1.3.1. Murein**

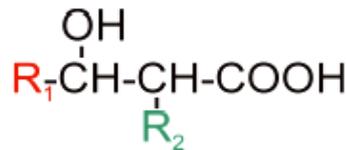
Das Murein-Rückgrat wird aus einer heteropolymeren, geraden und unverzweigten Kette gebildet, in welcher N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure in alternierender Folge durch  $\beta$ -glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. N-Acetylmuraminsäure ist ein Milchsäureether des N-Acetylglucosamins. Die Muraminsäureglieder sind über Lactylgruppen mit Tetrapeptiden verknüpft, welche als Verbindungseinheit zwischen den verschiedenen Mureinsäureketten dienen (Schlegel, 1992). Dadurch werden die heteropolymeren Ketten zu einem sackförmigen Riesenmolekül, dem Mureinsacculus, verbunden. Dieser fungiert als Stützskelett der Zellwand und ist von einer Reihe anderer Substanzen durchsetzt und belegt. Da die Mureinhülle den Bakterienprotoplasten gegen den osmotischen Binnendruck zusammenhält, muss das Mureinnetz beim Wachstum des Bakteriums, ohne Entstehen größerer Lücken, erweitert werden. Zu diesem Zweck werden durch bestimmte lytische Enzyme Bindungen des Mureins lokal begrenzt gelöst. Die Mureinbausteine werden im Cytoplasma synthetisiert, mit Hilfe des Enzyms Bactoprenol exportiert (Brock *et al.*, 2002) und durch spezifische Enzyme an den gelösten Bindungen ins Mureinnetz eingebaut. Dieser bakterienspezifische Apparat dient als Target verschiedener Antibiotika.

### **1.3.2. Zellwand der Gram-positiven Bakterien**

Der Mureinsacculus Gram-positive Bakterien besteht aus 40 oder mehr Schichten Murein. Häufig vorkommende Mureinsäuren sind LL-Diaminopimellinsäure und Lysin. Die Tetrapeptidseitenketten der Muraminsäure können über Interpeptidketten mit-einander verbunden sein, wobei die beteiligten Aminosäuren artspezifisch sind. Charakteristisch ist das Auftreten amidartiger, über Phosphat mit dem Murein verknüpfter Teichonsäuren. Diese bestehen aus Ketten von 8 – 50 Glycerin- oder Ribitolmolekülen, welche über Phosphatbrücken verestert sind. Ein schematischer Aufbau der Gram-positiven Zellwand ist in Abbildung 1.5. dargestellt.

### 1.3.3. Äußere Membran (Sonderform: Mycolata)

An das Peptidoglykan ist bei den Mycolata eine Polysaccharidschicht aus Arabinogalacton durch Phosphodiesterbrücken kovalent gebunden. Diese ist aus D-Arabinosyl- und D-Galactosylresten zusammengesetzt. An die OH-Gruppe der Arabinose sind über Esterbindungen Mycolsäuren gebunden. Mycolsäuren sind lange  $\alpha$ -verzweigte  $\beta$ -hydroxylierte Fettsäuren (Goodfellow *et al.*, 1976; Goodfellow und Orchard, 1974; Minnikin, 1982; Chun *et al.*, 1996) mit folgender Grundstruktur (siehe Abb.1.2.).

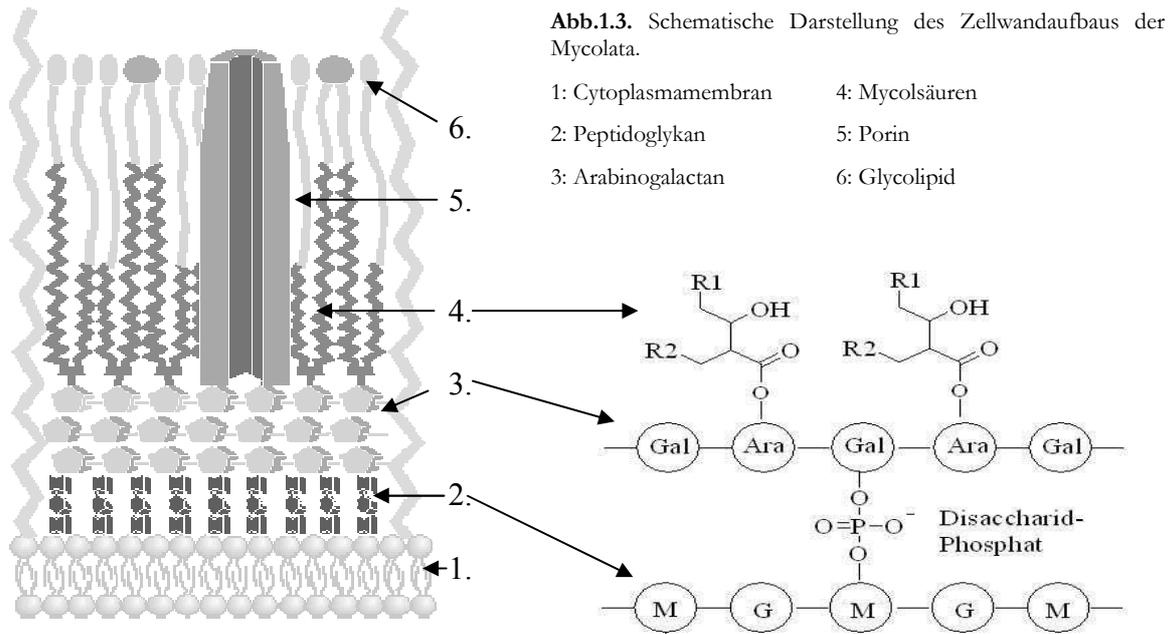


**Abb.1.2.** Grundstruktur von Mycolsäuren. Die Substituenten R1 und R2 sind langkettige aliphatische Kohlenwasserstoffe, deren Länge von Spezies zu Spezies variieren.

Sie besitzen eine Länge von 60 – 90 Kohlenstoffatomen (Minnikin und O'Donnel, 1984) und werden anhand ihrer Länge in vier Klassen eingeteilt (siehe Tab. 1.1). Die Mycolsäuren sind senkrecht zur Cytoplasmamembran angeordnet und bilden zusammen mit mycolsäurehaltigen Glykolipiden (vor allem Lipoarabinomannan), nicht kovalent gebundenen Proteinen und verschiedenen Peptiden die äußere Permeabilitätsbarriere (Hui *et al.*, 1977; Jarlier *et al.*, 1991; Brennan und Nikaido, 1995; Liu *et al.*, 1996). Die Mycolsäuren sind durch Esterbindungen an den Zucker Trehalose mit den Glykolipiden verankert (siehe Abb. 1.3.). Die Länge der Mycolsäuren ist gattungsspezifisch und dient als wichtiges taxonomisches Merkmal. Die Glykolipide haben keine zunächst vermutete Füllfunktion, sondern eher eine dynamische Aufgabe. Es wird angenommen, dass sie als Transporter für die Mycolsäuren vom Ort ihrer Biosynthese zum Arabinogalactan dienen könnten (Belisle *et al.*, 1997; Daffe und Draper, 1998).

**Tab.1.1.** Mycolsäurekettenlängen bei den Mycolata

Klasse	Kettenlänge [Anzahl C-Atome]		Vorkommen	Referenz
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>		
M	43 - 62	20 – 24	<i>Mycobacterium</i>	(Minnikin, 1982)
N	32 - 39	10 – 16	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> (einige)	(Tomiyasu, 1982)
R	13 - 25	10 – 16	<i>Rhodococcus</i>	(Minnikin, 1976)
C	11 - 17	10 – 16	<i>Corynebacterium</i> , <i>Rhodococcus</i>	(Herrera-Alcaez, 1993)

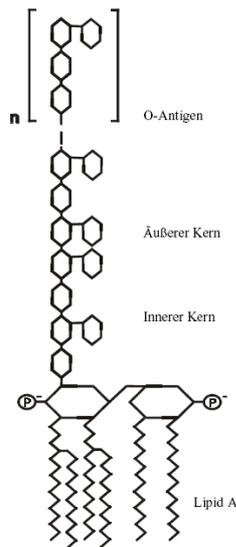


### 1.3.4. Zellwand der Gram-negativen Bakterien

Das Mureinnetz ist bei Gram-negativen Bakterien ein- bis maximal zweischichtig ausgebildet. Es besteht ausschließlich aus meso-Diaminopimellinsäure, enthält weder Lysin noch Teichonsäuren und Interpeptidbindungen treten ebenfalls nicht auf. An das Stützskelett schließt sich eine äußere Membran an, die der Cytoplasmamembran ähnelt. Zwischen äußerer Membran und Cytoplasmamembran wird ein weiteres Kompartiment, das so genannte Periplasma, gebildet. In diesem befinden sich katabolisch aktive Enzyme, Bindeproteine, die als Rezeptoren für chemische Reize dienen (Rosen, 1978) und beim Transport von Substraten ins Cytoplasma fungieren, sowie Schwermetalle oder Antibiotika unschädlich machende Depolymerasen z. B.  $\beta$ -Lactamase (Curtis *et al.*, 1972).

### 1.3.5. Äußere Membran (Gram-negative Bakterien)

Die äußere Membran stellt wie die Cytoplasmamembran ebenfalls eine Lipiddoppelschicht dar. Der innere Monolayer besteht hauptsächlich aus Phosphatidylethanolamin und eingelagerten Lipoproteinen, die als Anker zwischen der äußeren Membran und dem Peptidoglykan dienen. Der äußere Monolayer hingegen besteht hauptsächlich aus Lipopolysacchariden (LPS). Das LPS lässt sich von seiner Struktur her in drei Bereiche gliedern (siehe Abb. 1.4.).



1. Lipid A: Ein Diglucosaminphosphat-Dimer an dem fünf oder sechs Fettsäuren gebunden sind, die den äußeren Monolayer bilden. Es sorgt für die Lipideigenschaften des LPS.
2. Die Core-Pore: Eine konservierte Zusammen-setzung von Sacchariden, welche das O-Antigen mit dem Lipid A verknüpft.
3. Das O-Antigen: Eine variable Anzahl sich wiederholender Sequenzen aus vier bis fünf Hexosen und Didesoxyzuckern, deren Zusammensetzung sich zwischen verschiedenen Spezies und sogar zwischen verschiedenen Isolaten stark unterscheidet.

Abb.1.4. Schematischer Aufbau des Lipopolysaccharids (Knierim, 2000).

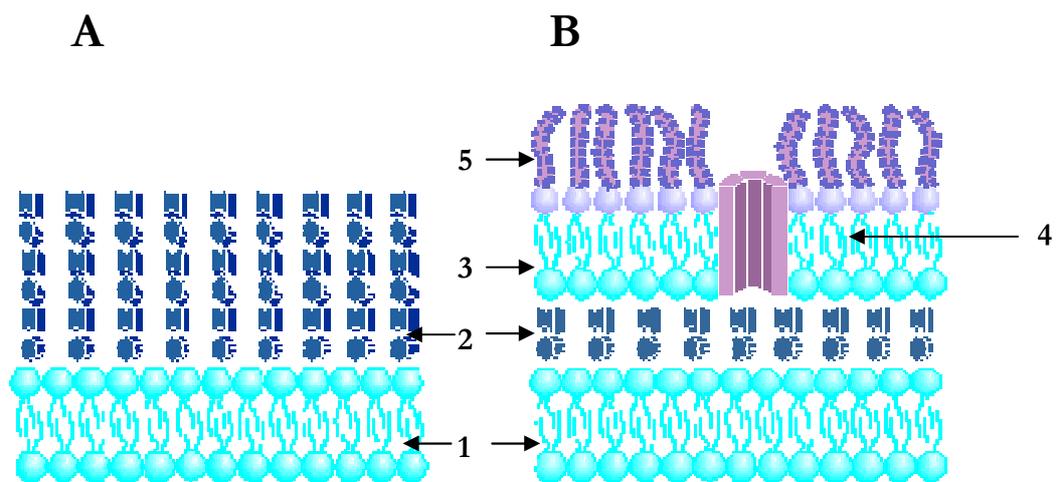


Abb.1.5. Vergleich der Zellwände von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. **A.** Zellwandaufbau der Gram-positiven Bakterien. **B.** Zellwandaufbau der Gram-negativen Bakterien. 1: Cytoplasmamembran, 2: Murein, 3: Äußere Membran, 4: Porin, 5: LPS.

## 1.4. Porine

### 1.4.1. Vorkommen und Aufbau

Wie bereits erwähnt, dient die äußere Membran als Permeabilitätsbarriere für hydrophile, große und geladene Substanzen. Diese Tatsache erfordert spezielle Strukturen, die den Transport von Ionen, Zuckern, Aminosäuren und ähnlichen Substanzen über diese Barriere ermöglichen. Obwohl diese Aufgabe auch hier von integralen Transmembranproteinen (Benz *et al.*, 1978; 1979; 1986; Benz und Bauer, 1988) erfüllt wird, unterscheiden sie sich deutlich im Aufbau von denen in der Cytoplasmamembran und werden als eigene Klasse betrachtet: Die Porine (Benz, 1985; Benz und Hancock, 1987a).

Bei den bislang untersuchten Porinen fand man gewisse strukturelle Parallelen. In der Regel sind Porine als Trimere organisiert. Diese sind aus drei identischen Untereinheiten (Monomeren) aufgebaut, die über Wasserstoff- und Salzbrücken miteinander verbunden sind (Angus und Hancock, 1983; Palva und Randall, 1978; Palva und Westermann, 1979). Die Trimere sind sehr stabil und zerfallen mehr oder weniger erst nach zehnminütigem Erhitzen bei +60°C in SDS-Puffer. Viele Porine sind über Ionenbrücken mit zweiwertigen Kationen an die Mureinschicht assoziiert. Wichtige Hinweise auf die tatsächliche Struktur von Porinen lieferte 1991 die Röntgenstrukturanalyse des Porins von *Rhodobacter capsulatus*, durch die die dreidimensionale Struktur aufgeklärt werden konnte (Weiss *et al.*, 1991; Weiss und Schulz, 1992). Cowan *et al.* konnten 1992 die Struktur der Porine OmpF und PhoE aufklären. Im Jahr 1993 gelang die Kristallisation und die Strukturaufklärung des Porins von *Rhodospseudomonas blastica* mithilfe der Röntgenstrukturanalyse (Kreusch *et al.*, 1994). Wichtig war auch die Aufklärung der Struktur des zuckerspezifischen LamB im Jahr 1995 durch Schirmer und seine Mitarbeiter. Dadurch war erstmals ein Strukturvergleich von allgemeinen Diffusionsporen und Porinen mit spezifischer Bindestelle möglich.

Alle diese Porine weisen folgende Gemeinsamkeiten auf: Die Monomere bilden separate Kanäle, die aus 16 bzw. bei LamB 18 amphiphilen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut sind. Die Kanäle besitzen eine zylinderartige Struktur und sind durch hydrophobe Wechselwirkungen in der Membran verankert. Die  $\beta$ -Faltblätter verlaufen antiparallel und stehen nicht senkrecht zur Membran, sondern sind um einen Winkel zwischen 30° – 60° geneigt. Sie sind miteinander über Wasserstoffbrücken verbunden. Die C- und N-Termini enden jeweils als  $\beta$ -Faltblätter und sind ebenfalls mit Wasserstoffbrücken untereinander verknüpft. Die  $\beta$ -Faltblätter sind durch Peptidschleifen (*engl.* Loops) miteinander verbunden.

Die acht Loops der extrazellulären Seite sind länger und enthalten teilweise  $\alpha$ -helikale Strukturen. Sie können z.T. in den Kanal hineinreichen. Einen wichtigen Einfluß auf die Eigenschaften der Pore hat der Loop L3 zwischen dem 5. und 6. Faltblatt, welcher in das Lumen des Kanals ragt und dessen Form und Größe verändert. Die sieben periplasmatischen Loops sind dagegen deutlich kleiner. Inwiefern all diese Strukturmerkmale auf andere Porine übertragbar sind, kann erst durch die Röntgenstrukturanalyse weiterer Porine mit Sicherheit geklärt werden. Man kann aber davon ausgehen, dass die oben beschriebenen Merkmale einen generellen Trend für die Struktur von Porinen wiedergeben.

Aufgrund der Permeabilitätseigenschaften der Porine trennt man diese in zwei Untergruppen auf (Benz und Bauer, 1988). Diese beiden Gruppen erfüllen unterschiedliche Aufgaben und besitzen verschiedene Transporteigenschaften (Abb. 1.6.).

### **1.4.2. Allgemeine Diffusionsporen**

Diese Porine dienen als molekulares Sieb. Sie sind wassergefüllte Poren, die Substanzen nur anhand ihrer Größe „filtern“. Die Permeabilität der Membran erhöhen sie somit für niedermolekulare Substanzen, Wasser und Ionen. Die Kinetik dieser Pore zeigt einen linearen Anstieg der Fließgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Somit wird immer mehr Substrat die Pore nach innen passieren, wenn man die Konzentration außen im Vergleich zur inneren Konzentration erhöht (Abb. 1.6.).

### **1.4.3. Substratspezifische Poren**

Zu dieser Gruppe gehören einerseits Porine mit einer spezifischen Substratbindestelle und andererseits Poren, die aufgrund von Ladungen im Inneren für eine bestimmte Ionensorte eine erhöhte Permeabilität aufweisen (Benz *et al.*, 1979). Diese Art von Porinen ermöglicht den gerichteten Transport ganz bestimmter Substanzen, in die oder aus der Zelle anhand spezieller Bindemotive. Dabei gibt es Porine die Zucker, Antibiotika oder Aminosäuren im allgemeinen binden und solche, die nur ganz spezifisch eine bestimmte Zuckersorte (Benz *et al.*, 1987b) binden. Die Spezifität der Bindungsstelle spielt hierbei für die Spezifität der Pore die größte Rolle. Die Kinetik dieser Poren ähnelt in ihrem Verhalten der für Enzyme gültigen Michaelis-Menten-Kinetik. Das bedeutet, dass der Transport schon bei geringen Substratkonzentrationen beginnt und sehr schnell mit der Substratkonzentration steigt, dann aber in eine Sättigung übergeht und schließlich auch bei weiterer Substratzugabe nicht mehr ansteigt. Mit anderen Worten wird hier eine Limitierung des Transports erreicht (Abb. 1.6.).

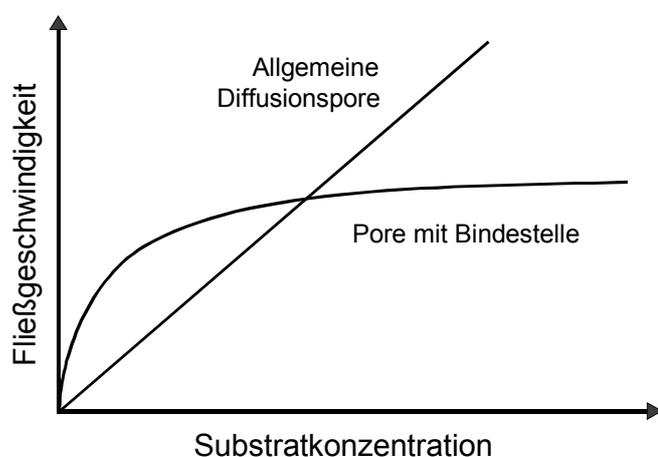


Abb. 1.6.

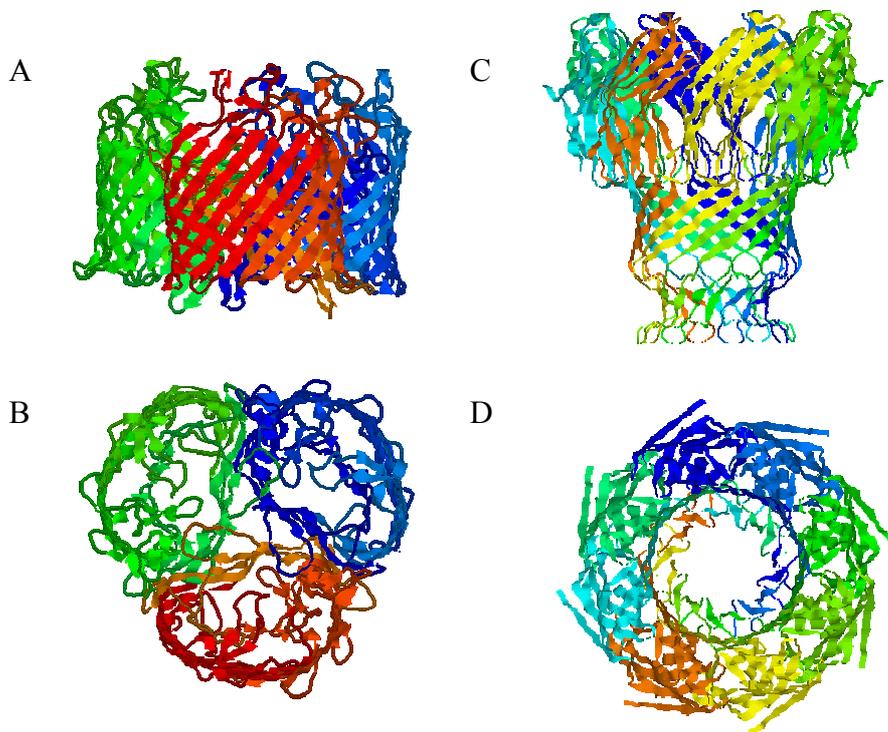
Vergleich der Fließgeschwindigkeiten eines Substrates durch eine allgemeine Diffusionspore und einer Pore mit Bindestelle für dieses Substrat.

#### 1.4.4. Kristallstrukturen von MspA und LamB

Bei Mycobakterien konnte durch eine rekombinante Expression das Gen *mspA* (*mycobacterium smegmatis* **porin A**) als porin codierendes Gen in *Mycobacterium smegmatis* identifiziert werden (Niederweis *et al.*, 1999). Weiterhin sind mit *mspB*, *mspC* und *mspD* drei weitere zu *mspA* homologe Gene im Genom von *M. smegmatis* beschrieben worden, und darüber hinaus konnten weitere zu *mspA* homologe Gene in anderen schnellwachsenden Mycobakterien identifiziert werden (Niederweis *et al.*, 1999; Stahl *et al.*, 2001). Bis heute bleibt die vollständig aufgeklärte Struktur von MspA das einzige Porinmodell innerhalb der Mycolata (Faller *et al.*, 2004). Die kelchähnliche Struktur von MspA (Abb. 1.7.C. bzw. Abb. 1.7.D.) wird aus acht homologen Monomeren gebildet (Homo-Oktamer) und weist eine einzige Durchgangsmöglichkeit auf.

Demgegenüber steht die bekannte Trimerstruktur von LamB (Abb. 1.7.A. bzw. Abb. 1.7.B.). Die Röntgenstrukturanalyse von LamB (ca. 48 kDa) ergab, dass die Monomere folgende Struktur aufweisen (Schirmer *et al.*, 1995): LamB-Monomere besitzen eine zylinderartige Form, die von 18  $\beta$ -Faltblättern (*engl.*  $\beta$ -barrels) gebildet wird (siehe Abb. 4.13.). Die dritte Peptidschleife (*engl.* Loop) L3 ist in den Kanal gefaltet. Der Kanal wird zusätzlich dadurch verengt, dass die Loops L1, L4 und L6 sowie der Loop L2 eines benachbarten Monomers ebenfalls in das Kanallumen ragen. Dabei bildet jedes Monomer für sich eine wassergefüllte Pore mit einer Bindestelle für Maltosederivate. Für die porenformende Aktivität von LamB werden drei dieser Monomere benötigt, die das native bzw. funktionale Trimer generieren (Schirmer *et al.*, 1995). Die restlichen Loops auf der extrazellulären Seite bilden eine schirmartige

Struktur über dem jeweiligen Monomer, die einen Großteil der Kanalöffnung bedeckt. Bei der Zuckerbindung spielt vor allem die „greasy-slide“ eine wichtige Rolle. Die „greasy-slide“ besteht aus sechs aromatischen Resten, die das Kanallinnere in Form einer linksgängigen Helix von der extrazellulären bis zur periplasmatischen Kanalöffnung auskleiden.



**Abb.1.7.** Kristallstrukturen von LamB und MspA.

**Abb. 1.7.A.** Seitenansicht von LamB;

**Abb. 1.7.B.** Aufsicht von LamB;

(Schirmer *et al.*, 1995).

**Abb. 1.7.C.** Seitenansicht von MspA;

**Abb. 1.7.D.** Aufsicht von MspA;

(Faller *et al.*, 2004).

## 1.5. Referenzen

- Angus, B. L. & R. E. Hancock, (1983) Outer membrane porin proteins F, P, and D1 of *Pseudomonas aeruginosa* and PhoE of *Escherichia coli*: chemical cross-linking to reveal native oligomers. *J Bacteriol* **155**: 1042-1051.
- Belisle, J. T., V. D. Vissa, T. Sievert, K. Takayama, P. J. Brennan & G. S. Besra, (1997) Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**: 1420-1422.
- Benz, R., (1985) Porin from bacterial and mitochondrial outer membranes. *CRC Crit Rev Biochem* **19**: 145-190.
- Benz, R. & K. Bauer, (1988) Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins. *Eur J Biochem* **176**: 1-19.
- Benz, R., K. Janko, W. Boos & P. Lauger, (1978) Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **511**: 305-319.
- Benz, R., K. Janko & P. Lauger, (1979) Ionic selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **551**: 238-247.
- Benz, R., A. Schmid, T. Nakae & G. H. Vos-Scheperkeuter, (1986) Pore formation by LamB of *Escherichia coli* in lipid bilayer membranes. *J Bacteriol* **165**: 978-986.
- Benz, R. & R. E. W. Hancock, (1987a) Mechanism of ion transport through the anion selective channel of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *J. Gen. Physiol.*, **89**: 275-295.
- Benz, R., A. Schmid, & G. H. Vos-Scheperkeuter, (1987b) Mechanism of sugar transport through the sugar-specific LamB channel of *Escherichia coli* outer membrane. *J. Membrane Bio.* **100**: 12-29.
- Brennan, P. J. & H. Nikaido, (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* **64**: 29-63.
- Cowan, S. W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R. A. Pauptit, J. N. Jansonius & J. P. Rosenbusch, (1992) Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**: 727-733.
- Brock, T. D., M. T. Madigan, J. M. Martinko & J. Parker, (2002) Biology of microorganisms, 10th edition. *Prentice Hall*. New Jersey (USA).
- Chun, J., S-O Kang, Y. C. Hah, & M. Goodfellow, (1996) Phylogeny of mycolic acid-containing actinomycetes. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 205-213.
- Curtis, N. A., M. H. Richmond & R. B. Sykes, (1972) "Periplasmic" location of a -lactamase specified either by a plasmid or a chromosomal gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **112**: 1433-1434.
- Daffe, M. & P. Draper, (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**: 131-203.

- Engelman, D. M., (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**: 578-80.
- Evans, W. H. & J. M. Graham, (1991) Structure and Function of Biological Membranes. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, New York.
- Faller, M., M. Niederweis & G. E. Schulz, (2004) The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science* **303**: 1189-1192.
- Goodfellow, M., M. D. Collins & D. E. Minnikin, (1976) Thin-layer chromatographic analysis of mycolic acid and other long-chain components in whole-organism methanolsates of coryneform and related taxa. *J Gen Microbiol* **96**: 351-358.
- Goodfellow, M. & V. A. Orchard, (1974) Antibiotic sensitivity of some nocardioform bacteria and its value as a criterion for taxonomy. *J Gen Microbiol* **83**: 375-387.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley & S. T. Williams, (1994) Nocardioform actinomycetes. *Bergey's Manual of Determinative Biology*, 9. Auflage. *The Williams and Wilkins Co.* Baltimore, 625-650.
- Hui, J., N. Gordon & R. Kajioka, (1977) Permeability barrier to rifampin in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **11**: 773-779.
- Jarlier, V., L. Gutmann & H. Nikaido, (1991) Interplay of cell wall barrier and beta-lactamase activity determines high resistance to beta-lactam antibiotics in *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 1937-1939.
- Kreusch, A., A. Neubüser, E. Schiltz, J. Weckesser & G.E. Schulz, (1994) Structure of the membrane channel porin from *Rhodospseudomonas blastica* at 2.0 Å resolution. *Protein Science* 58-63.
- Liu, J., C. E. Barry, 3rd, G. S. Besra & H. Nikaido, (1996) Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem* **271**: 29545-29551.
- Minnikin, D. E., (1982) Complex lipids: Their chemistry, biosynthesis and roles. *C. Ratledge, and J. Stanford (eds.) The Biology of Mycobacteria, Vol.1, Academic Press.* London, 98-184.
- Minnikin, D. E. & A. G. O'Donnel (1984) Actinomycetes envelope and peptidoglykan composition. *Goodfellow, M., Mordarski, M., Williams, S. T. (eds.) The biology of Actinomycetes, Academic Press.* London, 337-388.
- Niederweis, M., S. Ehrhart, C. Heinz, U. Klocker, S. Karosi, K. M. Swiderek, L. W. Riley & R. Benz, (1999) Cloning of the *mshA* gene encoding a porin from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **33**: 933-945.
- Nikaido, H., (1994) Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem* **269**: 3905-3908.
- Palva, E. T. & L. L. Randall, (1978) Arrangement of protein I in *Escherichia coli* outer membrane: cross-linking study. *J Bacteriol* **133**: 279-286.

- Palva, E. T. & P. Westermann, (1979) Arrangement of the maltose-inducible major outer membrane proteins, the bacteriophage lambda receptor in *Escherichia coli* and the 44 K protein in *Salmonella typhimurium*. *FEBS Lett* **99**: 77-80.
- Rosen, B.P., (1978) Bacterial transport. *Marcel Dekker*. New York.
- Schirmer, T., T. A. Keller, Y. F. Wang & J. P. Rosenbusch, (1995) Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**: 512-514.
- Schlegel, H. G., (1992) Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage. *Georg Thieme Verlag*. Stuttgart.
- Singer, S. J. & G. L. Nicolson, (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731.
- Stahl, C., S. Kubetzko, I. Kaps, S. Seeber, H. Engelhardt & M. Niederweis, (2001) MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **40**: 451-464.
- Weiss, M. S., A. Kreuzsch, E. Schiltz, U. Nestel, W. Welte, J. Weckesser & G. E. Schulz, (1991) The structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 1.8 Å resolution. *FEBS Lett* **280**: 379-382.
- Weiss, M. S. & G. E. Schulz, (1992) Structure of porin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* **227**: 493-509.

**Rekombinante Expression der beiden Gene *nfa15890* und *nfa15900*  
ermöglicht die porenformende Zuordnung eines  
Hetero-Oligomers aus *N. farcinica***

**2.1. Zusammenfassung**

In Japan ist *Nocardia farcinica* der am häufigsten isolierte Stamm aus der Familie *Nocardiaceae* und wurde darüber hinaus als Haupterreger der Nocardiose klassifiziert (<http://nocardia.nih.go.jp/>; Beaman *et al.*, 1992; Muñoz *et al.*, 2007). Die mycolsäurehaltige Zellwand von *Nocardia farcinica* enthält ein kationenselektives Porin (Rieß *et al.*, 1998), welches den Transport negativ geladener Antibiotika limitieren könnte.

Basierend auf den gewonnenen Teilsequenzen des nativen Porins, konnten im Rahmen dieser Arbeit die zugehörigen Gene im Genom von *N. farcinica* IFM 10152 (Ishikawa *et al.*, 2004) lokalisiert werden. Anhand eines Alignments dieser Sequenzen mit der Proteindatenbank NCBI konnten sechs hypothetische Proteine aus *N. farcinica* IFM 10152 identifiziert werden, die allesamt Homologien zu MspA (*Mycobacterium smegmatis* **porin A**), einem bekannten Porin, aufweisen. Zudem besitzen sie Signalpeptide, welche sie als Proteine der äußeren Membran charakterisieren (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) und die obligatorisch für Proteine sind, die über den *Sec* Apparat transportiert werden (Freudl, 1992). Diese Proteine sind im einzelnen *Nfa15890*, *Nfa15900*, *Nfa33390*, *Nfa33400*, *Nfa49580* und *Nfa49590*. Jeweils zwei der zu diesen Proteinen zugehörigen Gene liegen direkt hintereinander im Chromosom von *N. farcinica* IFM 10152. Die vorderen und die hinteren beiden Gene besitzen jeweils eine höhere Homologie untereinander als die beiden Gene eines Tandempaars selbst.

In dieser Arbeit wurden zunächst die beiden Gene *nfa15890* und *nfa15900*, welche insgesamt betrachtet die höchste Übereinstimmung zu allen generierten Teilsequenzen zeigten, mithilfe des Vektors pARAJ2 rekombinant in *E. coli* BL21DE3Omp8 exprimiert und über eine Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Die beiden rekombinant exprimierten Proteine *Nfa15890* und *Nfa15900* wurden im folgenden als NfpA<sub>NHis</sub> und NfpB<sub>NHis</sub> (*Nocardia farcinica* **porin A** und **B N-terminal Histidin-tag**) bezeichnet. Darüber hinaus konnte das Gen *nfa49590* alleine bzw. als Tandemgen *nfa49590+nfa49580* mithilfe des Vektors pARAJ2 in

*E. coli* BL21DE3Omp8 exprimiert, aufgereinigt und als NfpC<sub>NHis</sub> bzw. NfpC<sub>NHis</sub>+NfpD benannt werden. Die jeweiligen zueinander korrespondierenden Tandempartner wurden nach der Aufreinigung innerhalb der Black-Lipid-Bilayer Methode hinsichtlich ihrer porenformenden Aktivität untersucht.

Biophysikalische Untersuchungen zeigten, dass die beiden in *E. coli* exprimierten Proteine NfpA<sub>NHis</sub> und NfpB<sub>NHis</sub> nur *zusammen* einen Kanal in der Lipiddoppelschicht bilden können. Demnach wird das Porin aus *N. farcinica* als Hetero-Oligomer gebildet. Insbesondere nach denaturierender Reinigung und anschließender Renaturierung in die aktive Konformation kann für das Hetero-Oligomer ein zu MspA strukturell verwandter Kanal postuliert werden.

## 2.2. Einleitung

Unter der Gattung *Nocardia* versteht man strikt aerob lebende, stäbchenförmige Gram-positive Bakterien, die zur Familie der *Nocardiaceae* innerhalb der Unterordnung *Corynebacterineae* gezählt werden. Derzeit sind 85 Stämme bekannt, die in nicht-pathogene und pathogene Vertreter unterteilt werden. *Nocardia* sind vorwiegend in terrestrischen bzw. aquatischen Systemen gefunden sowie in tierischen Geweben bestimmt worden (Beaman und Sugar, 1983). Häufig beginnen *Nocardia* Infektionen mit der Inhalation der pathogenen *Nocardia* Stämme. Einer aktuellen Studie zur Folge ist *Nocardia farcinica* der am häufigsten isolierte Stamm aus der Familie *Nocardiaceae* und wurde in Japan als Haupterreger der Nocardiose klassifiziert (<http://nocardia.nih.go.jp/>; Beaman *et al.*, 1992; Muñoz *et al.*, 2007).

Unter Nocardiose versteht man laut Definition „eine nicht selten akute oder chronische abszedierende Entzündung der Lunge, des Gehirns oder der Haut“ (Tsukamura und Ohta, 1980; Beaman, 1992; Schmoekel, 1996). Diese klinischen Symptome werden von pathogenen *Nocardia* Stämmen hervorgerufen. In vielen Fällen wird eine *Nocardia* Infektion meist durch eine Immunsuppression (HI-Virus, Chemotherapie, Transplantation) oder chirurgische Behandlung ausgelöst (Schaal und Lee, 1992). Insbesondere die spezifische, vielfache Medikamentenresistenz stellt ein ernsthaftes Problem in der Nocardiose Behandlung dar, so dass eine Chemotherapie unumgänglich wird. Auf der anderen Seite besteht für bestimmte *Nocardia* Stämme besonderes Interesse, da diese sowohl Antibiotika produzieren als auch aromatische Verbindungen ab- bzw. umbauen können (Aoki *et al.*, 1976; Ridgway *et al.*, 1990).

*N. farcinica* und andere Vertreter der *Nocardiaceae* gehören zu den mycolsäurehaltigen Aktinomyceten, den sogenannten Mycolata (Stackebrandt *et al.*, 1997). Diese umfassen Mikroorganismen, deren Vertreter die gefährlichsten Infektionen weltweit auslösen können. Dazu zählen insbesondere *Mycobacterium tuberculosis* (TBC; aktueller Stand: 3 Millionen Tote/Jahr), *Mycobacterium leprae* (Lepra), *Nocardia farcinica* (Nocardiose) und *Corynebacterium diphtheriae* (Diphtherie) ebenso wie die nicht-pathogenen Vertreter *Corynebacterium glutamicum* und *Corynebacterium efficiens*, die industrielle Aminosäuren produzieren können (Glutamat-Produktion; weltweit: etwa 340,000 Tonnen/Jahr). Aufgrund ihrer heterogenen Vielfalt, ihrer extremen Säureresistenz und ihrer ungewöhnlichen Zellwandstruktur, die eine zusätzliche Permeabilitätsbarriere für hydrophile Moleküle beinhaltet (Jarlier und Nikaido, 1990; Brennan und Nikaido, 1995), stellen die Mycolata ein interessantes und faszinierendes Forschungsobjekt dar.

Einen Hauptbestandteil der Permeabilitätsbarriere der Mycolata nehmen die Mycolsäuren ein. Dabei handelt es sich um lange  $\alpha$ -verzweigte  $\beta$ -hydroxylierte Fettsäuren

(Goodfellow *et al.*, 1976; Goodfellow und Orchard, 1974; Minnikin, 1982; Chun *et al.*, 1996), die über Esterbindungen mit dem Arabinogalactangerüst verknüpft sind. Zusätzlich sind in die mycolsäurehaltige Schicht zahlreiche freie Glykolipide eingebettet, die die zusätzliche Barriere ermöglichen (Nikaido, 1993). Daher gleicht die äußere Membran der Mycolata der Funktion der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Benz, 1994). Diese Barriere wird hingegen im wesentlichen von einer Lipiddoppelschicht sowie von Lipopolysacchariden gebildet.

Wie die beschriebene sekundäre Pemeabilitätsbarriere vermuten ließ, konnten für einige Vertreter der Mycolata wie z.B. *Mycobacterium chelonae* (Trias *et al.*, 1992), *Corynebacterium glutamicum* (Lichtinger *et al.*, 1998) und *Nocardia farcinica* (Rieß *et al.*, 1998) bereits Kanäle in der Zellwand nachgewiesen werden, die den hydrophilen Stofftransport sicherstellen können. Diese Kanäle sind allesamt wassergefüllt, ausgedehnt und enthalten negative Punktladungen. Darüber hinaus sind einige dieser Kanäle nachweislich am Arzneimitteltransport beteiligt. So konnte beispielsweise für das MspA-Porin aus *Mycobacterium smegmatis* der Transport von drei wichtigen Pharmakons wie Isoniazid, Ethambutol und Pyrazinamid gezeigt werden (Lambert, 2002).

Bis heute bleibt die Kristallstruktur von MspA das einzige aufgeklärte Porin innerhalb der Mycolata (Faller *et al.*, 2004). Der funktionelle Kanal wird dabei von einem Oligomer aus acht homologen Monomeren gebildet. Bisher konnten keine Homologien zwischen dem MspA-Porin und weiteren bekannten Proteinuntereinheiten aus Zellwandkanälen der Mycolata wie *C. glutamicum* (Barth *et al.*, 2009 *Manuscript*) oder *C. diphtheriae* (Schiffler und Barth, 2007) bestimmt werden.

Innerhalb dieser Arbeit konnten die monomeren Bestandteile des Zellwandkanals aus *N. farcinica* IFM 10152 (Ishikawa *et al.*, 2004) identifiziert werden. Drei der sechs Untereinheiten des Zellwandkanals wurden heterolog in *E. coli* BL21DE3Omp8 exprimiert. Die zueinander korrespondierenden Monomere NfpA<sub>NH<sub>2</sub></sub> und NfpB<sub>NH<sub>2</sub></sub> bzw. NfpC<sub>NH<sub>2</sub></sub> und NfpB<sub>NH<sub>2</sub></sub> konnten lediglich *zusammen*, nicht jedoch für sich *alleine*, einen Zellwandkanal formieren, der nach dem Vergleich der Aminosäuresequenzen einen zu MspA strukturell verwandten Kanal vorschlägt.

## 2.3. Material und Methoden

### 2.3.1. Verwendete Stämme und Wachstumsbedingungen

Alle innerhalb von Kapitel 2 verwendeten Bakterien (siehe Tab. 2.1.) wurden in LB-Medium bzw. auf LB-Agarplatten bei 37°C mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert. Die beiden *E. coli* Stämme 'Top10F' (Invitrogen) und Neb5α (New England Biolabs) wurden für die Klonierungsexperimente eingesetzt. Der *E. coli* BL21DE3Omp8 Stamm wurde hingegen (Prilipov *et al.*, 1998) für die Expression der entsprechenden plasmidcodierten Proteine (siehe Tab. 2.2.) verwendet. Als Selektionskonzentrationen wurden 100 µg/ml Ampicillin (Amp), 40 µg/ml Kanamycin (Km) sowie 25 µg/ml Chloramphenicol (Cm) gewählt. Das Expressionsplasmid pARAJ2 (Stegmeier und Andersen, 2006) ist ein Derivat von pET12a (Novagen). Für die Klonierungen und Expressionen wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

**Tab. 2.1.** Verwendete Stämme bzw. deren relevante Eigenschaften und Referenzen.

	Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
1.	<i>E. coli</i> 'Top10F'	Kommerzieller Stamm, Superkompetent, keine Resistenz	Invitrogen
2.	<i>E. coli</i> Neb5α	Kommerzieller Stamm, Superkompetent, keine Resistenz	New England Biolabs
3.	<i>E. coli</i> BL21DE3Omp8	Expressionsstamm Porindefizient, Km-Resistenz	(Prilipov <i>et al.</i> , 1998)
4.	<i>E. coli</i> 'Top10F' pCR®2.1-TOPO® <i>_nfpA</i>	enthält pCR®2.1-TOPO® <i>_nfa15890</i> , (prozessiert, +16AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit
5.	<i>E. coli</i> Neb5α pJet1 <i>_nfpA</i> '	enthält pJet1 <i>_nfa15890</i> , (prozessiert, +3AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit
6.	<i>E. coli</i> Neb5α pJet1 <i>_nfpB</i>	enthält pJet1 <i>_nfa15900</i> , (prozessiert, +4AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit

7.	<i>E. coli</i> Bl21DE3Omp8 pARAJJS2_ <i>nfpA</i>	NfpA <sub>NHis</sub> -Expressionsstamm, Amp-Resistenz, Km-Resistenz	Diese Arbeit
8.	<i>E. coli</i> Bl21DE3Omp8 pARAJJS2_ <i>nfpA</i> '	NfpA' <sub>NHis</sub> -Expressionsstamm, Amp-Resistenz, Km-Resistenz	Diese Arbeit
9.	<i>E. coli</i> Bl21DE3Omp8 pARAJJS2_ <i>nfpB</i>	NfpB <sub>NHis</sub> -Expressionsstamm, Amp-Resistenz, Km-Resistenz	Diese Arbeit
10.	<i>E. coli</i> Neb5α pJet1_ <i>nfpC</i>	enthält pJet1_ <i>nfa49590</i> , (prozessiert, +3AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit
11.	<i>E. coli</i> Neb5α pJet1_ <i>nfpC</i> + <i>nfpD</i>	enthält pJet1_ <i>nfa49590</i> + <i>49580</i> , (prozessiert, +3AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit
12.	<i>E. coli</i> Bl21DE3Omp8 pARAJJS2_ <i>nfpC</i>	NfpC <sub>NHis</sub> -Expressionsstamm, Amp-Resistenz, Km-Resistenz	Diese Arbeit
13.	<i>E. coli</i> Bl21DE3Omp8 pARAJJS2_ <i>nfpC</i> + <i>nfpD</i>	NfpC <sub>NHis</sub> -Expressionsstamm, Amp-Resistenz, Km-Resistenz	Diese Arbeit

Zudem wurden für die Klonierungen und Expressionen folgende Plasmide verwendet:

Tab. 2.2. Verwendete Plasmide bzw. deren relevante Eigenschaften und Referenzen.

	Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
1.	pCR®2.1-TOPO®	Klonierungsvektor, Amp-Resistenz	Invitrogen
2.	pJET1	Klonierungsvektor, Amp-Resistenz	Fermentas/Life Sciences
3.	pARAJJS2	Expressionsvektor, Amp-Resistenz	(Stegmeier und Andersen, 2006)
4.	pCR®2.1-TOPO®_ <i>nfpA</i>	enthält das Gen <i>nfa15890</i> , (prozessiert, +16AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit
5.	pJET1_ <i>nfpA</i> '	enthält das Gen <i>nfa15890</i> , (prozessiert, +3AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit

6.	pJET1_ <i>nfpB</i>	enthält das Gen <i>nfa15900</i> , (prozessiert, +4AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit
7.	pARAJ2_ <i>nfpA</i>	enthält das Gen <i>nfa15890</i> , (prozessiert, +16AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit
8.	pARAJ2_ <i>nfpA'</i>	enthält das Gen <i>nfa15890</i> , (prozessiert, +3AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit
9.	pARAJ2_ <i>nfpB</i>	enthält das Gen <i>nfa15900</i> , (prozessiert, +4AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit
10.	pJET1_ <i>nfpC</i>	enthält das Gen <i>nfa49590</i> , (prozessiert, +3AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit
11.	pJET1_ <i>nfpC+nfpD</i>	enthält die Gene <i>nfa49590+nfa49580</i> , (prozessiert,+3AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit
12.	pARAJ2_ <i>nfpC</i>	enthält das Gen <i>nfa49590</i> , (prozessiert,+3AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit
13.	pARAJ2_ <i>nfpC+nfpD</i>	enthält die Gene <i>nfa49590+nfa49580</i> , (prozessiert,+3AS des nativen Signalpeptids), Amp-Resistenz	Diese Arbeit

### 2.3.2. Proteinsequenzierung

Das aufgereinigte Protein aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) wurde nach SDS-PAGE Coomassie gefärbt und auf eine PVDF-Membran elektrogeblottet. Teile der Aminosäuresequenz des Proteins konnten dann sowohl direkt N-terminal als auch nach Bromcyanspaltung durch automatisierten Edman-Abbau ermittelt werden. Bei der Bromcyanspaltung wird die Polypeptidkette spezifisch an der Stelle gespalten, wo die Carbonylfunktion der Peptidbindung von einem Methioninrest geliefert wird (Rauterberg und Kühn, 1971). Die Anzahl der Methioninreste im Protein ist folglich für die Anzahl der erhaltenen Schnittfragmente verantwortlich. Der automatisierte Edman-Abbau bewirkt, dass eine Aminosäure nach der anderen vom Aminoende des Peptides her abgespalten wird. Hierbei wird der aminoendständige Rest mit Phenylisothiocyanat (PTC) markiert, wodurch ein Phenylthiocarbonylderivat entsteht, das unter schwach sauren Bedingungen zu einer Phenylthiohydantoin-(PTH-)Aminosäure zyklisiert. Ein Peptid, welches um eine Aminosäure verkürzt wurde, bleibt zurück. Die PTH-Aminosäure kann durch hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

identifiziert werden. Mit einem Sequenator lassen sich durch wiederholten automatisierten Edman-Abbau Sequenzen von ungefähr 50 Resten analysieren.

### 2.3.3. Klonierung der Nfp-Monomere mittels PCR

Für die rekombinante Klonierung wurde durchweg die chromosomale DNA aus *N. farcinica* N 236 IMMIB (ATCC 3318) verwendet. Für die Alignments wurde als genetische Matritze der sequenzierte Literaturstamm *N. farcinica* IFM 10152 (Ishikawa *et al.*, 2004) eingesetzt.

Der Shuttlevektor pARAJ2 diente dabei der genetischen Komplementierung bzw. Expression aller rekombinanten Gene aus *N. farcinica*. Der Shuttlevektor pARAJ2 enthält neben der Ampicillin-Resistenz eine „multi cloning site“ (MCS) mit den für die Klonierung relevanten Schnittstellen *NcoI*, *SacI* bzw. *Bsp1407I* in 5' nach 3' Richtung.

Die Gene *nfpA* (1), *nfpA'* (2) und *nfpB* (3) (abgeleitet von *nfa15890* und *nfa15900*) sowie die Gene *nfpC* (4) (abgeleitet von *nfa49590*) und *nfpC+nfpD* (5) (abgeleitet von *nfa49590+nfa49580*) aus *N. farcinica* IFM 10152, wurden mithilfe eines Standard-PCR-Programms in jeweils 25 µl Reaktionsansätzen mit 1x Taq Puffersystem, 0,2 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq DNA Polymerase und 0,4 µM Primern vervielfältigt [siehe Tabelle 2.3.: (1) FP *nfpA NcoI* und RP *nfpA Bsp1407I*; (2) FP *nfpA' NcoI*, RP *nfpA' Bsp1407I*; (3) FP *nfpB NcoI*, RP *nfpB Bsp1407I*; (4) FP *nfpC SacI*, RP *nfpC Bsp1407I* und (5) FP *nfpC SacI*, RP *nfpD Bsp1407I* führten zu der Vervielfältigung]. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Initiale Denaturierung bei 95°C für 10 min, 30 Zyklen bei 95°C für 1 min, 50°C für 1 min (1-3); 55°C für 1 min (4-5), 72°C für weitere 3 min (1) 2,5 min (2), 3 min (3), 2 min (4) sowie 4 min (5) und eine finale Verlängerung bei 72°C für 10 min. Das Primerpaar FP *nfpA NcoI* und RP *nfpA Bsp1407I* führte zu einem spezifischen Fragment von 649 Basenpaaren, die Kombination FP *nfpA' NcoI* und RP *nfpA' Bsp1407I* ergab hingegen ein Fragment mit einer Länge von 611 Basenpaaren, das Paar FP *nfpB NcoI*, RP *nfpB Bsp1407I* resultierte in ein Fragment mit einer Länge von 642 Basenpaaren. Darüber hinaus wurden nach der Vervielfältigung von *nfpC* bzw. von *nfpC+nfpD* mithilfe der verbliebenen Primerpaare FP *nfpC SacI*, RP *nfpC Bsp1407I* und RP *nfpD Bsp1407I* etwa 600 Basenpaare (Gen *nfa49590* ohne Signalsequenz) sowie ca. 1350 Basenpaare (Tandemgen *nfa49590+nfa49580* mit Zwischengensequenz) erwartet. Die amplifizierten Fragmente *nfpA* und *nfpA'* (649 bzw. 611 Basenpaare) unterscheiden sich lediglich in der Länge ihrer mutmaßlichen nativen Signalsequenzen, weil beide Fragmente vom Gen *nfa15890* abgeleitet wurden.

Damit codiert das Gen *nfpA* 16 Aminosäuren der nativen Signalsequenz; das Gen *nfpA'* beinhaltet nur die ersten drei Aminosäuren der nativen Signalsequenz. Das Gen *nfpB* wurde

hingegen von *nfa15900* abgeleitet und enthält die ersten vier Aminosäuren der nativen Signalsequenz. Die amplifizierten Fragmente *nfpA*, *nfpA'*, *nfpB* sowie *nfpC* und *nfpC+nfpD* wurden allesamt in die Klonierungsvektoren pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) bzw. pJet (Fermentas) eingefügt und resultierten in die Konstrukte pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup><sub>*nfpA*</sub>, pJET1<sub>*nfpA'*</sub>, pJET1<sub>*nfpB*</sub>, pJET1<sub>*nfpC*</sub> und pJET1<sub>*nfpC+nfpD*</sub>. Die generierten Ligationsprodukte wurden in *E. coli* TOF10F' bzw. *E. coli* Neb5 $\alpha$  Zellen via Hitzeschock transformiert und deren richtige Plasmidaufnahme mithilfe einer Kolonie-PCR mit den Primerpaaren FP pJet1/RP pJet1 bzw. FP M13/RP M13 sichergestellt. Zusätzlich wurden alle Plasmide nach der Transformation in die *E. coli* TOF10F' und *E. coli* Neb5 $\alpha$  Zellen auf die Richtigkeit der amplifizierten Gene sequenziert.

Für die Klonierung in den Expressionsvektor pARAJ2 wurden die Konstrukte pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup><sub>*nfpA*</sub>, pJET1<sub>*nfpA'*</sub> und pJET1<sub>*nfpB*</sub> mit den entsprechenden Restriktionsenzymen *NcoI* und *Bsp1407I* behandelt (im Verhältnis 1:1, 1x Tango-Puffer) und in den mit *NcoI* und *Bsp1407I* verdauten Expressionsvektor pARAJ2 ligiert. Die Konstrukte pJET1<sub>*nfpC*</sub> und pJET1<sub>*nfpC+nfpD*</sub> wurden mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *Bsp1407I* (im Verhältnis 1:1, 1x Tango-Puffer) in einen mit *SacI* und *Bsp1407I* verdauten Vektor pARAJ2 ligiert. Die verdauten Fragmente wurden im Verhältnis 4:1 mit dem Expressionsvektor pARAJ2 für 16 Stunden bei 16°C inkubiert. Nach der finalen Ligation konnten mit pARAJ2<sub>*nfpA*</sub>, pARAJ2<sub>*nfpA'*</sub>, pARAJ2<sub>*nfpB*</sub> sowie pARAJ2<sub>*nfpC*</sub> und pARAJ2<sub>*nfpC+nfpD*</sub> die rekombinanten Nfp-Monomere erhalten werden. Die Nomenklatur der rekombinanten Gene wurden für die entsprechenden Konstrukte mit *nfpA*<sub>NHis</sub>, *nfpA'*<sub>NHis</sub>, *nfpB*<sub>NHis</sub> sowie *nfpC*<sub>NHis</sub> und *nfpC*<sub>NHis</sub>+*nfpD* festgelegt.

Die Expressionsplasmide der Nfp-Monomere wurden allesamt auf deren Richtigkeit sequenziert, bevor sie in den jeweiligen Porindefizienten *E. coli* BL21DE3Omp8 Stamm transformiert werden konnten. Für die Transformation wurden die kompetenten *E. coli* BL21DE3Omp8 Stämme jeweils mit den generierten Expressionsplasmiden pARAJ2<sub>*nfpA*</sub>, pARAJ2<sub>*nfpA'*</sub>, pARAJ2<sub>*nfpB*</sub> sowie pARAJ2<sub>*nfpC*</sub> und pARAJ2<sub>*nfpC+nfpD*</sub> innerhalb der jeweiligen Elektroporationsküvetten (1000 ng/ $\mu$ l Plasmid) versetzt und mithilfe einer standardisierten Elektroporationsmethode bei 600  $\Omega$ , 25  $\mu$ F und 2,5 kV in einem Eppendorf-Multiporator aufgenommen.

**Tab.2.3.** zeigt die für die rekombinante Klonierung verwendeten Oligoprimer. Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind fett und unterstrichen dargestellt.

Primer	Sequenzen 5' → 3'
FP <i>nfpA</i> <i>NcoI</i>	TCG GGA <b>TCC ATG GCG</b> CCG CCA CCA T
FP <i>nfpA'</i> <i>NcoI</i>	TTC TCG ACC <b>CAT GGT</b> GCC AAC GCG GA
RP <i>nfpA</i> , <i>nfpA'</i> <i>Bsp1407I</i>	CTT CAT AGT TCT <b>GTA CAA</b> CCC CTC CG
FP <i>nfpB</i> <i>NcoI</i>	CGG CAT GCT GTC <b>CCA TGG</b> TGC GGC CAA C
RP <i>nfpB</i> <i>Bsp1407I</i>	GTC CGC GAG CGT <b>TGT ACA</b> GCG CCG GAT CAG
FP <i>nfpC</i> <i>SacI</i>	TCG ACC <b>GGA GCT CCC</b> AAC GC
RP <i>nfpC</i> <i>Bsp1407I</i>	TGA <b>TGT ACA</b> TGG AAG GTC AG
RP <i>nfpD</i> <i>Bsp1407I</i>	CCA TG <b>T GTA CAA</b> CCG GAT CAG
FP pJet1	GCC TGA ACA CCA TAT CCA TCC
RP pJet1	GCA GCT GAG AAT ATT GTA GGA GAT C
FP pARAJS2	GCA CGG CGT CAC ACT TTG C
RP pARAJS2	GAC CCG TTT AGA CCG CCC

### 2.3.4. Expression und Aufreinigung der Nfp-Monomere

Für die Proteinexpression wurde der porinfreie *E. coli* BL21DE3Omp8 Stamm in LB-Medium unter den entsprechenden Antibiotika-Selektionsbedingungen bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7 kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert bzw. mit 0,02% Arabinose versetzt, um die gezielte Expression der Nfp-Monomere auszulösen. Nach weiteren 16 Stunden Inkubation (130 rpm) bei 16°C wurden die Zellen bei 5000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und in 10 ml 10 mM Tris pH 8 resuspendiert. Zusätzlich wurde ein 100 µl Protease Inhibitor Cocktail (Calbiochem) nach dreimaligem Waschen der Zellen zugegeben, bevor die Bakterien mithilfe der French-Press Methode bei 900 – 1500 psi aufgeschlossen wurden. Die Zellbestandteile wurden bei 5000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde darüber hinaus bei 48000 x g für 1 h bei 4°C ultrazentrifugiert, um das Membranpellet zu erhalten. Per Ultrazentrifugation konnte das Lipid mitsamt den darin befindlichen Proteinen abzentrifugiert werden und die frei gelösten Proteine

konnten im Überstand verbleiben (Cytosolfraktion). Aus dem erhaltenen Membranpellet wurden die Membranproteine mit Hilfe verschiedener Detergenzien herausgelöst (Membranfraktion). Für die Membranproteinextraktion wurde das generierte Membranpellet zunächst in 10 mM Tris/2% Triton X-100/pH 8 und Protease Inhibitor Cocktail Set II (Calbiochem) gelöst. Die Suspension wurde 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und für weitere 30 min bei 48000 x g und 4°C ultrazentrifugiert. Darüber hinaus konnten die Nfp-Monomere ebenfalls aus dem Überstand (Cytosolfraktion) aufgereinigt werden. Im Rahmen der Aufreinigung wurde jeweils 1 ml des Cytosolüberstands bzw. 1 ml des Membranüberstands in 4 ml 10 mM Tris/200 µl Ni-Sepharose<sup>TM</sup> High Performance/40 mM Imidazol/pH 8 gelöst und auf dem Drehrad über Nacht bei 7 rpm und 4°C inkubiert. Nach achtmaligem Waschen der Sepharose-Beads in 10 mM Tris/1% Triton X-100/60 mM Imidazol/pH 8 bzw. nach zwei weiteren Waschschritten in 10 mM Tris/1% Triton X-100/80 mM Imidazol/pH 8 konnten die Nfp-Monomere mit 10 mM Tris/1% Triton X-100/500 mM Imidazol/pH 8 selektiv von den Sepharose-Beads eluiert werden.

### **2.3.5. Proteinrenaturierung der Nfp-Monomere**

In Übereinstimmung mit der erhaltenen Kristallstruktur von MspA (Faller *et al.*, 2004) nach der Behandlung mit gesättigter Amoniumsulfat-Lösung, wurde diese für die vollständige Renaturierung des Nfp-Oligomers ebenfalls verwendet. Die Inkubation mit der gesättigten Amoniumsulfat-Lösung sollte demnach die mutmaßlichen heterolog exprimierten Nfp-Monomere („Inclusion bodies“) renaturieren, um die mutmaßliche porenformende Aktivität mithilfe der Black-Lipid-Bilayer Methode messen zu können. Dafür wurde ein 1:1 Endvolumen aus den beiden aufgereinigten Fraktionen NfpA<sub>NHis</sub> und NfpB<sub>NHis</sub> bzw. NfpC<sub>NHis</sub> und NfpB<sub>NHis</sub> von jeweils 50 µl mit insgesamt 600 µl der gesättigten Amoniumsulfat-Lösung (zuzüglich 300 µl H<sub>2</sub>O) versetzt. Anschließend wurden die Ansätze bei 18000 x g für 30 min und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und das Pellet mithilfe der Speedvac getrocknet. Um die porenformende Aktivität und damit die Löslichkeit des renaturierten Nfp-Oligomers sicherzustellen, musste das Pellet abschließend in 10 mM Tris/1% Triton X-100/150 mM NaCl/pH 8 aufgenommen und für 12 Stunden bei 4°C inkubiert werden.

### **2.3.6. SDS-PAGE und Western-Blot**

Die sogenannte SDS-PAGE (**S**odium**d**odecyl**s**ulfate-**P**olyacrylamide **G**el **E**lektrophorese) wurde nach dem Laemmli Gelsystem (Laemmli, 1970) durchgeführt. Das Gelsystem nach Laemmli stellt

ein etabliertes Standardverfahren zur Trennung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 200 kDa dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 8% – 12%-ige SDS-Gele verwendet. Die Nfp-Proteine wurden sowohl unter denaturierenden Bedingungen mithilfe eines Bio-Rad Elektrophorese-Systems [Proben in 4x SDS Puffer (0,5 M Tris pH 6,8/10% SDS/Glycerol/Bromphenolblau und 0,01%  $\beta$ -Mercaptoethanol) gekocht für 10 min bzw. ungekocht] bei 110 V und Raumtemperatur als auch unter nativeren Bedingungen (Proben in 4x SDS Puffer *ohne* Bromphenolblau und  $\beta$ -Mercaptoethanol) bei 80 V und 4°C aufgetrennt. Für die Detektierung der Proteine wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen (Blum *et al.*, 1987). Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder gefärbt oder geblottet.

Beim Western-Blot wurden die Proteine auf eine 0,1  $\mu$ m Nitrocellulosemembran (NC) (Protran, BA79, Whatman) transferiert. Das Blotten der Proteine wurde in einem Tank-Blot System (Biorad) mit dem Towbin-Puffer (25 mM Tris/192 mM Glycin/20% Methanol) bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA durchgeführt (Towbin und Gordon, 1979). Für das Blotten wurden bei einer erwarteten Molekularmasse der Nfp-Monomere von 30 kDa eine Zeit von 15 min nicht überschritten. Im Fall des Doppelproduktes NfpC<sub>NHis</sub>+NfpD wurde eine maximale Blot-Zeit von 30 min festgelegt. Unmittelbar vor der Behandlung der Membran mit den beiden Anikörpern wurde ein 5%-iges Magermilchpulver in TBS-T Puffer (20 mM Tris-HCl/0,01 M NaCl/0.1% Tween/pH 7,5) zugegeben, um unspezifische Bindungen der Membran mit den Antikörpern zu vermeiden. Der Nachweis der His-getaggen Nfp-Proteine erfolgte mit einem monoklonalen Maus Anti-His Antikörper (1:5000 verdünnt) der Firma GE Healthcare, UK. Der primäre spezifische Anti-His Antikörper wurde wiederum mit einem Peroxidase-konjugierten zweiten Maus Antikörper IgG (1:5000 verdünnt) detektiert. Um die Signale der Bindung auf Autoradiographie-Filmen (Hyperfilm<sup>TM</sup>MP, GE Healthcare, UK) sichtbar machen zu können, wurde das ECL Western-Blot Detektionssystem (Firma GE Healthcare, UK) nach Protokoll verwendet. Die Belichtungszeit variierte je nach Probe zwischen 20 sec und 60 min.

### **2.3.7. Black-Lipid-Bilayer Methode**

Das Verfahren der Black-Lipid-Bilayer Experimente wurde bereits beschrieben (Benz *et al.*, 1978). Die Messapparatur ist auf einer schwingungsgedämpften Unterlage aufgebaut, um erschütterungsbedingte Signalschwankungen und ein Zerreißen der Membran zu reduzieren. Die Messküvette und die Elektroden befinden sich in einem Metallgehäuse, welches als Faraday'scher Käfig wirkt. Durch ein Loch im Metallgehäuse kann die Membran mit einem Ablesefernrohr beobachtet werden. Eine externe Lichtquelle ermöglicht eine Beleuchtung der Membran. Die um 10° schräggestellte Trennwand zwischen den Kompartimenten bewirkt, dass

Lichtreflexionen am Glasfenster der Küvette die Beobachtung nicht stören. Unter dem Metallgehäuse befindet sich ein Magnetrührer, der eine Mischung der Elektrolytlösung durch kleine Magnetrührfische erlaubt.

Das Kernstück der Apparatur ist die Teflonküvette, die durch eine Trennwand in zwei Kompartimente geteilt ist. In der Trennwand befindet sich eine kreisförmige Öffnung, die auf der Vorderseite kegelförmig gesenkt ist (Bohrungsstärke: 0,07 mm; Bohrungsfläche: 0,5 mm<sup>2</sup>). Der Lipidfilm wird über die Öffnung gespreitet. Die in dieser Arbeit verwendeten künstlichen Lipidbilayermembranen wurden mithilfe des 1%-igen (w/v) in *n*-Dekan gelösten Diphytanoylphosphatidylcholin (PC) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) generiert. Die Öffnung schillert zunächst in den Newton'schen Farben, bis durch Abfließen der Lösung aus dem vielschichtigen Lipidfilm eine bimolekulare Schicht entstanden ist. Der erhaltene Bilayer hat die Dicke einer natürlichen Membran (ca. 6 nm) und erscheint schwarz. Die Nfp<sub>NHis</sub>-Ansätze konnten daraufhin in die Elektrolytlösungen zugegeben werden. Das sog. „Schwarzwerden“ der Membran beruht darauf, dass das von der Membran auf der Vorder- und Rückseite reflektierte Licht einen Gangunterschied von  $\lambda/2$  besitzt und sich die Wellen der gleich großen Amplituden gegenseitig auslöschen. Die flächenspezifische Leitfähigkeit einer reinen Lipidmembran beträgt in 1 M NaCl-Lösung etwa 10 nS/cm<sup>2</sup>. In die elektrolytgefüllten Kompartimente tauchen Ag/AgCl-Elektroden ein. Eine Elektrode ist an die Spannungsquelle angeschlossen, die andere leitet den durch die Membran fließenden Strom ab. Sie ist je nach Art der Messung mit einem Elektrometer (Selektivitätsmessung) oder einem Verstärker (Einzelkanalmessung) verbunden. Der Verstärker (Keithley 427) wandelt ein Stromsignal in ein Spannungssignal mit einer Verstärkung von 10<sup>7</sup> V/A bis zu 10<sup>11</sup> V/A um und überträgt das Signal auf einen Streifenschreiber und ein Oszilloskop. Die Temperatur während den Messungen betrug durchweg 20°C.

Wenn ein Kanal spannungsabhängig ist, hängt sein Öffnungszustand von dem Spannungswert ab, der über dem Kanal anliegt. Viele Porine schließen, wenn die Spannung einen bestimmten Wert überschreitet. Diese Schaltvorgänge erfolgen nicht nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, sondern über Zwischenstufen. Verantwortlich hierfür sind Konformationsänderungen der Proteine, geladene Gruppen treten in Wechselwirkung mit dem anliegenden elektrischen Feld. Mit der Messung der Spannungsabhängigkeit der Nfp<sub>NHis</sub>-Inkubationen wurde begonnen, sobald nach einiger Zeit (10 – 15 min) kaum mehr Poren in die Membran eingebauten. Der Schreiberstift wurde auf die Papiermitte justiert und Spannungen bis maximal +/-200 mV ausgehend von +/-10 mV in 10 mV Schritten angelegt. Die Höhe des Schreiberausschlags nach Einschalten der Spannung entspricht der Summe der Einzelkanal-Leitfähigkeiten der eingebauten offenen Kanäle. Besteht eine Spannungsabhängigkeit, werden

einzelne Kanäle schließen, die Leitfähigkeit der Membran wird abnehmen und der Schreiberausschlag sich somit verringern. Die jeweilige Spannung wurde solange angelegt bis die Leitfähigkeit nicht mehr abnahm, d.h. der Endwert  $G$  erreicht wurde. Der bei  $\pm 10$  mV gemessene Wert der Leitfähigkeit wird als  $G_o$ , als Leitfähigkeit ohne angelegte Spannung, bezeichnet. Bei dieser Spannung sind unter Standardversuchsbedingungen (10 mM Tris/ 1 M KCl/pH 8) alle Poren geöffnet bzw. schließen nur sehr langsam. Das Verhältnis der Leitfähigkeit  $G$  bei einer angelegten Spannung  $V_m$  zur ursprünglichen Leitfähigkeit  $G_o$  wird gegen die angelegte Spannung  $V_m$  aufgetragen. Auf diese Weise ergeben sich Glockenkurven der Spannungsabhängigkeit.

## 2.4. Ergebnisse

### 2.4.1. Hypothetisch für Porine codierende Gene aus *N. farcinica*

In den Arbeiten von Rieß (1997 *Diplomarbeit*; Rieß *et al.*, 1998) konnten eine oligomere und nach dessen Hitzedenaturierung zwei monomere native Proteinbanden aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) erhalten werden (siehe Abb. 2.1.), die allesamt einer Sequenzanalyse nach Edman unterzogen wurden. Das aufgereinigte Oligomer zeigte eine molekulare Laufhöhe von 87 kDa. Die Sequenzierung des aufgereinigten 87 kDa Oligomers ergab eine N-terminale Teilsequenz von 21 Aminosäuren: DTFVPLPGGQIV/(T)KPLDNXTDV. In Position 12 dieser Teilsequenz konnten Signale für Valin (V) und Tyrosin (T) gefunden werden; X steht für eine nicht bestimmbar Aminosäure (siehe Abb. 2.1.). Zusätzlich konnte für das 87 kDa-Protein eine weitere Teilsequenz nach N-terminalem Edman Abbau und sich anschließender Cyanbromid-Spaltung (CNBr) generiert werden. Diese Teilsequenz wiederum enthielt 31 Aminosäuren: MAANGAGRVVWVSGNAQA/(V)DVTG/(V)G/(T)PENXVGP/(K)N. Die Signale in den Positionen 18, 22, 23 und 30 konnten nicht eindeutig zugeordnet bzw. die Aminosäure an Position 27 nicht identifiziert werden. Das 87 kDa-Oligomer ist sehr hitzestabil. Nach einer mehrminütigen Hitzedenaturierung konnte eine Dissoziation in zwei putative Monomere von 23 kDa und 19 kDa beobachtet werden (Rieß *et al.*, 1998). Der Edman-Abbau bzw. die Cyanbromid-Spaltung (CNBr) der mutmaßlichen, monomeren Banden führten zu weiteren Teilsequenzen, die wiederum mit denen aus der oligomeren Bande identisch waren (Rieß, 1997 *Diplomarbeit*). Es konnte ein weiteres Teilpeptid mit der Sequenz MQXTPVHRNAXVXGSAQ (X=nicht bestimmbar Aminosäuren) erhalten werden. Damit konnten insgesamt drei verschiedene Teilsequenzen aus dem Oligomer und den monomeren Banden erhalten werden. Ein BLAST dieser drei Teilsequenzen gegen die Proteindatenbank von NCBI zeigte eine Übereinstimmung mit sechs hypothetischen Proteinen aus *N. farcinica* IFM 10152 (Ishikawa *et al.*, 2004), die allesamt Homologien zum bekannten MspA aus *M. smegmatis* aufweisen. Darüber hinaus ergab der BLAST eine Identität von porenformenden Proteinen aus *Mycobacterium phlei* und *Tsukamurella inchonensis* (Dörner *et al.*, 2004).

Die sechs hypothetischen Proteine (Nfa15890, Nfa15900, Nfa33390, Nfa33400, Nfa49580 und Nfa49590) aus *N. farcinica* IFM 10152 besitzen zudem N-terminale Signalsequenzen, welche sie als Proteine der äußeren Membran charakterisieren (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) und die obligatorisch für Proteine sind, die über den *Sec* Apparat transportiert werden (Freudl, 1992). Zudem liegen jeweils zwei der sechs Gene direkt

hintereinander auf dem Chromosom und diese Tatsache auf eine gemeinsame Transkription der Tandempaare *nfa15890-nfa15900*, *nfa49590-nfa49580* und *nfa33400-nfa33390* schließen lässt.

Ein Alignment zwischen den drei generierten Teilsequenzen und den sechs hypothetischen Proteinen aus *N. farcinica* IFM 10152 ist in Abbildung 2.1. dargestellt. Dabei sind die mit den jeweiligen Teilsequenzen identischen Aminosäuren in grün hervorgehoben. Die sechs Proteine lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die jeweils noch stärkere Homologien zueinander besitzen. Die eine Gruppe besteht aus Nfa15890, Nfa33400 und Nfa49590 (Abb. 2.1.; dunkelgrau unterlegt), die andere Gruppe aus Nfa15900, Nfa33390 und Nfa49580 (Abb. 2.1.; hellgrau unterlegt). Dementsprechend sind die jeweils vom Translationsstartpunkt aus gesehen vorderen Partner (Nfa15890, Nfa33400 und Nfa49590; 60%-ige Identität der Aminosäuren) sowie die jeweiligen hinteren Partner (Nfa15900, Nfa33390 und Nfa49580; 54%-ige Identität der Aminosäuren) zueinander homologer als die Tandempaare untereinander selbst (33% für Nfa15890-Nfa15900, 28% für Nfa33400-Nfa33390 bzw. 34% für Nfa49590-Nfa49580). Das Genpaar *nfa15890-nfa15900* wird vom Plus-Strang, die beiden anderen Paare werden vom Minus-Strang codiert.

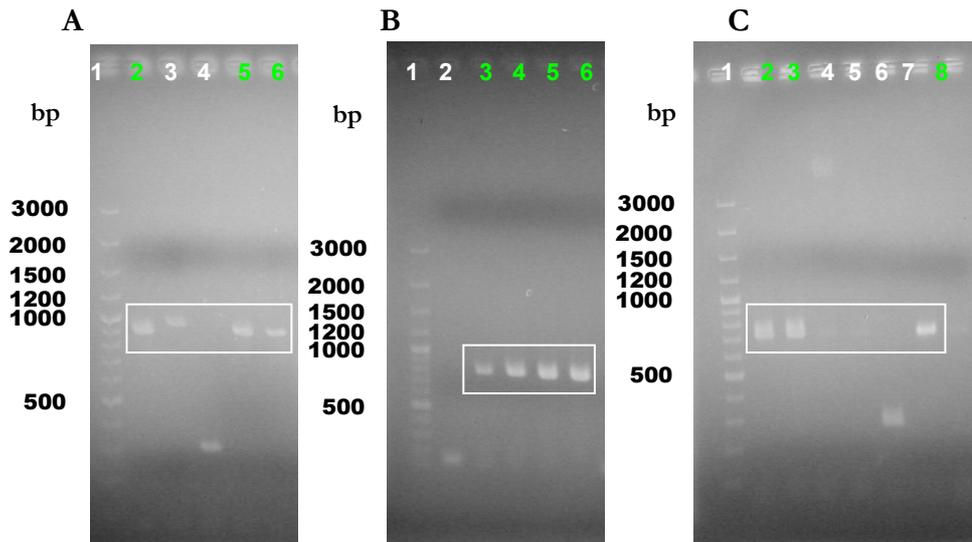
Um die porenformende Zuordnung der sechs hypothetischen Proteine aus *N. farcinica* IFM 10152 beweisen zu können, wurde zunächst das Tandempaar *nfa15890-nfa15900* rekombinant mithilfe des Expressionsvektors pARAJ2S2 kloniert, weil nach dem Vergleich aller erhaltenen N-terminalen Teilsequenzen die stärksten Homologien mit Nfa15890 und Nfa15900 gefunden werden konnten. Darüber hinaus konnte das Gen *nfa49590* alleine bzw. als Tandemgen *nfa49590+nfa49580* mithilfe des Vektors pARAJ2S2 in *E. coli* B121DE3Omp8 exprimiert, aufgereinigt und als NfpC<sub>NHis</sub> sowie NfpC<sub>NHis</sub>+NfpD benannt werden.

	10                      20	
	▼... ... ... ... ... .	
	DTFVPLPGGQIVKPLDNXTDV	
	T	
Nfa15890	DTFVPLEDGGKVGPGVTIIRT	55%
Nfa15900	DTFVPLPGGEITKTLSDGTVV	68%
Nfa49590	DTFVPLEDGGKVGPGVTIIRT	55%
Nfa49580	DTFVPLPGGEITKTLSDGTVV	68%
Nfa33400	DVFVPLEDGGQETTPGATLIIRT	50%
Nfa33390	DTVVPLPGGAVTETLGDGTVV	55%
	10                      20                      30	
	... ... ... ... ... ... .	
	MAANGAGR V V V V S G N A Q A D V T G G P E N X V G P N	
	V                      V T                      K	
Nfa15890	MAANGAGRVAWVSGNATADVTVTPEGEVGP	87%
Nfa15900	MGATPVHRNAWVSGSAQVEISGGGEDVGGKI	48%
Nfa49590	MAANGAGR V V V V S G N A S A D V T V T P E G E V G P N	90%
Nfa49580	MGSTPVHRNAWVSGSAQVEISGGGEDVGGKI	45%
Nfa33400	MAANGAGR V V V V S G T V T A E V T D T P T V E R P G P	64%
Nfa33390	MGATPLHRNAWVSASAQFLSSAPARAKIRFG	32%
	10	
	... ... ... ... .	
	MQXTPVHRNAXVXGSAQ	
Nfa15890	MAANGAGRVAWVSGNAT	35%
Nfa15900	MGATPVHRNAWVSGSAQ	76%
Nfa49590	PTGNPGSNNSSSTHGASQ	24%
Nfa49580	MGSTPVHRNAWVSGSAQ	76%
Nfa33400	PENWPGTNNSSSTHGASQ	24%
Nfa33390	MGATPLHRNAWVSASAQ	64%

Abb.2.1. Alignment zwischen den drei Teilsequenzen und den sechs hypothetischen Proteinen aus *N. farinica* IFM 10152. Die jeweiligen drei zueinander homologeren Proteine sind hell- bzw. dunkelgrau unterlegt. Identische Aminosäuren, die die jeweiligen Teilsequenzen und die sechs Proteine miteinander teilen, sind grün markiert. Die jeweilige Identität der Aminosäuren ist in Prozent rechts neben den sechs Proteinen angegeben.

#### 2.4.2. Klonierung der *Nfp*-Monomere

Um die rekombinante Expression der zugehörigen Proteine im heterologen *E. coli* Bl21DE3Omp8 Stamm ermöglichen zu können, wurden die entsprechenden amplifizierten Fragmente mithilfe der chromosomalen DNA [*N. farinica* N236 IMMIB (ATCC 3318)] in die Klonierungsvektoren pJet1 (Fermentas) bzw. pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) nach Protokoll eingefügt. Daraus resultierten die Konstrukte pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup>\_*nfpA*, pJET1\_*nfpA* sowie pJET1\_*nfpB*. Mithilfe dieser Plasmide wurden kompetente *E. coli* Neb5 $\alpha$ -Zellen bzw. *E. coli* Top10F<sup>-</sup>-Zellen nach Protokoll chemisch transformiert und diese auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Positive Klone wurden über eine Kolonie-PCR mithilfe der entsprechenden Primer auf den Einbau des richtigen Fragments überprüft (siehe Abb. 2.2.). In Abbildung 2.2.A. belegen die Spuren 2, 3, 5 und 6 die zu erwartenden Banden für das Gen *nfpA* mit einer Laufhöhe von 850 Basenpaaren. Abbildung 2.2.B. bestätigt das kürzere Fragment *nfpA*' in den Spuren 3 – 6 mit einer Höhe von 600 – 700 Basenpaaren. Abbildung 2.2.C. zeigt in den Spuren 2, 3 und 8 die Banden für das Gen *nfpB* in einer Höhe von 750 Basenpaaren. Positive Transformanten (grüne Ziffern) wurden auf eine weitere LB-Amp-Platte übertragen und somit gesichert. Aus diesen wurden später Stammkulturen angelegt. Aus den positiven Klonen wurde das Plasmid präpariert und mit den jeweiligen Primern auf deren Richtigkeit sequenziert.



**Abb.2.2.** Kolonie-PCR nach Ligation der amplifizierten Fragmente *nfpA*, *nfpA'* und *nfpB* in die Klonierungsvektoren.

A 2%-iges Agarosegel nach Kolonie-PCR von *E. coli* Top10F<sup>-</sup> pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup><sub>nfpA</sub>.

Spur 1: 5 µl Generuler™ 100 bp DNA Ladder plus;

Spur 2–6: 10 µl PCR-Produkt verschiedener Klone mit den Primern M13 FP/M13 RP.

B 2%-iges Agarosegel nach Kolonie-PCR von *E. coli* Neb5α pJet1<sub>nfpA'</sub>.

Spur 1: 5 µl Generuler™ 100 bp DNA Ladder plus;

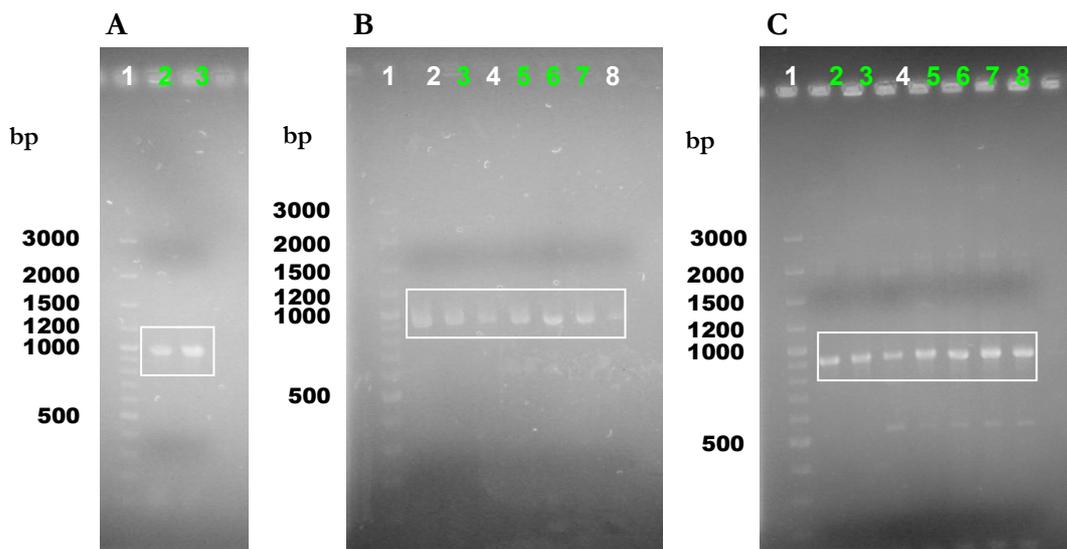
Spur 2–6: 10 µl PCR-Produkt verschiedener Klone mit den Primern pJet1FP/ pJet1 RP.

C 2%-iges Agarosegel nach Kolonie-PCR von *E. coli* Neb5α pJet1<sub>nfpB</sub>.

Spur 1: 5 µl Generuler™ 100 bp DNA Ladder plus;

Spur 2–8: 10 µl PCR-Produkt verschiedener Klone mit den Primer pJet1 FP/pJet1 RP.

Für die Klonierung der amplifizierten Fragmente in den Expressionsvektor pARAJ2, mussten sowohl der Vektor pARAJ2, als auch die obigen, generierten Konstrukte mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut werden. Nach dem Verdau erfolgte die Reinigung von Enzymen und Salzen über ein Agarosegel, aus dem die entsprechende DNA aus den Banden eluiert wurde. Nach der finalen Ligation entstanden die Konstrukte pARAJ2<sub>nfpA</sub>, pARAJ2<sub>nfpA'</sub> und pARAJ2<sub>nfpB</sub>. Mithilfe dieser Plasmide wurden kompetente *E. coli* Neb5α-Zellen bzw. *E. coli* Top10F<sup>-</sup>-Zellen nach Protokoll chemisch transformiert, diese auf LB-Amp-Platten ausplattiert und die positiven Klone über eine Kolonie-PCR mithilfe der entsprechenden Primer auf den Einbau des richtigen Fragments überprüft (siehe Abb. 2.3.). Die ausgewählten Konstrukte (Abb. 2.3.; grüne Ziffern) wurden auf deren Richtigkeit sequenziert, bevor sie in den *E. coli* Bl21DE3Omp8 Expressionsstamm transformiert werden konnten.



**Abb.2.3.** Kolonie-PCR nach Ligation der amplifizierten Fragmente *nfpA*, *nfpA'* und *nfpB* in den Expressionsvektor.

**A** 2%-iges Agarosegel nach Kolonie-PCR von *E. coli* Top10F' pARAJS2\_ *nfpA*.

**Spur 1:** Generuler™ 100 bp DNA Ladder plus;

**Spur 2–3:** 10 µl PCR-Produkt verschiedener Klone mit den Primern pARAJS2 FP/pARAJS2 RP.

**B** 2%-iges Agarosegel nach Kolonie-PCR von *E. coli* Neb5a pARAJS2\_ *nfpA'*.

**Spur 1:** 5 µl Generuler™ 100 bp DNA Ladder plus;

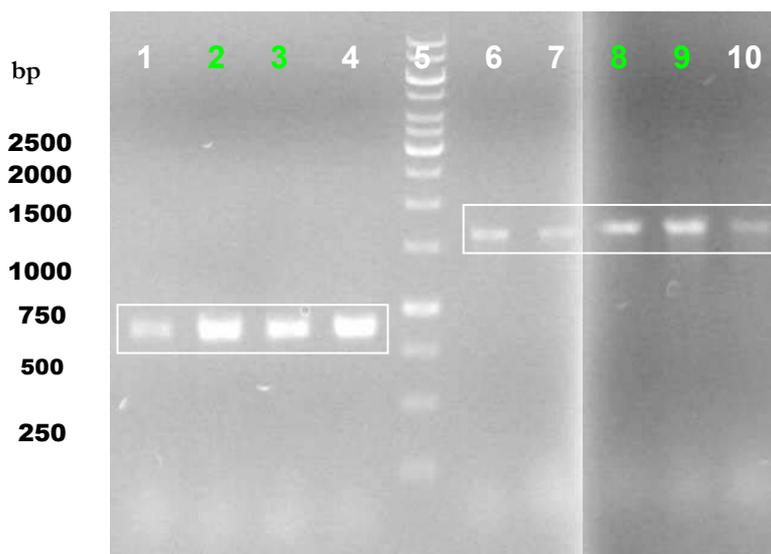
**Spur 2–8:** 10 µl PCR-Produkt verschiedener Klone mit den Primern pARAJS2 FP/pARAJS2 RP.

**C** 2%-iges Agarosegel nach Kolonie-PCR von *E. coli* Neb5a pARAJS2\_ *nfpB*.

**Spur 1:** 5 µl Generuler™ 100 bp DNA Ladder plus;

**Spur 2–8:** 10 µl PCR-Produkt verschiedener Klone mit den Primern pARAJS2 FP/pARAJS2 RP.

In analoger Weise konnte das Gen *nfa49590* alleine bzw. als Tandemgen *nfa49590+nfa49580* in den Vektor pARAJS2 ligiert werden. Das 1%-ige Agarosegel in Abbildung 2.4. bestätigt die Richtigkeit für das Gen *nfpC* bei 750 Basenpaaren sowie bei etwa 1500 Basenpaaren für das Doppelprodukt *nfpC+nfpD*. Die ausgewählten Konstrukte (Abb. 2.4.; grüne Ziffern) wurden wiederum auf deren Richtigkeit sequenziert, bevor sie in den *E. coli* B121DE3Omp8 Expressionsstamm transformiert werden konnten.



**Abb.2.4.** Kolonie-PCR nach Ligation der amplifizierten Fragmente *nfpC* und *nfpC+nfpD* in den Expressionsvektor.

1%-iges Agarosegel nach Kolonie-PCR von *E. coli* Neb5 $\alpha$  pARAJS2\_ *nfpC* und *E. coli* Neb5 $\alpha$  pARAJS2\_ *nfpC+nfpD*.

**Spur 1–4:** 10  $\mu$ l PCR-Produkt verschiedener Klone (pARAJS2\_ *nfpC*)

mit den Primern pARAJS2 FP/pARAJS2 RP;

**Spur 5:** 5  $\mu$ l GeneRuler™ 1kb DNA Ladder;

**Spur 6–10:** 10  $\mu$ l PCR-Produkt verschiedener Klone (pARAJS2\_ *nfpC+nfpD*)

mit den Primern pARAJS2 FP/pARAJS2 RP.

### 2.4.3. Induktion und Expression der Nfp-Monomere in *E. coli*

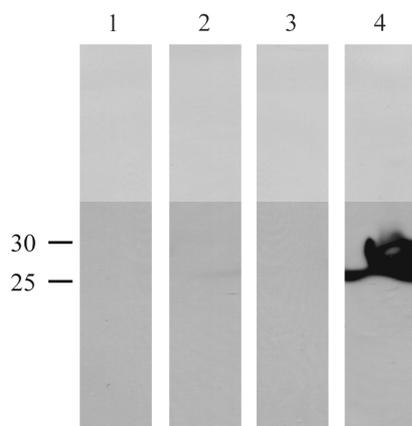
Beide rekombinanten Monomere NfpA<sub>NHis</sub> und NfpA'<sub>NHis</sub> wurden vom Gen *nfa15890* ohne die ersten 83 bzw. 122 Nukleotide abgeleitet. Das neue offene Leseraster innerhalb des Expressionsvektors pARAJS2 beinhaltet nach der Ligation für beide Gene ein ATG Startcodon, eine *E. coli* OmpT Signalsequenz, eine Protease-Schnittstelle, einen 10-fachen Histidin Tag plus eine XA-Spaltstelle (AEGR) sowie das jeweilige Gen *nfa15890* bzw. *nfa15900* in 5' nach 3' Orientierung. Eine Translation beider Konstrukte mittels ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>) ergab jeweils ein Protein mit einer Aminosäurenlänge von 246 bzw. 233. NfpB<sub>NHis</sub> sowie NfpC<sub>NHis</sub> wurden in analoger Weise von *nfa15900* bzw. *nfa49590* ohne die ersten 86 bzw. 138 Nukleotide abgeleitet und mündeten in eine Länge von jeweils 240 bzw. 191 Aminosäuren. Zusätzlich zur Aminosäurenabfolge bzw. -länge wurde das Molekulargewicht der rekombinanten Nfp-Monomere mithilfe von ExPASy ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)) bestimmt. Nach der Computervorhersage ergaben

sich Werte von 25,7 kDa (NfpA<sub>NHis</sub>), 24,6 kDa (NfpA'<sub>NHis</sub> und NfpB<sub>NHis</sub>) und 24,0 kDa (NfpC<sub>NHis</sub>). Da die mit dem ExPASy Tool ermittelten Größen für die prozessierten, nativen Monomere Nfa15890, Nfa15900 bzw. Nfa49590 (19,8 kDa, 20,5 kDa bzw. 19,3 kDa) von den empirisch ermittelten Werten (ca. 24 kDa) der nativen Monomere (Rieß, 1997 *Diplomarbeit*) abweichen, wurden die zu erwartenden Molekulargewichte für die drei rekombinanten Nfp-Monomere folgendermaßen abgeleitet. Es wurde die Differenz der errechneten Molekularmasse zwischen NfpA<sub>NHis</sub> und Nfa15890 bzw. NfpA'<sub>NHis</sub> und Nfa15890 sowie zwischen NfpB<sub>NHis</sub> und Nfa15890 bzw. NfpC<sub>NHis</sub> und Nfa49590 ermittelt. Diese betrug für die einzelnen Proteine 5,9 kDa, 4,8 kDa, 4,1 kDa bzw. 4,7 kDa (siehe Tab. 2.4.). Die empirisch ermittelten Molekulargewichte der nativen Monomere plus der hier ermittelten Differenz bestätigen die empirischen Werte der jeweiligen rekombinanten Nfp-Monomere und wurden daher als die zu erwartenden Molekulargewichte der rekombinanten Proteine definiert (siehe Tab. 2.4.). Dies sind im einzelnen 31 kDa für NfpA<sub>NHis</sub> bzw. 30 kDa für NfpA'<sub>NHis</sub>, NfpB<sub>NHis</sub> und NfpC<sub>NHis</sub>.

**Tab.2.4.** Computergestützte bzw. empirische Kalkulation der molekularen Massen rekombinanter Nfp-Monomere sowie der jeweiligen Vorläuferproteine Nfa15890, Nfa15900 und Nfa49590.

Protein	Aminosäuren	PI Tool	Berechnung der Molekulargewichte	Empirische Molekulargewichte in 4x SDS Redmix Puffer
Nfa15890 (prozessiert)	191	19,8 kDa	-	~24 kDa
NfpA <sub>NHis</sub>	246	25,7 kDa	~24 kDa + 5,9 kDa	~31 kDa
NfpA' <sub>NHis</sub>	233	24,6 kDa	~24 kDa + 4,8 kDa	~30 kDa
Nfa15900 (prozessiert)	198	20,5 kDa	-	~24 kDa
NfpB <sub>NHis</sub>	240	24,6 kDa	~24 kDa + 4,1 kDa	~30 kDa
Nfa49590 (prozessiert)	191	19,3 kDa	-	~24 kDa
NfpC <sub>NHis</sub>	234	24,0 kDa	~24 kDa + 4,7 kDa	~30 kDa

Für die Überprüfung der gezielten Expression der jeweiligen Konstrukte, wurden die *E. coli* Bl21DE3Omp8 Stämme mit den entsprechenden Expressionsplasmiden kultiviert. Als Negativkontrolle konnte der *E. coli* Bl21DE3Omp8 Stamm *ohne* die jeweiligen Expressionsplasmide verwendet werden. *Vor* bzw. *nach* der Induktion wurde die jeweilige Kultur (ganze Zellen) abzentrifugiert, das gewonnene Zellpellet in 4x SDS Puffer gelöst und mit den erhaltenen Proben ein Western-Blot durchgeführt. Abbildung 2.5. bestätigt die gezielte Expression der Monomere nach der Arabinosezugabe. Stellvertretend für alle hergestellten rekombinanten Nfp-Monomere zeigt NfpB<sub>NHis</sub> in Spur 4 ein Molekulargewicht bei ca. 30 kDa. Spur 3 hingegen zeigt kein Signal des NfpB<sub>NHis</sub>-Monomers, weil die Expression des Monomers aufgrund der fehlenden Arabinosezugabe nicht erfolgen konnte. Zusätzlich bestätigen die Spuren 1 und 3 die selektive Bindung des Anti-His Antikörpers (GE Healthcare), weil alle verwendeten *E. coli* Bl21DE3Omp8 Stämme lediglich nach der gezielten Expression ein Signal zeigten. Die restliche Kultur wurde abzentrifugiert und deren Zellpellet mithilfe der French-Press Methode aufgebrochen.



**Abb.2.5.** Western-Blot der gezielten Expression von NfpB<sub>NHis</sub> nach einer Belichtungszeit von 30 s. Die molekularen Laufhöhen sind links angegeben.

**Spur 1:** ganze Zellen *E. coli* Bl21DE3Omp8 in 4x Redmix *vor* Induktion (Kontrolle);

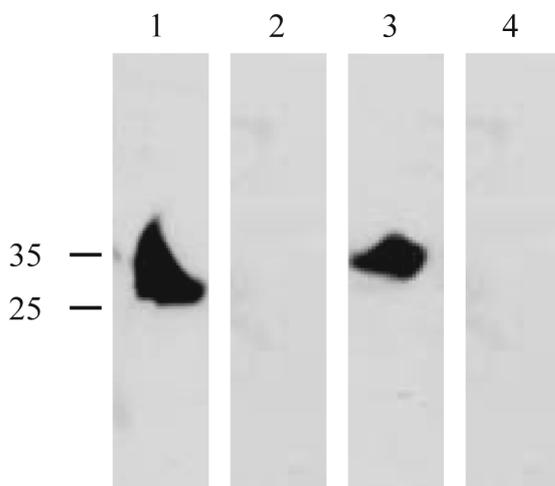
**Spur 2:** ganze Zellen *E. coli* Bl21DE3Omp8 pARAJ2\_nfpB in 4x Redmix *vor* Induktion;

**Spur 3:** ganze Zellen *E. coli* Bl21DE3Omp8 in 4x Redmix *nach* Induktion (Kontrolle);

**Spur 4:** ganze Zellen *E. coli* Bl21DE3Omp8 pARAJ2\_nfpB in 4x Redmix *nach* Induktion.

#### 2.4.4. Aufreinigung der Nfp-Monomere

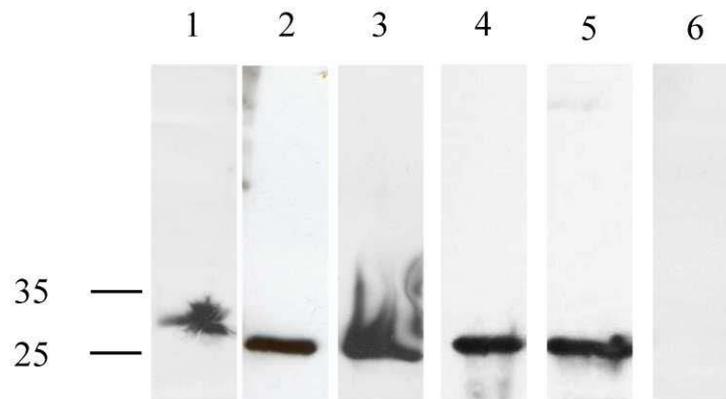
Der Western-Blot in Abbildung 2.6. bestätigt das Vorhandensein der rekombinanten Nfp-Monomere sowohl in der Cytosol- als auch in der Membranfraktion. Erwartet wurden erneut die gleichen Bandenhöhen wie in Abbildung 2.5. Abbildung 2.6. zeigt stellvertretend für alle Nfp-Monomere deutliche Signale des NfpA<sub>NH<sub>2</sub></sub>-Monomers in den Spuren 1 und 3 bei etwa 30 kDa. Die Spuren 2 und 4 beinhalten die Proteine der *E. coli* Bl21DE3Omp8 Kontrollstämme *ohne* die jeweiligen Expressionsplasmide.



**Abb.2.6.** Western-Blot der Expression von NfpA<sub>NH<sub>2</sub></sub> nach einer Belichtungszeit von 30 s. Die molekularen Laufhöhen sind links angegeben.

**Spur 1:** Überstand Cytosolfraction *E. coli* Bl21DE3Omp8 pARAJS2\_nfpA ;  
**Spur 2:** Überstand Cytosolfraction *E. coli* Bl21DE3Omp8 (Kontrolle);  
**Spur 3:** Überstand Membranfraktion *E. coli* Bl21DE3Omp8 pARAJS2\_nfpA ;  
**Spur 4:** Überstand Membranfraktion *E. coli* Bl21DE3Omp8 (Kontrolle).

Die aufgereinigten Proben wurden sowohl mithilfe des Western-Blots als auch mithilfe der Silberfärbung auf das Vorhandensein der rekombinanten Proteine bzw. deren Reinheit überprüft (siehe Abb. 2.7. und 2.8.). Abbildung 2.7. bestätigt die gezielte Expression aller generierten Nfp-Monomere dieser Arbeit bei einer molekularen Laufhöhe um die 30 kDa. Lediglich NfpA<sub>NH<sub>2</sub></sub> weist aufgrund seiner längeren nativen Signalsequenz eine molekulare Laufhöhe von 31 kDa auf. Die Spuren 1 – 4 zeigen diese putativen rekombinanten Nfp-Monomere nach deren Aufreinigung mithilfe der **Immobilisierten Metallionen-Affinitäts-Chromatographie**. In Spur 5 wird deutlich, dass die heterologe Expression des Doppelprodukts NfpC<sub>NH<sub>2</sub></sub>+NfpD nur die Translation des Gens *nfa49590* lieferte (siehe 2.5.6.). Spur 6 belegt den selektiven Nachweis der rekombinanten Nfp-Monomere, weil der *E. coli* Bl21DE3Omp8 Stamm *ohne* die entsprechenden rekombinanten Plasmide keine Bande erkennen lässt.



**Abb.2.7.** Western-Blot der Nfp-Monomere nach der gezielten Expression und IMAC-Aufreinigung (Belichtungszeit 30 s). Die molekularen Laufhöhen sind links angegeben.

**Spur 1:** Überstand Cytosolfraktion *E. coli* Bl21DE3Omp8 **pARAJS2\_nfpA**;

**Spur 2:** Überstand Cytosolfraktion *E. coli* Bl21DE3Omp8 **pARAJS2\_nfpB**;

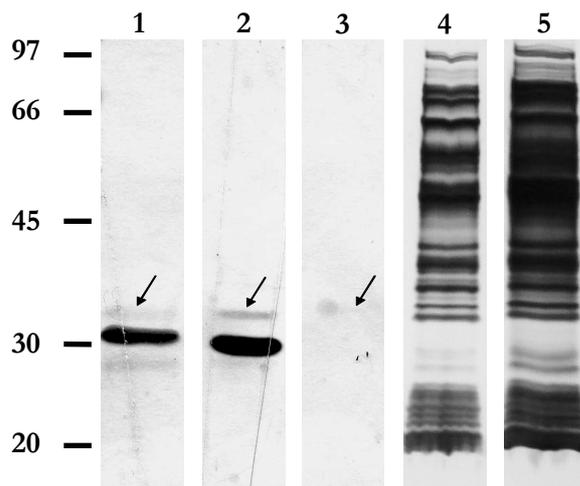
**Spur 3:** Überstand Cytosolfraktion *E. coli* Bl21DE3Omp8 **pARAJS2\_nfpA** ;

**Spur 4:** Überstand Cytosolfraktion *E. coli* Bl21DE3Omp8 **pARAJS2\_nfpC**;

**Spur 5:** Überstand Cytosolfraktion *E. coli* Bl21DE3 Omp8 **pARAJS2\_nfpC+nfpD**;

**Spur 6:** Überstand Cytosolfraktion *E. coli* Bl21DE3Omp8 (Kontrolle).

Die erfolgreiche Aufreinigung der Nfp-Monomere ist in Abbildung 2.8. dargestellt. Die Proteine wurden dabei unmittelbar nach der **Immobilisierten Metallionen-Affinitäts-Chromatographie** über die SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. Die Spuren 1 und 2 zeigen die beiden aufgereinigten Nfp-Monomere NfpA<sub>NHis</sub> und NfpB<sub>NHis</sub>. Zusätzlich wurde in Spur 3 der *E. coli* Bl21DE3Omp8 Stamm *ohne* die entsprechenden rekombinanten Plasmide aufgetragen. Dementsprechend ist hierbei keine Bande zu erkennen. In den Spuren 4 und 5 befinden sich die jeweiligen ersten Waschschriffe, die im Rahmen der **Immobilisierten Metallionen-Affinitäts-Chromatographie** gewonnen werden konnten.



**Abb.2.8.** Silbergefärbte 12%-ige SDS-PAGE (Laemmli, 1970) der jeweils heterolog in *E. coli* BL21DE3Omp8 exprimierten  $NfpA_{NHis}$  und  $NfpB_{NHis}$ -Proteine nach der IMAC-Aufreinigung.

**Spur 1:** Elution *E. coli* BL21DE3Omp8 pARAJS2\_ *nfpA*;

**Spur 2:** Elution *E. coli* BL21DE3Omp8 pARAJS2\_ *nfpB*;

**Spur 3:** Elution *E. coli* BL21DE3Omp8 (Kontrolle);

**Spur 4:** Waschschrift 1 *E. coli* BL21DE3Omp8 pARAJS2\_ *nfpA*;

**Spur 5:** Waschschrift 1 *E. coli* BL21DE3Omp8 pARAJS2\_ *nfpB*.

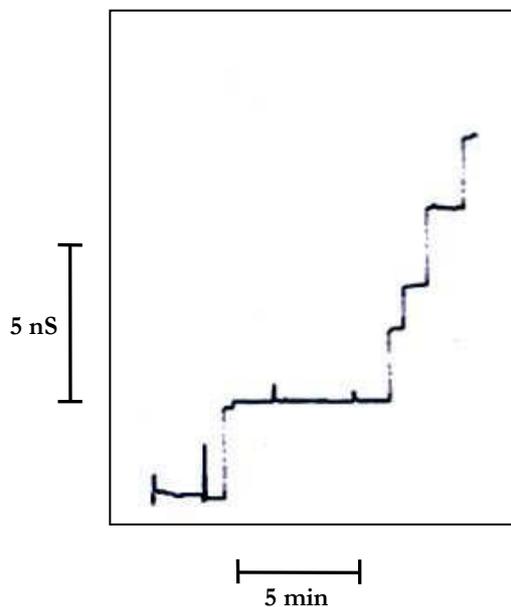
### 2.4.5. Einzelkanalmessung der Nfp-Oligomere

Im Gegensatz zu *mspA* aus *M. smegmatis* sollten die entsprechenden Tandempartner aus dem Genom von *N. farcinica* IFM 10152 das Oligomer lediglich *zusammen* formieren, weil sie im Chromosom direkt hintereinander liegen und daher eine gemeinsame Transkription vermuten lassen. Um die Frage zu lösen, inwieweit für die Bildung bzw. Aktivität der funktionalen Pore ein aus beiden Nfp-Monomeren bestehendes Oligomer verantwortlich ist, wurden die rekombinanten Proteine *einzel*n sowie *zusammen* mithilfe der Black-Lipid-Bilayer Methode nach der Aufreinigung untersucht.

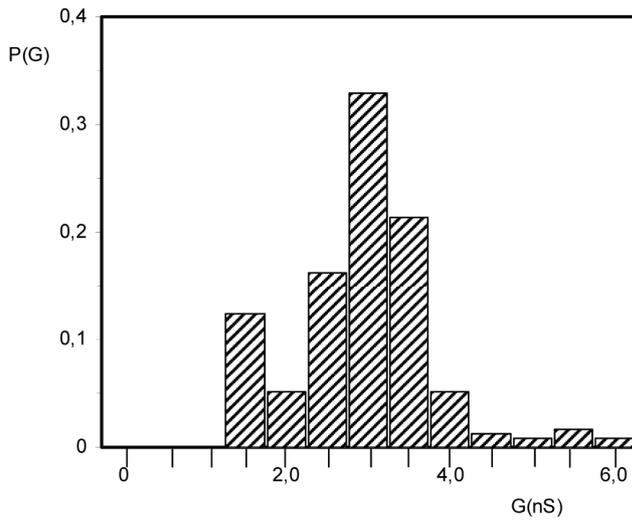
Abbildung 2.9. zeigt exemplarisch die Erhöhung der Einzelkanal-Leitfähigkeit nach der cis-Zugabe eines Ansatzes (30 ng/ml) bestehend aus  $NfpA_{NHis}$  und  $NfpB_{NHis}$ . Dabei ist deutlich die Leitfähigkeitszunahme in nahezu gleichmäßigen Schritten zu erkennen. Die Poren konnten nach der Aufreinigung lediglich nach dem Aussalzen mit der Ammoniumsulfat-Lösung detektiert werden. Diese Tatsache bestätigt ferner die Homologie zu MspA, weil auch hierbei erst nach der Behandlung mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung die Renaturierung durchgeführt sowie die Kristallstruktur erhalten werden konnte (Faller *et al.*, 2004). Weiterhin konnte die porenformende Aktivität tatsächlich nur nach der Inkubation *beider* korrespondierender Nfp-Monomere bestimmt werden. Der Ansatz aus *einem* Nfp-Monomer lieferte hingegen keine porenformende Aktivität. Nach der Zugabe des obigen Ansatzes wiesen 70% aller in die Membran inserierten Poren eine Einzelkanal-Leitfähigkeit zwischen 2,5 nS – 3,5 nS in 1 M KCl auf, wohingegen 12% aller Poren eine Einzelkanal-Leitfähigkeit von 1,5 nS zeigten.

Im Vergleich dazu konnte auch für das native Porin aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) mehrheitlich eine Einzelkanal-Leitfähigkeit von 3,0 nS in 1 M KCl beobachtet werden (Rieß *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnte ebenfalls die Hälfte der Einzelkanal-

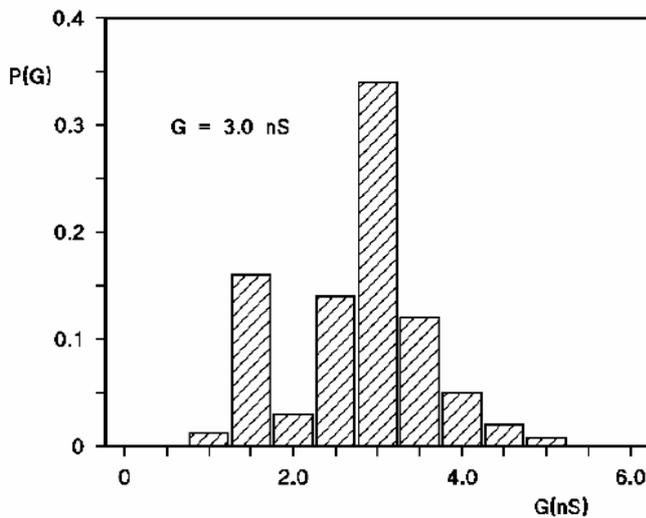
Leitfähigkeit mit 1,5 nS in 1 M KCl bestimmt werden (Rieß *et al.*, 1998). Abbildung 2.10. veranschaulicht die Übereinstimmung der Einzelkanal-Leitfähigkeitsmerkmale zwischen der nativen Pore aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) (Abb. 2.10.A.) und der rekombinanten Pore aus *N. farcinica* IFM 10152 (Abb. 2.10.B.). Damit konnte -nach dem Vergleich der beiden Histogramme zu urteilen- die Codierung der nativen Pore aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) durch die beiden Gene *nfa15890* und *nfa15900* bestätigt werden. Ein weiterer Inkubationsansatz bestehend aus NfpB<sub>NH<sub>is</sub></sub> und NfpC<sub>NH<sub>is</sub></sub>+NfpD (NfpC<sub>NH<sub>is</sub></sub>) zeigte ebenfalls eine Einzelkanal-Leitfähigkeit von 3,0 nS in 1 M KCl. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings noch keine genaue Auswertung der Einzelkanal-Leitfähigkeit für die Pore NfpB<sub>NH<sub>is</sub></sub>C<sub>NH<sub>is</sub></sub> per Histogramm erfolgen, weil insgesamt nur etwa 20 Einzelereignisse (3,0 nS) aufgezeichnet wurden. Nach den bisherigen Erkenntnissen kann man davon ausgehen, dass das Konstrukt pARAJ52\_*nfa49590+nfa49580* lediglich zu einer Expression von NfpC<sub>NH<sub>is</sub></sub> führt. Dies leitet sich daraus ab, dass das Aussalzen von NfpC<sub>NH<sub>is</sub></sub>+NfpD keine funktionale Pore ergab, während die Kombinationen des Produktes NfpC<sub>NH<sub>is</sub></sub>+NfpD mit dem korrespondierenden Einzelprodukt NfpB<sub>NH<sub>is</sub></sub> die identischen Einzelkanal-Leitfähigkeitswerte zu NfpA<sub>NH<sub>is</sub></sub>B<sub>NH<sub>is</sub></sub> lieferten.



**Abb.2.9.** Schreiberabzug der Einzelkanal-Leitfähigkeit nach der cis-Zugabe des Ansatzes bestehend aus **NfpA<sub>NH<sub>is</sub></sub>** und **NfpB<sub>NH<sub>is</sub></sub>** (30 ng/ml) in 1 M KCl (U= 20 mV; 10<sup>9</sup> V/A; 500 mV fsc; T= 20°C; 1% DiphPC in n-Dekan).



**Abb.2.10.A.** Histogramm der Einzelkanal-Leitfähigkeit nach der cis-Zugabe des Ansatzes bestehend aus **NfpA<sub>NHis</sub>** und **NfpB<sub>NHis</sub>** (30 ng/ml) in 1 M KCl ( $U = 20$  mV;  $10^9$  V/Å; 500 mV fsc;  $T = 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan, 234 Poren). Die beiden häufigsten Einzelkanal-Leitfähigkeitswerte betragen 3,0 nS bzw. 1,5 nS.

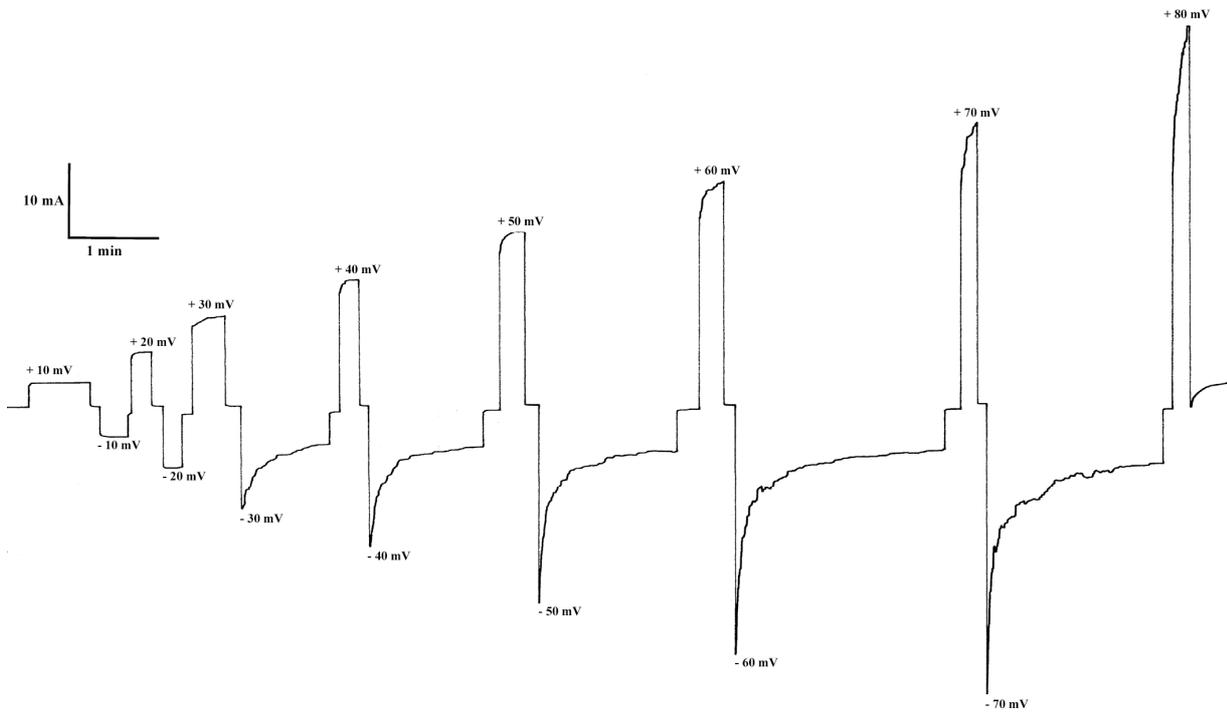


**Abb.2.10.B.** Histogramm der Einzelkanal-Leitfähigkeit nach der cis-Zugabe des **nativen Porins** aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) in 1 M KCl ( $U = 20$  mV;  $10^9$  V/Å; 500 mV fsc;  $T = 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan, 234 Poren). Die beiden häufigsten Einzelkanal-Leitfähigkeitswerte betragen 3,0 nS bzw. 1,5 nS (Rieß *et al.*, 1998).

#### 2.4.6. Spannungsabhängigkeit der Nfp-Oligomere

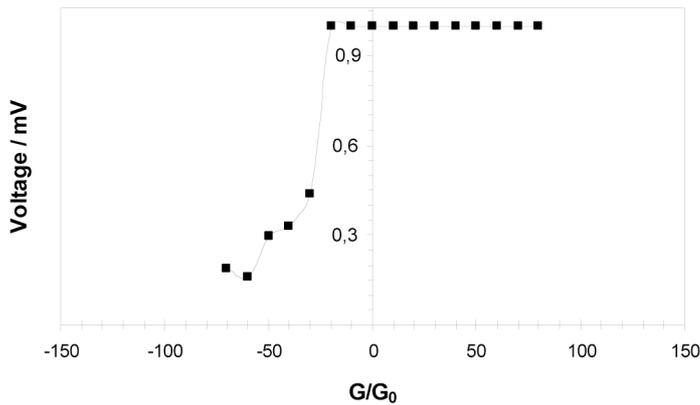
Die Spannungsabhängigkeit stellt ein für Porine höchst spezifisches Merkmal dar, anhand dessen sich Kanäle mit der gleichen Einzelkanal-Leitfähigkeit voneinander unterscheiden lassen. Abbildung 2.11. bestätigt die charakteristische Spannungsabhängigkeit der nativen Pore aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318). Nach der cis-Zugabe des obigen Ansatzes bestehend aus **NfpA<sub>NHis</sub>** und **NfpB<sub>NHis</sub>** konnte nach dem Anlegen einer Spannung von -30 mV der Stromfluss stark erniedrigt werden. Dies ist auch für alle weiteren gemessenen negativen Spannungen von -40 mV bis -70 mV der Fall. Bei den angelegten Spannungen von -20 mV bis +80 mV ist

hingegen kein Rückgang des Stromflusses zu beobachten. Dies veranschaulicht das selektive Schließen des nativen Kanals aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) bei negativen Spannungen ab -30 mV.

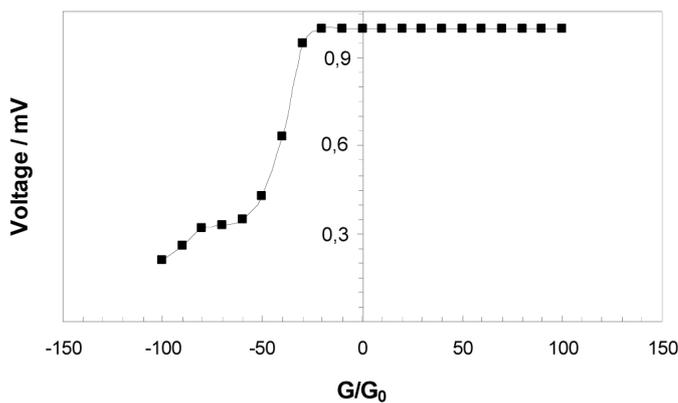


**Abb.2.11.** Messung der Spannungsabhängigkeit. Ansatz bestehend aus **NfpA<sub>NHIS</sub>** und **NfpB<sub>NHIS</sub>** (30 ng/ml) in 1 M KCl (U= 20 mV; 10<sup>8</sup> V/A; 20 V fsc; T= 20°C; 1% DiphPC in n-Dekan).

Anhand von Abbildung 2.11. konnten die entsprechenden Leitfähigkeiten  $G$  und  $G_0$  ermittelt und gegen die angelegte Spannung  $V_m$  aufgetragen werden, um eine Glockenkurve der Spannungsabhängigkeit zu erstellen. Ein Vergleich der Glockenkurve des rekombinanten **NfpA<sub>NHIS</sub>B<sub>NHIS</sub>** Oligomers mit der Glockenkurve des nativen Proteins aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) ist in Abbildung 2.12. dargestellt. Darin ist sowohl für das rekombinante Porin aus *N. farcinica* IFM 10152 (Abb. 2.12.A.) als auch für das native Porin aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) (Abb. 2.12.B.) ein starker Abfall der Kurve zwischen -30 mV und -40 mV auf ein  $G$  zu  $G_0$  Verhältnis von 0,45 zu beobachten. Für negativere Spannungswerte sinkt das  $G$  zu  $G_0$  Verhältnis auf bis zu 0,15. Für positivere Werte als -30 mV bildet das  $G$  zu  $G_0$  Verhältnis eine Gerade beim Wert von 1,0. Auch die Kombination aus **NfpC<sub>NHIS</sub>** und **NfpB<sub>NHIS</sub>** zeigte diese charakteristische Spannungsabhängigkeit.



**Abb.2.12.A.** Glockenkurve der Spannungsabhängigkeit. Verhältnis der Leitfähigkeit  $G$  (bei angelegter Spannung  $V_m$ ) zur Leitfähigkeit  $G_0$  (bei 10 mV Spannung) als Funktion der angelegten Spannung  $V_m$ . Ansatz bestehend aus **NfpA<sub>NHis</sub>** und **NfpB<sub>NHis</sub>** (30 ng/ml) in 1 M KCl ( $U= 20$  mV;  $10^8$  V/A; 20 V fsc;  $T= 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan).



**Abb.2.12.B.** Glockenkurve der Spannungsabhängigkeit. Verhältnis der Leitfähigkeit  $G$  (bei angelegter Spannung  $V_m$ ) zur Leitfähigkeit  $G_0$  (bei 10 mV Spannung) als Funktion der angelegten Spannung  $V_m$ . **Natives Porin** aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) ( $U= 20$  mV;  $10^9$  V/A; 500 mV fsc;  $T= 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan) (Rieß *et al.*, 1998).

#### 2.4.7. pH-Abhängigkeit der Nfp-Oligomere

Rieß *et al.* (1998) konnten mit dem nativen Porin aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) zeigen, dass unterschiedliche pH-Werte zwischen 4 und 8, eine Erniedrigung der Einzelkanal-Leitfähigkeit zur Folge haben können. Der Ansatz bestehend aus **NfpA<sub>NHis</sub>** und **NfpB<sub>NHis</sub>** bestätigte diese Eigenschaften. So konnte in einem pH-Bereich zwischen 6 und 8 die gleiche Einzelkanal-Leitfähigkeit von 2,5 nS – 3,5 nS in 1 M KCl bestimmt werden. Die Einzelkanal-Leitfähigkeit des nativen Kanals aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) betrug in diesem pH-Intervall 3,0 nS. Nach einer pH-Erniedrigung auf den Wert 5, resultierte eine Einzelkanal-Leitfähigkeitsabnahme nach der Zugabe des rekombinanten **NfpA<sub>NHis</sub>B<sub>NHis</sub>** Oligomers auf 2,0 nS – 2,5 nS. Darüber hinaus ergab sich nach der Zugabe des rekombinanten Ansatzes bei pH 4 eine

Einzelkanal-Leitfähigkeit von 1,75 nS – 2,25 nS. Die beobachtete Einzelkanal-Leitfähigkeiterniedrigung bei den pH-Werten 5 und 4 nach der Zugabe des rekombinanten NfpA<sub>NHIS</sub>B<sub>NHIS</sub> Oligomers bestätigte damit die Eigenschaften des aufgereinigten, nativen Porins aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) (Rieß *et al.*, 1998). Damit bleibt festzuhalten, dass die Einzelkanal-Leitfähigkeiten des rekombinanten bzw. nativen Porins in Anwesenheit einer erhöhten H<sup>+</sup>-Konzentration erniedrigt werden können.

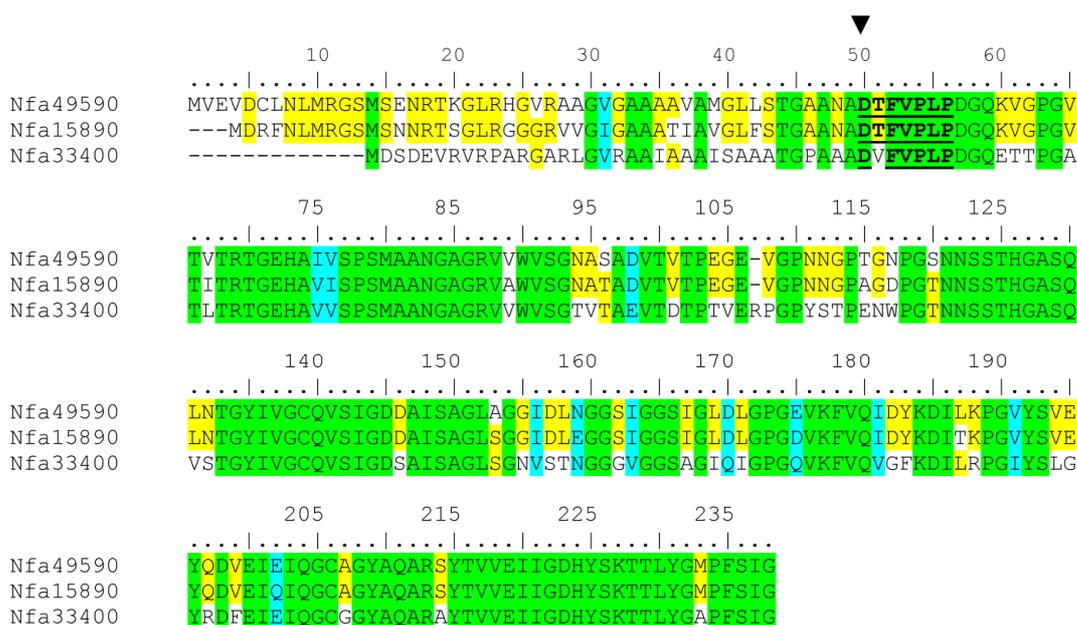
#### 2.4.8. Proteinsequenzvergleich der Nfp-Monomere und MspA

Die sechs hypothetischen Proteine aus *N. farcinica* IFM 10152 teilen auf Primärstrukturebene mit MspA jeweils ähnliche Aminosäurelängen. Zudem wurden die Proteine allesamt mithilfe des **P**ole **B**ioinformatique **L**yonnais **N**etwork **P**rotein **S**equences **A**nalysis **T**ools (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) aligniert, um die mutmaßlichen Homologien zu MspA genauer verifizieren zu können.

In Abbildung 2.13. wurde stellvertretend für alle sechs Nfp-Monomere das Tandempaar Nfa15890-Nfa15900 mit MspA verglichen, weil dieses Duplett die höchste Übereinstimmung mit den drei generierten Teilsequenzen des nativen Porins aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) zeigte. Der Vergleich zwischen den drei Monomeren Nfa15890, Nfa15900 und MspA ergab eine Identität von 11% aller Aminosäuren (Abb. 2.13.). Der Aminosäurevergleich zwischen Nfa15900 und MspA *alleine* ergab ferner eine Identität von 21%. Darüber hinaus wurden die Sekundärstrukturvorhersagen der drei prozessierten Proteine Nfa15890, Nfa15900 und MspA miteinander verglichen, um die Primärstrukturhomologien genauer analysieren zu können. Dabei bestätigte die Sekundärstrukturvorhersage des prozessierten MspA-Monomers (*minus* 27 Aminosäuren) die aus der Kristallstruktur bereits bekannten zwölf  $\beta$ -Stränge (Faller *et al.*, 2004). Die Sekundärstrukturvorhersage der beiden prozessierten Proteine Nfa15890 (*minus* 46 Aminosäuren) und Nfa15900 (*minus* 35 Aminosäuren) ergab neun bzw. zehn  $\beta$ -Stränge (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>). Interessanterweise konnten nach dem Vergleich der jeweiligen Sekundärstrukturen zwischen dem prozessierten Nfa15890 und MspA bzw. Nfa15900 und MspA jeweils acht  $\beta$ -Stränge bei ähnlichen Aminosäurepositionen wiedergefunden werden. Dabei alternieren die  $\beta$ -Stränge innerhalb der Sekundärstrukturen von Nfa15890, Nfa15900 und MspA in regelmäßigen Abständen, wohingegen der  $\alpha$ -Anteil vernachlässigbar gering bleibt. Die 12  $\beta$ -Stränge des MspA-Monomers (Faller *et al.*, 2004) sind innerhalb von Abbildung 2.13. rot eingerahmt.



In Abbildung 2.14. ist ein Primärstrukturvergleich der Vorläuferproteine Nfa49590, Nfa15890 und Nfa33400 dargestellt, deren Gene vom Translationsstartpunkt aus gesehen zuerst abgelesen werden. Diese jeweiligen drei vorderen Nfp-Tandempartner weisen zueinander eine Identität von 60% aller Aminosäuren auf. Damit spiegelt dieser Vergleich die höchste Homologie aller sechs hypothetischen Proteine untereinander wider (siehe auch 2.4.1.). Zudem sind diese drei Proteine ähnlich lang. Ein Primärstrukturvergleich der entsprechenden hinteren Tandempartner Nfa49580, Nfa15900 und Nfa33390 ergab eine 54%-ige Identität aller Aminosäuren (Daten nicht angegeben).



**Abb. 2.14.** Vergleich der Primärstrukturen von Nfa49590, Nfa15890 und Nfa33400, deren Gene vom Translationsstartpunkt aus gesehen zuerst abgelesen werden. Der Vergleich zeigt die identischen Aminosäuren der drei Proteine in grüner bzw. zwischen zwei Proteinen in gelber Markierung; konservierte Aminosäuren sind in türkis unterlegt. Die mutmaßlichen N-terminalen Spaltstellen von Nfa49590, Nfa15890 und Nfa33400 sind durch einen Pfeil markiert. Die ersten sieben Aminosäuren, die aus der N-terminalen Teilsequenz von *N. farinica* N236 (Rieß, 1997 *Diplomarbeit*) abgeleitet wurden, sind dick und unterstrichen dargestellt (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>).

## 2.5. Diskussion

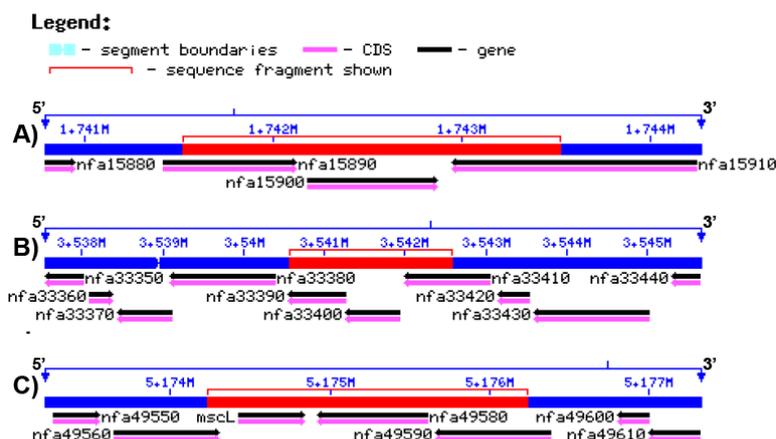
### 2.5.1. Hypothetisch für Porine codierende Gene aus *N. farcinica*

Innerhalb der Arbeiten von Rieß *et al.* (1998) konnten für das native 87 kDa-Oligomer und die beiden mutmaßlichen Untereinheiten um die 24 kDa aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) mithilfe einer N-terminalen Sequenzanalyse (Edman-Abbau) drei Teilsequenzen generiert werden. Beide Untereinheiten um die 24 kDa sollten die zuvor ermittelten Banden bei 26 kDa und 23 kDa beschreiben (Rieß, 1997 *Diplomarbeit*). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zwei Gründe für identische Molekulargewichte aller sechs hypothetischen Proteine vorgeschlagen. Erstens wurden unmittelbar vor der Sequenzierung zwei monomere Banden mit jeweils 24 kDa erhalten. Daher waren die Laufunterschiede von vormals 3 kDa – 4 kDa der beiden Untereinheiten nicht bestätigt worden. Darüber hinaus ergab die Kalkulation der molekularen Laufhöhen aller sechs hypothetischen Proteine nach der Computervorhersage von ExPASy ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)) ähnliche Werte um die 19 kDa (Tab. 2.4.). Zweitens ergab die BLAST-Suche (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) der drei generierten Teilsequenzen, dass die erhaltenen Sequenzen nicht auf ein einzelnes Peptid, sondern auf eine Mischung aus mehreren homologen Peptiden zurückzuführen sind. Anhand der beiden Teilsequenzen aus der oligomeren 87 kDa-Bande und der oberen 24 kDa-Bande konnten demnach alle sechs hypothetischen Proteine Nfa15890, Nfa15900, Nfa33390, Nfa33400, Nfa49580 und Nfa49590 ermittelt werden (siehe Abb. 2.1.). Unter der Annahme eines Hetero-Oligomers aus zwei Untereinheiten entspricht das Vorhandensein mehrerer Proteine in der oligomeren Bande durchaus den Erwartungen. Für die obere 24 kDa-Bande lässt dieses Ergebnis jedoch vermuten, dass diese Bande nicht wie angenommen ein einziges Monomer darstellt, sondern eine Mischung aus verschiedenen Monomeren derselben Größe. In der unteren 24 kDa Bande konnte lediglich die dritte Teilsequenz MQXTPVHRNAXVXGSAQ (siehe 2.4.1.) erhalten werden. Damit wurde die N-terminale Teilsequenz DTFVPLPGGQIV/(T)KPLDNXTDV (siehe 2.4.1.) in der unteren 24 kDa-Bande nicht bestätigt. Demzufolge könnte der geringe Laufunterschied zwischen den beiden 24 kDa-Banden aufgrund der Abspaltung einer kurzen terminalen Aminosäuresequenz, die das Protein in seiner Funktion nicht beeinflusst, zurückzuführen sein. Dies ist unter anderem für das in *M. tuberculosis* vorkommende Porin OmpATb bekannt (Alahari *et al.*, 2007).

Das native Oligomer aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) konnte aus lyophilisiertem Zellmaterial gewonnen werden. Damit stellt die native Aufreinigung bzw. das Vorhandensein des Kanals die Transkription bzw. Translation *in vivo* aus *N. farcinica* N236

IMMIB (ATCC 3318) sicher. Inwieweit tatsächlich alle sechs hypothetischen Proteine *in vivo* abgelesen werden bzw. an der Porinformation beteiligt sind, bleibt jedoch ungeklärt. Stattdessen ist eine mögliche Erklärung darin zu suchen, dass für die rekombinante Klonierung das Isolat *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318), für die Alignments jedoch der sequenzierte Literaturstamm *N. farcinica* IFM 10152 (Ishikawa *et al.*, 2004) verwendet wurde. Damit könnten die drei Teilsequenzen noch größere Homologien zu einem der drei Tandempartner zeigen, wenn sie in den identischen Stamm eingeordnet werden würden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch bestätigt werden, dass ein alternativer *in vitro* Ansatz bestehend aus den beiden Monomeren NfpB<sub>NHis</sub> und NfpC<sub>NHis</sub> einen zu NfpA<sub>NHis</sub>B<sub>NHis</sub> identischen, porenformenden Komplex ermöglichen kann. Daher erscheint ein Selektionsvorteil von *N. farcinica* durchaus denkbar, insofern das Porin aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) durch die jeweiligen korrespondierenden Monomere *in vivo* gebildet wird. Die Mutation eines einzelnen Monomers innerhalb des Tandems hätte somit keine letalen Folgen für das Bakterium, da die alternative Porinformation von dem jeweiligen korrespondierenden Monomer an anderer Stelle des Genoms übernommen werden könnte. Von *mspA* beispielsweise liegen mit *mspB*, *mspC* und *mspD* drei weitere Kopien im Genom von *M. smegmatis* vor (Stahl *et al.*, 2001). Diese Kopien unterscheiden sich lediglich in wenigen Aminosäuren von *mspA* und ermöglichen einen zusätzlichen Transportweg für hydrophile Substanzen. Damit kann auch bei *M. smegmatis* davon ausgegangen werden, dass nach einer fehlerhaften Mutation von *mspA* mithilfe von *mspB*, *mspC* und *mspD* der Transport aufrecht erhalten wird, falls diese *in vivo* transkribiert werden.

Zudem könnte *Nocardia farcinica* verschiedene Porine für unterschiedliche Transportmechanismen (verschiedene zu transportierende Stoffe, aktiver oder passiver Transport) verwenden. Aufgrund der genetischen Lokalisation im Genom von *N. farcinica* IFM 10152 werden die beiden Genpaare *nfa15890-nfa15900* bzw. *nfa49590-nfa49580* höchstwahrscheinlich unabhängig von anderen Genen exprimiert. Das Tandemgen *nfa33400-nfa33390* hingegen bildet vermutlich mit weiteren Genen ein Operon (siehe Abb.2.15.), welches ein zum *malEFG* und *malK-lamB*-Operon aus *E. coli* vergleichbares Transportsystem (Bedouelle und Hofnung, 1982) darstellen könnte. Die hypothetisch auf demselben Operon wie *nfa33400-nfa33390* liegenden Gene *nfa33380* und *nfa33430* stellen putative Transporter bzw. das Gen *nfa33370* einen putativen Transkriptionsregulator dar (Ishikawa *et al.*, 2004).



**Abb.2.15.** Genetische Lokalisation der sechs hypothetischen Gene aus *Nocardia farcinica* IFM 10152.  
**A:** Tandempaar *nfa15890-nfa15900*;  
**B:** Tandempaar *nfa33400-nfa33390*;  
**C:** Tandempaar *nfa49590-nfa49580*.  
 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)

### 2.5.2. Klonierung und Expression der Nfp-Monomere in *E. coli*

Alle sechs hypothetischen Proteine enthalten mutmaßliche Signalsequenzen, die mithilfe von SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) ermittelt werden konnten. Der Vergleich der vorhergesagten Spaltstellen ergab für alle sechs Proteine dasselbe Aminosäurenmotif ANA\_DTF, welches zudem in der N-terminalen Teilsequenz DTFVPLPGGQIV/(T)KPLDNXTDV wiedergefunden werden konnte. Diese Tatasche bestätigt zum einen die gerichtete Transportfunktion der Signalsequenz in die Mycolsäureschicht von *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) *in vivo* und zum anderen die Vorhersage der Spaltstelle mit dem Programm SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). Im Gegensatz zu Nfa15890 mit einer Spaltstelle zwischen den Aminosäuren 46 und 47, zeigt Nfa15900 die mutmaßliche Spaltstelle zwischen den Aminosäuren 35 und 36. Aspartat ist die jeweils erste Aminosäure unmittelbar nach der Spaltstelle und damit innerhalb von Nfa15890, Nfa15900 und MspA hochkonserviert.

In Übereinstimmung mit einer erfolgreichen Expression des MspA-Monomers *ohne* die zugehörige Signalsequenz im heterologen BL21DEOmp8 *E. coli* Stamm, sollten auch die Nfp-Monomere ohne deren Signalsequenzen amplifiziert bzw. in pARAJS2 ligiert werden. Allerdings wurde -wie unter 2.3.3. beschrieben- Nfa15890 zusätzlich mit einer Länge von 16 verbliebenen Aminosäuren der nativen Signalsequenz (NfpA<sub>NHis</sub>) in den pARAJS2 Vektor kloniert. Mithilfe der Inkubationsansätze bestehend aus NfpA<sub>NHis</sub> und NfpB<sub>NHis</sub> bzw. NfpA'<sub>NHis</sub> und NfpB<sub>NHis</sub> konnten die identischen porenformenden Eigenschaften bestimmt werden. Darüber hinaus wiesen NfpA<sub>NHis</sub> und NfpB<sub>NHis</sub> trotz der zusätzlichen ompT-Signalsequenz und des 10-fachen Histidin-Tags keine sterischen Behinderungen während der Oligomerisation auf. Zudem zeigten die positiv geladenen Histidinreste im rekombinanten NfpA<sub>NHis</sub>B<sub>NHis</sub> Oligomer gegenüber dem nativen Porin aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) keine Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften. In Anlehnung an die Struktur von MspA

(siehe Abbildung 1.7.C. bzw. 1.7.D.; Faller *et al.*, 2004), sollte der zusätzliche rekombinante N-Terminus keine negativen Auswirkungen auf die Oligomerisation haben, weil dieser aus der Ebene hinausragt und damit die Interaktion während der Monomer-Monomer Bindung ungestört verlaufen kann.

### 2.5.3. Aufreinigung der Nfp-Monomere

Das in Abbildung 2.8. dargestellte silbergefärbte Gel der aufgereinigten rekombinanten Monomere NfpA<sub>NH<sub>2</sub></sub> und NfpB<sub>NH<sub>2</sub></sub> belegt, dass die gewünschten Proteine ohne größere Verunreinigungen in den jeweiligen Elutionen der IMAC-Aufreinigung enthalten sind. Die optimierte Aufreinigung führte mit den verbliebenen Nfp-Monomeren NfpA'<sub>NH<sub>2</sub></sub> und NfpC<sub>NH<sub>2</sub></sub> ebenfalls zu einer molekularen Laufrhöhe bei ca. 30 kDa. Während dies für das Einzelprodukt NfpC<sub>NH<sub>2</sub></sub> zu erwarten war, kann man beim Tandemprodukt NfpC<sub>NH<sub>2</sub></sub>+NfpD festhalten, dass dieses nicht als ein einziges langes Protein exprimiert wird, sondern nur die Expression des NfpC<sub>NH<sub>2</sub></sub>-Monomers lieferte. Demzufolge kann die heterologe Expression des kompletten Tandemgens mit der Zwischengensequenz in *E. coli* nicht zu den entsprechenden hetero-oligomeren Porinen führen. Die Translation stoppt mit hoher Wahrscheinlichkeit am ersten Stoppcodon des vorderen Genabschnitts. Anschließend sollte sich das Ribosom von der mRNA lösen. Diese Vermutung kann jedoch nur unter der Voraussetzung bestätigt werden, dass die jeweiligen Tandempartner im Genom von *N. farcinica* tatsächlich *zusammen* transkribiert werden können. Die Zwischengensequenzen von 56 Basenpaaren (*nfa15890-nfa15900* bzw. *nfa49590-nfa49580*) bzw. 3 Basenpaaren (*nfa33400-nfa33390*) sowie das Fehlen einer Ribosombindestelle -die durch das fremde *E. coli* Ribosom erkannt werden könnte- lässt keine erneute Bindung am zweiten Startcodon zu. Darüber hinaus lassen die jeweiligen Zwischengensequenzen kein durchgängiges Ablesen des gesamten Konstrukts zu, weil sie ohnehin das Leseraster verschieben würden (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>). Ein vorzeitiger Abbruch der Translation wäre die Folge.

### 2.5.4. Biophysikalische Charakterisierung der Nfp-Oligomere bzw. die porenformende Zuordnung der rekombinanten Gene

Das rekombinante Hetero-Oligomer aus *N. farcinica* IFM 10152 zeigte lediglich nach der Inkubation *beider* korrespondierender Nfp-Monomere NfpA<sub>NH<sub>2</sub></sub> und NfpB<sub>NH<sub>2</sub></sub> eine porenformende Aktivität mit einer Einzelkanal-Leitfähigkeit von 2,5 nS – 3,0 nS in 1 M KCl. Der Ansatz mit *einem* der beiden Nfp-Monomere resultierte hingegen nicht in eine

porenformende Aktivität. Darüber hinaus waren für den Nachweis der porenformenden Aktivität eine Fällung des jeweiligen Ansatzes mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung und eine anschließende Renaturierung in Puffer A (2.3.5.) vonnöten. Dies weist darauf hin, dass für das Erlangen der funktionellen Struktur eine Renaturierung der rekombinanten Proteine notwendig wird. Da die jeweiligen Nfp-Monomere aus der cytosolischen Fraktion aufgereinigt wurden, lag das Protein vermutlich in „Inclusion bodies“ im Periplasma des Expressionstamms vor. Das Auftreten von „Inclusion bodies“ bei der Expression rekombinanter Proteine ist ein bekanntes Problem, bei welchem das jeweilige Protein üblicherweise nicht funktionell ist (Freydell *et al.*, 2007). „Inclusion bodies“ bilden sich bei zu hohen Proteinmengen. Durch alternative Faltungen auf der Oberfläche präsentierte hydrophobe Bereiche der Proteine interagieren miteinander, was zur Aggregation und Deponierung in Einschlusskörpern führt. Zusammengefasst weist dies darauf hin, dass die heterolog exprimierten Nfp-Monomere zumindest zu einem gewissen Anteil selbständig in ihre funktionelle Form falten und keine Unterstützung von Chaperonen oder anderen Proteinen benötigen.

Die Streuung der Einzelkanal-Leitfähigkeit des rekombinanten Nfp-Hetero-Oligomers (2,5 nS – 3,0 nS in 1 M KCl) kann mithilfe der heterologen Expression erklärt werden. Auch beim rekombinant in *E. coli* exprimierten MspA wies ein hoher Anteil der Poren ebenfalls leicht größere oder kleinere Einzelkanal-Leitfähigkeiten auf (Niederweis *et al.*, 1999). Sowohl das native MspA als auch das native Oligomer aus *N. farcinica* zeigten keine derartige Streuung ihrer Einzelkanal-Leitfähigkeit. Daher kann die Ursache der Streuung im Renaturierungsschritt liegen. Die Umgebung, in der die Renaturierung abläuft unterscheidet sich erheblich von der nativen mycolsäurehaltigen Zellwand aus *M. smegmatis* und *N. farcinica*. Demzufolge wäre es durchaus denkbar, dass beim rekombinanten Hetero-Oligomer nur ein kleiner Anteil in die funktionelle Tertiär- und Quartärstruktur falten kann.

Für MspA ist bekannt, dass nach rekombinanter Expression in *E. coli* Bl21DE3Omp8 nur 1% der Oligomere die richtige Faltung erreichen können (Niederweis *et al.*, 1999). Die erhöhte Variation der Einzelkanal-Leitfähigkeiten innerhalb der rekombinanten Proteine könnte also darin begründet liegen, dass ein Teil der Proteine in einer leicht von der nativen Tertiärstruktur abweichenden Form vorliegt. Eventuell wird die Funktion der Poren durch die abweichende Tertiärstruktur nicht aufgehoben, deren Einzelkanal-Leitfähigkeiten jedoch entscheidend beeinflusst. Die Tatsache, dass nur ein kleiner Anteil der Proteine die richtige Faltung aufweist, könnte auch erklären, warum sich über einen Western-Blot keine oligomere Bande nachweisen lässt (siehe Abb. 2.7.). Die Konzentration an Protein mit der richtigen Tertiär- und Quartärstruktur war für die Bildung einer detektierbaren Bande nicht ausreichend.

Auffallend ist weiterhin der bei sämtlichen Messungen mit den Nfp-Oligomeren auftretende zweite Spitzenwert mit einer Einzelkanal-Leitfähigkeit von 1,5 nS in 1 M KCl. Dieser Wert entspricht exakt der Hälfte der eigentlich erwarteten Leitfähigkeit. Für einige Vertreter der Mycolata sind bereits Porine bekannt, die mehrere Einzelkanal-Leitfähigkeiten aufweisen. So zeigt MspA nach rekombinanter Expression in *E. coli* zum Großteil Einzelkanal-Leitfähigkeiten von 2,3 nS anstatt der nativen 4,6 nS (Niederweis *et al.*, 1999). Das in *M. tuberculosis* und *M. bovis* vorkommende Porin OmpATb weist nach Expression in *E. coli* hauptsächlich Poren mit einer Leitfähigkeit von 0,8 nS aber nach Expression in *M. smegmatis* bzw. *M. bovis* hauptsächlich Poren mit einer Leitfähigkeit von 1,6 nS auf (Alahari *et al.*, 2007). Diese Tatsache könnte auf Wechselwirkungen zwischen den Poren und Mycolsäuren der Zellwand zurückzuführen sein, wodurch die einzelnen Kanäle zu größeren Einheiten, z.B. Di-Oligomere aggregieren. Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Porinen, welche die Struktur der Porine unterstützen, sind sowohl für Gram-positive Bakterien (Heinz *et al.*, 2003), als auch für Gram-negative Bakterien (Holzenburg *et al.*, 1989) bekannt. Hingegen ist die künstliche Lipiddoppelschicht bzw. die Lipiddoppelschicht aus *E. coli* vermutlich nur eingeschränkt in der Lage die Mycolsäuren zu ersetzen.

Die Spannungsabhängigkeit stellt ein für Porine höchst spezifisches Merkmal dar, anhand dessen sich Kanäle mit der gleichen Einzelkanal-Leitfähigkeit voneinander unterscheiden lassen. Der porinfreie *E. coli* Bl21DE3Omp8 Stamm ist nicht komplett porinfrei und enthielt vor der IMAC-Aufreinigung (Membran- bzw. Cytosolfraktion) eine Verteilung verschiedener Einzelkanalereignisse (Maier 2007, *Studie*). Der häufigste Einzelkanal-Leitfähigkeitswert lag ebenfalls bei etwa 3,0 nS in 1 M KCl. Jedoch zeigte dieser Kanal eine symmetrische Spannungsabhängigkeit (nach cis-, trans- sowie beidseitiger Zugabe) erst ab -110 mV bzw. +120 mV (Maier 2007, *Studie*). Im Gegensatz dazu resultierte für das Nfp- Hetero-Oligomer nach der cis-Zugabe (Ansatz bestehend aus NfpA<sub>NHis</sub> und NfpB<sub>NHis</sub>) eine eindeutige asymmetrische Spannungsabhängigkeit beim Anlegen negativer Spannungen unterhalb von -30 mV. Diese charakteristische asymmetrische Spannungsabhängigkeit stimmt mit der des nativen Porins aus *N. farcinica* N236 IMMIB (ATCC 3318) überein (Rieß *et al.*, 1998).

Letztendlich bleibt festzuhalten, dass die beschriebene charakteristische Spannungsabhängigkeit die porenformende Zuordnung der rekombinanten Gene aus *N. farcinica* IFM 10152 bestätigt. Diese Tatsache wird gestützt durch die Ergebnisse mit dem *E. coli* Bl21DE3Omp8 Stamm *ohne* die entsprechenden rekombinanten Nfp-Plasmide. Dazu wurden die Cytosol- und Membranfraktionen parallel zu den jeweiligen Nfp-Monomeren aufgereinigt (IMAC-Aufreinigung) und mit allen Nfp-Monomer-Fraktionen (IMAC-Aufreinigung) inkubiert. Sowohl vor als auch nach der Renaturierung konnte keine

porenformende Aktivität gemessen werden. Damit war das Porin aus dem *E. coli* B121DE3Omp8 Stamm mit der gleichen Einzelkanal-Leitfähigkeit von 3,0 nS in 1 M KCl nach der IMAC-Aufreinigung nicht mehr messbar und kommt daher als Verunreinigung nicht in Frage.

### **2.5.5. Proteinsequenzvergleich der Nfp-Monomere und MspA**

Die kelchähnliche Struktur von MspA (Abb. 1.7.C. bzw. Abb. 1.7.D.) wird aus acht homologen Monomeren gebildet (Homo-Oktamer) und weist eine einzige Durchgangsmöglichkeit auf. Die Kristallstruktur von MspA konnte u.a. mithilfe der Ammoniumsulfat-Fällung erreicht werden (Faller *et al.*, 2004). Der Vergleich der jeweiligen Sekundärstrukturen zwischen dem prozessierten Nfa15890 und MspA bzw. Nfa15900 und MspA ergab jeweils acht  $\beta$ -Stränge bei ähnlichen Aminosäurepositionen. Dabei alternieren die  $\beta$ -Stränge innerhalb der Sekundärstrukturen von Nfa15890, Nfa15900 und MspA in regelmäßigen Abständen, wohingegen der  $\alpha$ -Anteil vernachlässigbar gering bleibt. Insbesondere die zahlreichen hochkonservierten Glycinreste innerhalb der Primärstrukturen aller sechs hypothetischen Proteine erklären die Präferenz der  $\beta$ -Faltblätter gegenüber den  $\alpha$ -Anteilen. Damit vermeiden die neutralen bzw. kleinen Glycinreste sterische Behinderungen und bevorzugen auch innerhalb der Nfp-Monomere die Formation der  $\beta$ -Stränge.

### **2.5.6. Ausblick**

Mit den durchgeführten Versuchen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die rekombinant in *E. coli* exprimierten Gene aus *N. farcinica* IFM 10152 für porenbildende Proteine codieren. In Anbetracht ihrer Homologie zu MspA aus *M. smegmatis* wurden daher die Namen NfpA<sub>NH<sub>2</sub></sub> (*Nocardia farcinica porin A N-terminal Histidin-tag*) für *nfa15890*, NfpB<sub>NH<sub>2</sub></sub> (*Nocardia farcinica porin B N-terminal Histidin-tag*) für *nfa15900* sowie NfpC<sub>NH<sub>2</sub></sub> (*Nocardia farcinica porin C N-terminal Histidin-tag*) für *nfa49590* ausgewählt.

Da die heterologe Expression des kompletten Tandemgens NfpC<sub>NH<sub>2</sub></sub>+NfpD mit der Zwischengensequenz in *E. coli* nicht zu dem entsprechenden Hetero-Oligomer führte, müsste in Zukunft mit den entsprechenden Doppelprodukten aus *N. farcinica* IFM 10152 ein Northern-Blot durchgeführt werden, über den sich beweisen ließe, ob die Transkription der beiden Gene simultan verläuft. Die Translation stoppt mit hoher Wahrscheinlichkeit am ersten Stoppcodon des vorderen Genabschnitts. Anschließend wird sich das Ribosom von der mRNA lösen. Diese Vermutung kann jedoch nur dann bestätigt werden, wenn die jeweiligen Tandempartner im Genom von *N. farcinica* IFM 10152 tatsächlich auch *zusammen* transkribiert werden.

Die Zwischengensequenzen von 56 Basenpaaren (*nfa15890-nfa15900* bzw. *nfa49590-nfa49580*) bzw. 3 Basenpaaren (*nfa33400-nfa33390*) sowie das Fehlen einer Ribosombindestelle -die durch das *E. coli* Ribosom erkannt werden könnte- lässt keine erneute Bindung am zweiten Startcodon zu. Darüber hinaus lassen die jeweiligen Zwischengensequenzen kein durchgängiges Ablesen des gesamten Konstruktes zu, weil sie ohnehin das Leseraster verschieben würden (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>). Dies hätte einen vorzeitigen Abbruch der Translation zur Folge. Daher könnte eine angepasste Expression des Tandemproduktes in einem verwandten, mycolsäurehaltigen Stamm zu einer funktionsfähigen Pore führen. Ein weiterer Aspekt ist das Auftreten der 1,5 nS-Pore. Um deren Bedeutung bzw. deren Zusammenhang mit den Wechselwirkungen zwischen Mycolsäuren und Proteinen bestimmen zu können, sollten Messungen nach der Expression der entsprechenden Gene in einem mycolsäurehaltigen Expressionsstamm durchgeführt werden.

## 2.6. Referenzen

- Alahari, A., N. Saint, S. Campagna, V. Molle, G. Molle & L. Kremer, (2007) The N-terminal domain of OmpATb is required for membrane translocation and pore-forming activity in mycobacteria. *J Bacteriol* **189**: 6351-6358.
- Aoki, H., H. Sakai, M. Kohsaka, T. Konomi & J. Hosoda, (1976) Nocardicin A, a new monocyclic beta-lactam antibiotic. I. Discovery, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **29**: 492-500.
- Barth, E., M. Agulló Barceló, C. Kläckta & R. Benz, (2009) Reconstitution experiments in lipid bilayers reveal two-component cell wall channels in Corynebacteriae. *Manuscript in revision at the Journal of Bacteriology*.
- Beaman, B. L., (1992) Nocardia as a pathogen of the brain: mechanisms of interactions in the murine brain--a review. *Gene* **115**: 213-217.
- Beaman, B. L., P. Boiron, L. Beaman, G. H. Brownell, K. Schaal & M. E. Gombert, (1992) Nocardia and nocardiosis. *J Med Vet Mycol* **30**: 317-331.
- Beaman, B. L. & A. M. Sugar, (1983) Nocardia in naturally acquired and experimental infections in animals. *J Hyg (Lond)* **91**: 393-419.
- Bedouelle, H. & M. Hofnung, (1982) A DNA sequence containing the control regions of the malEFG and malK-lamB operons in Escherichia coli K12. *Mol Gen Genet* **185**: 82-87.
- Benz, R., K. Janko, W. Boos & P. Läger, (1978) Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta* **511**: 305-319.
- Benz, R., (1994) Solute uptake through bacterial outer membrane. *Bacterial Cell Wall. Amsterdam: Elsevier*: 397-423.
- Blum, H., H. Beier & H. J. Gross, (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Brennan, P. J. & H. Nikaido, (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* **64**: 29-63.
- Chun, J., S-O Kang, Y. C. Hah, & M. Goodfellow, (1996) Phylogeny of mycolic acid-containing actinomycetes. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 205-213.
- Dörner, U., E. Maier & R. Benz, (2004) Identification of a cation-specific channel (TipA) in the cell wall of the gram-positive mycolata Tsukamurella inchonensis: the gene of the channel-forming protein is identical to mspA of Mycobacterium smegmatis and mppA of Mycobacterium phlei. *Biochim Biophys Acta* **1667**: 47-55.
- Faller, M., M. Niederweis & G. E. Schulz, (2004) The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science* **303**: 1189-1192.
- Freudl, R., (1992) Protein secretion in gram-positive bacteria. *J Biotechnol* **23**: 231-240.

- Freydell, E. J., M. Ottens, M. Eppink, G. van Dedem & L. van der Wielen, (2007) Efficient solubilization of inclusion bodies. *Biotechnol J* **2**: 678-684.
- Goodfellow, M., M. D. Collins & D. E. Minnikin, (1976) Thin-layer chromatographic analysis of mycolic acid and other long-chain components in whole-organism methanolsates of coryneform and related taxa. *J Gen Microbiol* **96**: 351-358.
- Goodfellow, M. & V. A. Orchard, (1974) Antibiotic sensitivity of some nocardioform bacteria and its value as a criterion for taxonomy. *J Gen Microbiol* **83**: 375-387.
- Heinz, C., H. Engelhardt & M. Niederweis, (2003) The core of the tetrameric mycobacterial porin MspA is an extremely stable beta-sheet domain. *J Biol Chem* **278**: 8678-8685.
- Holzenburg, A., A. Engel, R. Kessler, H. J. Manz, A. Lustig & U. Aebi, (1989) Rapid isolation of OmpF porin-LPS complexes suitable for structure-function studies. *Biochemistry* **28**: 4187-4193.
- Ishikawa, J., A. Yamashita, Y. Mikami, Y. Hoshino, H. Kurita, K. Hotta, T. Shiba & M. Hattori, (2004) The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 14925-14930.
- Jarlier, V. & H. Nikaido, (1990) Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol* **172**: 1418-1423.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lambert, P. A., (2002) Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*: 46-54.
- Lichtinger, T., A. Burkovski, M. Niederweis, R. Kramer & R. Benz, (1998) Biochemical and biophysical characterization of the cell wall porin of *Corynebacterium glutamicum*: the channel is formed by a low molecular mass polypeptide. *Biochemistry* **37**: 15024-15032.
- Maier, E., (2007) Biophysikalische Untersuchung des *E.coli* BL21DE3Omp8 Stamms. *Studie*.
- Minnikin, D. E., (1982) Complex lipids: Their chemistry, biosynthesis and roles. C. Ratledge, and J. Stanford (eds.) *The Biology of Mycobacteria, Vol.1, Academic Press*. London, 98-184.
- Munoz, J., B. Mirelis, L. M. Aragon, N. Gutierrez, F. Sanchez, M. Espanol, O. Esparcia, M. Gurgui, P. Domingo & P. Coll, (2007) Clinical and microbiological features of nocardiosis 1997-2003. *J Med Microbiol* **56**: 545-550.
- Niederweis, M., S. Ehrt, C. Heinz, U. Klocker, S. Karosi, K. M. Swiderek, L. W. Riley & R. Benz, (1999) Cloning of the *mspA* gene encoding a porin from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **33**: 933-945.
- Nikaido, H., (1993) Transport across the bacterial outer membrane. *J Bioenerg Biomembr* **25**: 581-589.

- Prilipov, A., P. S. Phale, P. Van Gelder, J. P. Rosenbusch & R. Koebnik, (1998) Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 65-72.
- Rauterberg, J. & K. Kühn, (1971) Acid soluble calf skin collagen. Characterization of the peptides obtained by cyanogen bromide cleavage of its alpha-1-chain. *Eur J Biochem* **19**: 398-407.
- Ridgway, H. F., J. Safarik, D. Phipps, P. Carl & D. Clark, (1990) Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* **56**: 3565-3575.
- Rieß, F. G., (1997) Isolation, biophysical characterization and sequencing of a channel-forming protein from the cell wall of *Nocardia farcinica*. *Diplomarbeit*.
- Rieß, F. G., T. Lichtinger, R. Cseh, A. F. Yassin, K. P. Schaal & R. Benz, (1998) The cell wall porin of *Nocardia farcinica*: biochemical identification of the channel-forming protein and biophysical characterization of the channel properties. *Mol Microbiol* **29**: 139-150.
- Schaal, K. P. & H. J. Lee, (1992) Actinomycete infections in humans--a review. *Gene* **115**: 201-211.
- Schiffler, B., E. Barth, M. Daffe & R. Benz, (2007) *Corynebacterium diphtheriae*: identification and characterization of a channel-forming protein in the cell wall. *J Bacteriol* **189**: 7709-7719.
- Schleifer, K. & O. Kandler, (1967). Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. *Archiv für Mikrobiologie* **57**: 335-364.
- Schmoekel, C. (1996) Lexikon der Differentialdiagnose und der klinischen Dermatologie, 2. aktualisierte und erweiterte Auflage, *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, New York.
- Stackebrandt, E., C. Sproer, *et al.*, (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1134-9.
- Stahl, C., S. Kubetzko, I. Kaps, S. Seeber, H. Engelhardt & M. Niederweis, (2001) MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **40**: 451-464.
- Stegmeier, J. F. & C. Andersen, (2006) Characterization of pores formed by YaeT (Omp85) from *Escherichia coli*. *J Biochem* **140**: 275-283.
- Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon, (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354.
- Trias, J., V. Jarlier & R. Benz, (1992) Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science* **258**: 1479-1481.
- Tsukamura, M. & M. Ohta, (1980) *Nocardia farcinica* as a pathogen of lung infection. *Microbiol Immunol* **24**: 237-241.

## **Charakterisierung eines Streptomycin-bindenden sowie eines Fruktose-induzierten Porins aus *Streptomyces* Arten**

### **3.1. Zusammenfassung**

*Streptomyceten* sind Gram-positive Bakterien, die in Wäldern große ökologische Bedeutung besitzen können (Nkanga und Hagedorn, 1978). Durch ihre spezielle Wachstumsform bilden sie dort im Boden ein verzweigtes Netzwerk, das Mycel. Große Bedeutung haben sie insbesondere in der Industrie erlangt, da sie die Hauptproduzenten vieler Antibiotika und Enzyme sind. *Streptomyces* Arten bilden 60% aller bekannter, mikrobiell synthetisierter Antibiotika wie Streptomycin, Anthracyclin, Erythromycin, verschiedener Tetracycline und Makrolide (Kieser *et al.*, 2000). Ähnlich wie bei mycolsäurehaltigen Actinomyceten (*Nocardia farcinica*) und Gram-negativen Bakterien (*Vibrio cholerae*) wurden auch in *Streptomyces* Arten Porine beschrieben, die am Transport hydrophiler Substanzen über die Zellwand beteiligt sein könnten.

Kim *et al.* (2001) konnten in *Streptomyces griseus* ein Streptomycin-bindendes Porin (0,8 nS in 1 M KCl) außerhalb der Cytoplasmamembran nachweisen. Das Streptomycin-bindende Porin wurde zudem in *S. coelicolor* und *S. lividans* bestätigt (Dörner, 2004 *Dissertation*; Klug, 2005 *Diplomarbeit*). Innerhalb dieser Arbeit konnte für diese 0,8 nS Pore eine Spannungsabhängigkeit, sowie eine gerichtete Membran-Insertion nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal ein Fruktose-induziertes Protein in *S. griseus* (2,1 nS in 1 M KCl) identifiziert werden. Eine Fruktose-induzierte Pore war bis dato nur in *S. lividans* beschrieben worden (Dörner, 2004 *Dissertation*). Die Kanalgröße der Fruktose-induzierten Pore favorisiert eine Diffusionspore und ist daher unspezifisch für Substrate.

In einer weiteren Studie dieser Arbeit konnte die Fruktose-induzierte Pore von der Streptomycin-bindenden Pore aufgrund der unterschiedlichen biochemischen Ladungseigenschaften im Kanal mithilfe der FPLC (fast protein liquid chromatography) einwandfrei getrennt werden. Die Fruktose-induzierte Pore war bereits im basischen Bereich (pH 10,5) ungeladen, die Streptomycin-bindende Pore hingegen erst im neutralen Bereich (pH 7,5).

### 3.2. Einleitung

*Streptomyceten* sind Gram-positive Bakterien, die in Wäldern große ökologische Bedeutung besitzen können (Nkanga und Hagedorn, 1978). Durch ihre spezielle Wachstumsform bilden sie dort im Boden ein verzweigtes Netzwerk, das Mycel. Trotz ihrer bakteriellen Eigenschaften ähnelt das filamentöse Mycel der *Streptomyceten* dem von Pilzen. *Streptomyceten* bilden ein breites Spektrum an Sekundärmetaboliten. Durch die von ihnen gebildeten Duftstoffe, insbesondere Geosmin (1,10-Dimethyl-9-decalol), erhält Walderde ihren charakteristischen Geruch. Zu den Sekundärmetaboliten zählen auch zahlreiche Pigmente. So entwickeln zum Beispiel einige Arten der *Streptomyceten* unter Lichteinfluss aromatische  $\beta$ -Carotinoide (Krügel *et al.*, 1999).

Große Bedeutung haben sie insbesondere in der Industrie erlangt, da sie die Hauptproduzenten vieler Antibiotika und Enzyme sind. *Streptomyces* Arten bilden 60% aller bekannter mikrobiell synthetisierter Antibiotika wie Streptomycin, Anthracyclin, Erythromycin, verschiedener Tetracycline und Makrolide (Kieser *et al.*, 2000). Weiterhin sekretieren sie eine Vielzahl von hydrolytischen Enzymen wie  $\alpha$ -Amylasen,  $\beta$ -Galactosidasen, Agarasen, Cellulasen, Xylanasen, Esterasen, Proteasen,  $\beta$ -Lactamasen, Chitinasen, Lipasen sowie peptidische Inhibitoren für verschiedene Enzyme. Die meisten *Streptomyces* Arten sind überwiegend nicht pathogen. Eine Ausnahme stellt dabei der Erreger diverser Mycetoma-Arten, *S. somaliensis* dar (Mariat, 1958). Einige wenige Arten wie *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. ipomoeae*, *S. parvulus* und *S. sparsogenes* sind Pflanzenpathogene (Loria *et al.*, 1997; Blanchette *et al.*, 1981a; 1981b; Kennedy und Alcorn, 1980). Das Nährstoffangebot und insbesondere die Verfügbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen haben einen großen Einfluß auf ihre Morphologie, Expression und Sekundärmetabolit-Produktion.

Kim *et al.* (2001) konnten in *Streptomyces griseus* ein Streptomycin-bindendes Porin (0,8 nS in 1 M KCl) außerhalb der Cytoplasmamembran nachweisen. Das Streptomycin-bindende Porin wurde zudem in *S. coelicolor* und *S. lividans* bestätigt (Dörner, 2004 *Dissertation*; Klug, 2005 *Diplomarbeit*). Innerhalb dieser Arbeit konnte für diese 0,8 nS Pore eine Spannungsabhängigkeit, sowie eine gerichtete Membran-Insertion nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal ein Fruktose-induziertes Protein in *S. griseus* (2,1 nS in 1 M KCl) identifiziert werden. Eine Fruktose-induzierte Pore war bis dato nur in *S. lividans* beschrieben worden (Dörner, 2004 *Dissertation*). Die Kanalgröße der Fruktose-induzierten Pore bildet eine Diffusionspore und ist daher unspezifisch für Substrate. Weiterhin konnte die Fruktose-induzierte Pore von der Streptomycin-bindenden Pore aufgrund der unterschiedlichen biochemischen Ladungseigenschaften im Kanal mithilfe der FPLC

(fast protein liquid chromatography) einwandfrei getrennt werden. Die Fruktose-induzierte Pore war bereits im basischen Bereich (pH 10,5) ungeladen, die Streptomycin-bindende Pore hingegen erst im neutralen Bereich (pH 7,5). Die entsprechenden porenformenden Aktivitäten waren mithilfe der Black-Lipid-Bilayer Methode lediglich in den gelb markierten Bereichen (Fraktionen) messbar. Darüber hinaus waren keine Fremdporen detektierbar, so dass etwaige porenformende Verunreinigungen nach der Aufreinigung ausgeschlossen werden konnten.

### 3.3 Material und Methoden

#### 3.3.1. Verwendete Stämme und Wachstumsbedingungen

*Streptomyces coelicolor* ATCC 23899, *Streptomyces griseus* ATCC 15395 sowie *Streptomyces lividans* 66 (siehe Tab. 3.1.) wurden in GYM-Medium bzw. Medium 65 (0,4% **G**lukose/0,4% **Y**east= Hefextrakt/1% **M**alzextrakt/0,2% CaCO<sub>3</sub>/pH 7,2) bei 30°C auf dem Schüttler für drei Tage bei 180 rpm kultiviert. Die obigen Stämme wurden vom DSMZ (**D**eutsche **S**ammlung von **M**ikroorganismen und **Z**ellkulturen GmbH) in Braunschweig bezogen. Das Verhältnis aus Kulturvolumen und Kolbengröße wurde auf 1:8 – 1:10 festgelegt, um eine optimale O<sub>2</sub>-Versorgung der *Streptomyces* gewährleisten zu können. Die Induktion der Fruktosepore konnte vorwiegend nach der Kultivierung in FYM- bzw. fruktosehaltigen Medien (0,9% **F**ruktose/0,4% **Y**east= Hefextrakt/0,5% **M**alzextrakt/0,2% CaCO<sub>3</sub>/pH 7,2 bzw. 1% Hefextrakt/5% Fruktose/0,2% CaCO<sub>3</sub>/pH 7,2) erzielt werden. Für die Versuche mit *S. lividans* wurden unter anderem die von Prof. Ramon Santamaria zur Verfügung gestellten präparierten Zellwandextrakte (Universidad de Salamanca, Facultad de Biología) eingesetzt. Tabelle 3.1. gibt die für die Aufreinigung verwendeten Bakterienstämme wieder:

Tab. 3.1. Verwendete Stämme bzw. deren Referenzen.

	Stamm	Referenz
1.	<i>Streptomyces coelicolor</i> ATCC 23899	DSMZ (Braunschweig)
2.	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 15395	DSMZ (Braunschweig)
3.	<i>Streptomyces lividans</i> 66	DSMZ (Braunschweig)
4.	Zellwandextrakte <i>Streptomyces lividans</i> 66	(Santamaria, 2005)

#### 3.3.2. Isolierung von porenformenden Proteinen ganzer Zellen

Die Kulturen (250 ml – 500 ml) wurden in 0,5 l Zentrifugationstubes überführt und bei 10.000 rpm für 30 min in einer Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort nach der Zentrifugation vorsichtig abgossen. Die sedimentierten Zellen wurden mithilfe von

Tris/HCl Puffer pH 8 in 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und bei 6.000 rpm für 15 min in einer Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert (erster Waschschrift). Der Überstand wurde sofort nach der Zentrifugation vorsichtig abgegossen. Die sedimentierten Zellen wurden mithilfe von Tris/HCl Puffer pH 8 in 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und bei 6.000 rpm für 15 min in einer Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert (zweiter Waschschrift). Der Überstand wurde sofort nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen. Das so entstandene Pellet wurde gewogen und mit 5 ml/g Feuchtgewicht mit dem Extraktionsmittel 10 mM Tris/0,4% LDAO/pH 8 versetzt und kurz gevortext. Die Extraktion erfolgte bei RT auf einem Schüttler. Anschließend wurde der generierte Extrakt bei 6.000 rpm für 15 min in einer Kühlzentrifuge gewonnen. Der Überstand wurde in Zentrifugationsröhrchen (10 ml) überführt und bei 60.000 rpm für 1 Stunde bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation sofort vorsichtig abgegossen. Die Überstände bzw. Rohextrakte wurden bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

### **3.3.3. Anionenaustauschersäule (FPLC)**

Die FPLC (**f**ast **p**rotein **l**iquid **c**hromatography) kann im Rahmen der Gelfiltration-, Ionenaustauscher-, Affinitätschromatographie oder der Isoelektrischen Fokussierung verwendet werden und erreicht Flussraten von bis zu 5 ml/min (je nach Säulenmaterial). Mit der FPLC ist eine Aufreinigung von Proteinen, DNA und RNA mit hohem Durchsatz möglich. Bei der innerhalb dieser Arbeit verwendeten Duo Flow™-FPLC von BioRad wurde die Ansteuerung und Auswertung von einem Computer organisiert. Weiterhin waren ein Fraktionssammler sowie Meßsonden zur Erfassung von Leitfähigkeit, Extinktion im UV-Bereich (280 nm) und des Systemdrucks angeschlossen. Im Rahmen der FPLC-Aufreinigung wurden 1 ml des generierten Zellwandextraktes mithilfe der Pumpen auf eine UNO-Q-Säule (Biorad) bzw. eine Hi-Trap-Q-Säule (GE Healthcare) beladen. Nach dem Waschen der jeweiligen Säule mit 10 mM Tris/0,4% LDAO/pH 8 konnten sowohl die Streptomycin-bindende als auch die Fruktose-induzierte Pore selektiv mithilfe eines Salzgradienten (0 M – 1 M NaCl) von der Säule eluiert und in den jeweiligen Fraktionen erhalten werden.

### 3.3.4. Ultrafiltration

Um die Proteinkonzentrationen nach der FPLC-Anwendung zu erhöhen, wurden Ultrazentrifugenfilter (Amicon<sup>®</sup>) der Firma Millipore eingesetzt. Abweichend von der beiliegenden Gebrauchsanweisung wurde die Anwendung mit den Ergebnissen einer neuen Studie der Firma Millipore modifiziert. Das einsetzbare Volumen betrug 4 ml – 5 ml (Amicon<sup>®</sup> Ultra 4) bzw. 15 ml – 17 ml (Amicon<sup>®</sup> Ultra 15). Die errechnete Drehzahl lag bei 2950 rpm. Die Zentrifugationszeit betrug 30 min. Das Konzentrat ergab ca. 1 ml (Amicon<sup>®</sup> Ultra 4). Zum Dialysieren der Fraktionen nach einem Salzlauf wurde der Filtereinsatz mit salzfreiem Puffer aufgefüllt und der „Spin“ wiederholt.

### 3.3.5. Streptomycin-Sepharose-Säule

Als Matrix diente die Epoxy-aktivierte Sepharose 6B (gefriergetrocknet von Pharmacia). Die Angabe 6B bedeutet, dass die Perlen dieses Materials im gelösten Zustand aus 6%-iger Agarose bestehen. 1 g Trockenmaterial ergab ungefähr 3 ml Säulenvolumen. 3 g Epoxy-aktivierte Sepharose 6B wurden eingewogen und in ca. 50 ml ddH<sub>2</sub>O suspendiert. Die Suspension wurde mit einem Rührfisch ca. 5 min gerührt. Das aufgequollene Material wurde mit 1 l ddH<sub>2</sub>O über einen Glasfilter P3 gewaschen (Feuchtvolumen ca. 8 ml, Feuchtgewicht ca. 7 g). Die Sepharose wurde anschließend auf zwei 50 ml Greiner-Röhrchen (je 3,7 g) aufgeteilt. Die Epoxy-aktivierte Sepharose 6B enthält eine so genannte „ligand coupling efficiency“ von 33%. Um eine Endkonzentration von etwa 3 mM Streptomycinsulfat in der Matrix zu erhalten, wurden die beiden Ansätze daher mit je 5 Volumeneinheiten (= 2 x 25 ml) von 9 mM Streptomycinsulfat in NaOH-Lösung/pH 9,5 versetzt. Diese Mischung wurde ca. 10 bis 20 Stunden bei 35°C und 100 rpm inkubiert. Die Reaktionslösung musste auf einen pH-Wert von 9 bis 13 eingestellt werden. Die Ansätze wurden über einen Glasfilter P3 gegeben, so dass mit 500 ml NaOH/pH 9,5 der überschüssige Ligand abgewaschen werden konnte. Danach wurden insgesamt 90 ml 1 M Ethanolamin/pH 8 zugegeben und der Ansatz für 4 Stunden bei 45°C geschüttelt (restliche aktive Gruppen wurden abgesättigt). Die Ansätze wurden erneut über den Glasfilter P3 gegeben und in drei Zyklen wechselnder pH gewaschen. **(1)** 500 ml 0,1 M Na-Acetat/0,5 M NaCl/pH 4; **(2)** 500 ml 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>/0,5 M NaCl/pH 8; **(3)** 500 ml ddH<sub>2</sub>O). Das Säulematerial wurde in 5 Volumeneinheiten ddH<sub>2</sub>O (40 ml) suspendiert und entgast. Das von oben in suspendierter Form nachgefüllte Material packte sich nun langsam in die Säule. Sie durfte zu diesem Zeitpunkt nicht mehr trockenlaufen.

Bei der Benutzung einer für die FPLC-Aufreinigung präparierten Säule wurde diese am Auslauf, mit einem Teflonschlauch an eine Peristaltikpumpe angeschlossen (Geschwindigkeit= P150-200). Dabei waren neben dem Sammler nur ein UV-Detektor und ein Streifenschreiber angeschlossen. Die Geschwindigkeit der Peristaltikpumpe betrug 0,25 ml/min. Die Pumpe wurde auf diesen Wert, der Sammler auf 4 min pro Fraktion und der Schreiber auf 15 cm/h eingestellt. Ein Durchlauf dauerte somit 5 – 6 Stunden.

Die generierte Säule wurde alternativ an die Duo Flow-FPLC (Biorad) installiert. Am Gerät wurde eine Flussrate von 0,25 ml – 0,5 ml/min eingestellt. Nach der Entlüftung wurde die Schraube geschlossen und die Säule in die vertikale Endposition gebracht. Sie konnte mit dem Anfangspuffer equilibriert werden. Dieses wird mit einer Peristaltikpumpe angetrieben.

Die Elution mit freiem Streptomycin ergab einen breiten, nicht hinreichend sauberen Bereich im Elutionsspektrum. Die Ursache lag vermutlich an der schlechten sterischen Zugänglichkeit der Bindestelle für Streptomycin. Aus dieser Vermutung wurden zwei mögliche Wege für die Optimierung der Elution in Betracht gezogen. Anhand von Selektivitätsmessungen in vorangegangenen Arbeiten wurde davon ausgegangen, dass die Interaktion der Streptomycin-bindenden Pore und dem Streptomycin größtenteils durch die positiven Ladungen der „Guanidin-Arme“ des Streptomycins vermittelt werden sollten. Die Ladung des Antibiotikums muss von den entgegengesetzt geladenen Gruppen wie Aspartat und Glutamat am Porin angezogen werden. Aus dieser Überlegung ergaben sich die pH-Werte eines Puffersystems mit Ladepuffer (pH 7) und Elutionspuffer (pH 3 oder pH 12). Durch einen pH-Wert von 12 oder höher wurde das auf der Säulenmatrix gebundene Streptomycin entladen. Auch unspezifisch gebundene Proteine lösten sich und es bestand kein Auftrennungseffekt. Durch einen pH-Wert von 3 oder niedriger wurden die an der Interaktion mit dem Streptomycin beteiligten Aminosäuren des Proteins entladen. Durch die Kombination der Erkenntnisse beider Elutionsmöglichkeiten wurde eine Methode erarbeitet, die die unspezifisch gebundenen Proteine von den gesuchten Porinen trennen sollte. Dafür wurde die Probe bei neutralem pH-Wert auf die Säule geladen. Viele unspezifische Proteine waren im Durchlauf enthalten. In einem zweiten Schritt, dem Waschschrift, wurde der pH-Wert auf pH 5 linear abgesenkt. Die spezifisch an Streptomycin bindenden Proteine zeigten die stärkste Interaktion. Sie sollten größtenteils noch gebunden sein. Der Elutionsschritt erfolgte mithilfe eines Hochsalzpuffers (200 mM, 300 mM bzw. 1 M NaCl).

### 3.3.6. Proteinfällungen und SDS-PAGE

Die Proteinfällung nach Wessel und Flügge (1984) ist eine Fällung, bei der die Proteine gleichzeitig von Detergenz und Lipiden gereinigt werden können. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden zu 100 µl einer Proteinlösung 400 µl Methanol gegeben, gevortext und in einer bei 9000 g für 10 s zentrifugiert. Dazu wurden 100 µl Chloroform (bei hohem Gehalt an Lipid oder Detergenz in der Probe 200 µl) gegeben, gevortext und 10 s bei 9000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 300 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zugegeben, gründlich vermischt und 1 min bei 9000 x g zentrifugiert. Das denaturierte Protein befand sich in der Interphase. Die obere Phase wurde vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgezogen, ohne die Interphase zu zerstören. Zum verbleibenden Rest wurden 300 µl Methanol gegeben, gründlich vermischt und 5 min bei 9000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet, bestehend aus dem gefällten Protein, wurde bei RT oder alternativ in der Speedvac bei +40°C getrocknet.

Die sogenannte SDS-PAGE (**S**odium**d**odecyl**s**ulfate-**P**oly**a**crylamide **G**el **E**lektrophorese) wurde nach dem Laemmli Gelsystem (Laemmli, 1970) durchgeführt. Das Gelsystem nach Laemmli stellt ein etabliertes Standardverfahren zur Trennung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 20 kDa bis 200 kDa dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 10% – 12%-ige SDS-Gele verwendet. Die Proteine wurden sowohl unter denaturierenden Bedingungen mithilfe eines Bio-Rad Elektrophorese-Systems [Proben in 4x SDS Puffer (0,5 M Tris/10% SDS/Glycerol/Bromphenolblau und 0,01% β-Mercaptoethanol/pH 6,8) gekocht für 10 min bzw. ungekocht] bei 110 V und Raumtemperatur als auch unter nativeren Bedingungen (Proben in 4x SDS Puffer *ohne* Bromphenolblau und β-Mercaptoethanol) bei 80 V und 4°C aufgetrennt. Für die Detektierung der Proteine wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen (Blum *et al.*, 1987). Für die Gelelution wurde unmittelbar nach der SDS-PAGE ein Teil des Gels, inklusive des Markers, abgeschnitten und mit Silbernitrat eingefärbt. Der Rest des Gels verblieb zwischen den Glasplatten im Kühlschrank. Nach der Färbung wurden die beiden Gelteile wieder aneinander gelegt und auf der Laufhöhe der interessanten Banden ein Gelstück herausgeschnitten. Dieses Gelstück konnte in 1%-igem Genapol gelöst und zerkleinert werden. Der Ansatz wurde auf einem Schüttler über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proteine lösen sich über Nacht im Kühlschrank aus dem Gel. Der nach der Zentrifugation generierte Überstand wurde mithilfe der Black-Lipid-Bilayer Methode auf die entsprechende porenformende Aktivität untersucht.

### **3.3.7. Proteinsequenzierung**

Aus dem silbergefärbten Gel wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und gewaschen. Anschließend wurde jedes Gelstück mit einer Trypsinlösung inkubiert und die darin enthaltenen Proteine oder Proteinmischungen verdaut. Die Peptidstücke diffundieren in den Überstand, welcher direkt in die Nano-HPLC gegeben wurde. Die Probe wurde über zwei Charakteristika aufgetrennt. Es wird von einer 2D-HPLC gesprochen. In einem ersten Schritt wird der Ansatz entsalzt. Anschließend wird die Probe gesplittet und ein Teil über eine Reverse-Phase-Säule aufgetrennt. Die Elutionspeaks werden von einem Massenspektrometer aufgenommen und mit dem MALDI-TOF-Verfahren (**M**atrix **a**ssisted **L**aser **d**esorbed **I**onisation – **t**ime **o**f **f**light) analysiert. Aus einer Datenbank mit DNA-Sequenzen verwandter Stämme wurden Proteine in gleicher Weise, jedoch theoretisch, verdaut und fragmentiert. Die hypothetischen Spektren wurden mit dem ermittelten praktischen Spektrum verglichen und die Übereinstimmungen notiert. So wurden in diesem Beispiel 13 Aminosäuren aus einem Peptid identifiziert. Nach dieser Sequenz wurde mithilfe der BLAST-Datenbank nach Proteinen gesucht: Befinden sich mehrere Peptidsequenzen einer Probe im gleichen Protein der Datenbank, gilt es als in der Probe identifiziert. Die Sequenzen der identifizierten Proteine wurden mit Algorithmen zur Bestimmung der Präferenz für  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Kehre untersucht (Eisenhaber, 1996). Mithilfe der BLAST-Suche (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) wurde in der Proteinstrukturdatenbank (PDB) nach einer homologen, bekannten 3D-Struktur gesucht. Die erhaltenen Strukturen wurden hinsichtlich ihrer mutmaßlichen porenformenden Aktivität untersucht.

### **3.3.8. Black-Lipid-Bilayer Methode**

Das Verfahren der Black-Lipid-Bilayer Experimente wurde bereits beschrieben (Benz *et al.*, 1978). Die Messapparatur ist auf einer schwingungsgedämpften Unterlage aufgebaut, um erschütterungsbedingte Signalschwankungen und ein Zerreißen der Membran zu reduzieren. Die Messküvette und die Elektroden befinden sich in einem Metallgehäuse, welches als Faraday'scher Käfig wirkt. Durch ein Loch im Metallgehäuse kann die Membran mit einem Ablesefernrohr beobachtet werden. Eine externe Lichtquelle ermöglicht eine Beleuchtung der Membran. Die um 10° schräggestellte Trennwand zwischen den Kompartimenten bewirkt, dass Lichtreflexionen am Glasfenster der Küvette die Beobachtung nicht stören. Unter dem

Metallgehäuse befindet sich ein Magnetrührer, der eine Mischung der Elektrolytlösung durch kleine Magnetrührfische erlaubt.

Das Kernstück der Apparatur ist die Teflonküvette, die durch eine Trennwand in zwei Kompartimente geteilt ist. In der Trennwand befindet sich eine kreisförmige Öffnung, die auf der Vorderseite kegelförmig gesenkt ist (Bohrungsstärke: 0,07 mm; Bohrungsfläche: 0,5 mm<sup>2</sup>). Der Lipidfilm wird über die Öffnung gespreitet. Die in dieser Arbeit verwendeten künstlichen Lipidbilayermembranen wurden mithilfe des 1%-igen (w/v) in *n*-Dekan gelösten Diphytanoylphosphatidylcholin (PC) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) generiert. Die Öffnung schillert zunächst in den Newton'schen Farben, bis durch Abfließen der Lösung aus dem vielschichtigen Lipidfilm eine bimolekulare Schicht entstanden ist. Der erhaltene Bilayer hat die Dicke einer natürlichen Membran (ca. 6 nm) und erscheint schwarz. Die nativen Porine der *Streptomyces* Arten konnten daraufhin in die Elektrolytlösungen zugegeben werden. Das sog. „Schwarzwerden“ der Membran beruht darauf, dass das von der Membran auf der Vorder- und Rückseite reflektierte Licht einen Gangunterschied von  $\lambda/2$  besitzt und sich die Wellen der gleich großen Amplituden gegenseitig auslöschen. Die flächenspezifische Leitfähigkeit einer reinen Lipidmembran beträgt in 1 M NaCl-Lösung etwa 10 nS/cm<sup>2</sup>. In die elektrolytgefüllten Kompartimente tauchen Ag/AgCl-Elektroden ein. Eine Elektrode ist an die Spannungsquelle angeschlossen, die andere leitet den durch die Membran fließenden Strom ab. Sie ist je nach Art der Messung mit einem Elektrometer (Selektivitätsmessung) oder einem Verstärker (Einzelkanalmessung) verbunden. Der Verstärker (Keithley 427) wandelt ein Stromsignal in ein Spannungssignal mit einer Verstärkung von 10<sup>7</sup> V/A bis zu 10<sup>11</sup> V/A um und überträgt das Signal auf einen Streifenschreiber und ein Oszilloskop. Die Temperatur während den Messungen betrug durchweg 20°C.

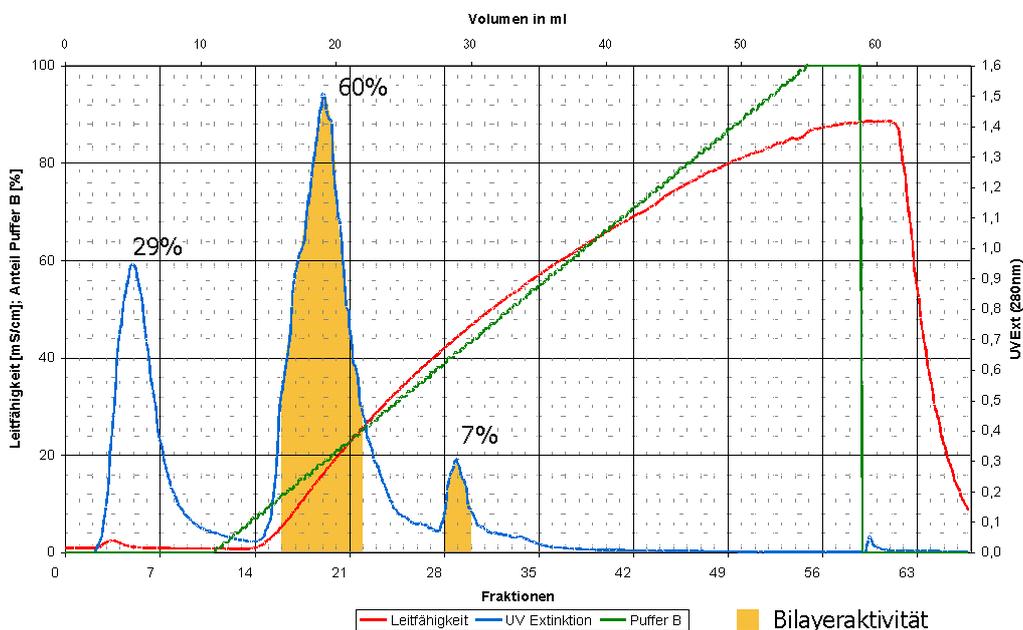
Wenn ein Kanal spannungsabhängig ist, hängt sein Öffnungszustand von dem Spannungswert ab, der über dem Kanal anliegt. Viele Porine schließen, wenn die Spannung einen bestimmten Wert überschreitet. Diese Schaltvorgänge erfolgen nicht nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, sondern über Zwischenstufen. Verantwortlich hierfür sind Konformationsänderungen der Proteine, geladene Gruppen treten in Wechselwirkung mit dem anliegenden elektrischen Feld. Mit der Messung der Spannungsabhängigkeit der Streptomycin-bindenden Pore aus *Streptomyces griseus* ATCC 15395 wurde begonnen, sobald nach einiger Zeit (10 min – 15 min) kaum mehr Poren in die Membran einbauten. Der Schreiberstift wurde auf die Papiermitte justiert und Spannungen bis maximal +/-100 mV ausgehend von +/-10 mV in 10 mV Schritten angelegt. Die Höhe des Schreiberausschlags nach Einschalten der Spannung entspricht der Summe der Einzelkanal-Leitfähigkeiten der eingebauten offenen Kanäle.

Besteht eine Spannungsabhängigkeit, werden einzelne Kanäle schließen, die Leitfähigkeit der Membran wird abnehmen und der Schreiberausschlag sich somit verringern. Die jeweilige Spannung wurde solange angelegt bis die Leitfähigkeit nicht mehr abnahm, d.h. der Endwert  $G$  erreicht wurde. Der bei  $\pm 10$  mV gemessene Wert der Leitfähigkeit wird als  $G_o$ , als Leitfähigkeit ohne angelegte Spannung, bezeichnet. Bei dieser Spannung sind unter Standardversuchsbedingungen (10 mM Tris/1 M KCl/pH 8) alle Poren geöffnet bzw. schließen nur sehr langsam.

### 3.4. Ergebnisse

#### 3.4.1. Streptomycin-bindendes Porin aus *S. coelicolor*, *S. griseus* und *S. lividans*

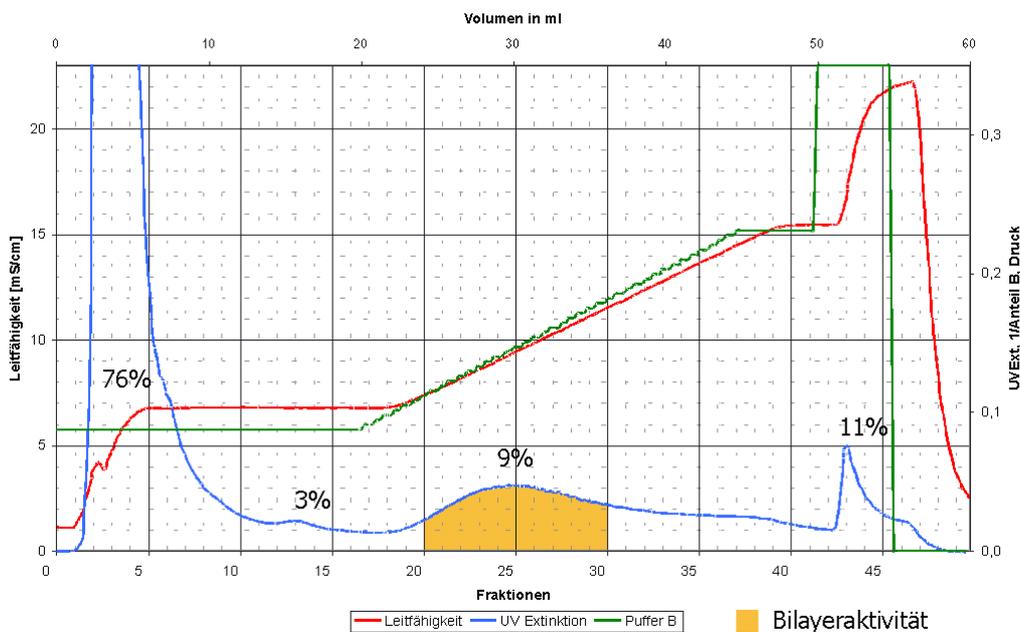
Die Vorgehensweise zur Etablierung eines optimalen Laufsteuerungsprofils wurde unter 3.3.3. bzw. 3.3.5. beschrieben. Ausgehend von der Homologie zwischen den porenformenden Proteinen der drei *Streptomyces* Arten sollte dieses Laufsteuerungsprofil und die dazugehörige Elutionskonzentration zunächst für *S. griseus* als Modell für die Aufreinigung der Porine dienen. Dabei wurde das Laufprofil von Kim *et al.* (2001) als Ausgangspunkt verwendet. Abbildung 3.1. zeigt das Laufprofil mit den Standardparametern pH 8 (Tris/HCl gepuffert) und 1 M NaCl. In den durch die gelben Schattierungen gekennzeichneten Fraktionen wurde mithilfe der Black-Lipid-Bilayer Methode eine porenformende Aktivität nachgewiesen. Der zweite Elutionspeak (Fraktion 29) zeigte zwar eine porenformende Aktivität, jedoch war die Qualität der Ereignisse nur verrauscht detektierbar. Dieser Bereich wurde für die nachfolgenden Schritte vernachlässigt. Der erste Peak (Fraktion 20), mit  $\frac{2}{3}$  des Proteins, zeigte eine hohe Aktivität. Der Anteil am Gesamtprotein weist darauf hin, dass der Grad der Aufreinigung noch sehr niedrig ist.



**Abb.3.1.** FPLC-Laufprofil von *S. griseus* (pH 8; B= 1 M NaCl; Kim *et al.*, 2001). 1 ml des LDAO-Überstands wurde auf die HiTrapQ-Säule aufgetragen; die Hochsalzkonzentration ist in rot, die UV-Absorption des Durchlaufs ist in blau dargestellt. Der porenformende Bereich ist gelb markiert. Die Zahlen an der Grundlinie geben die einzelnen Fraktionen des Fraktionssammlers wider.

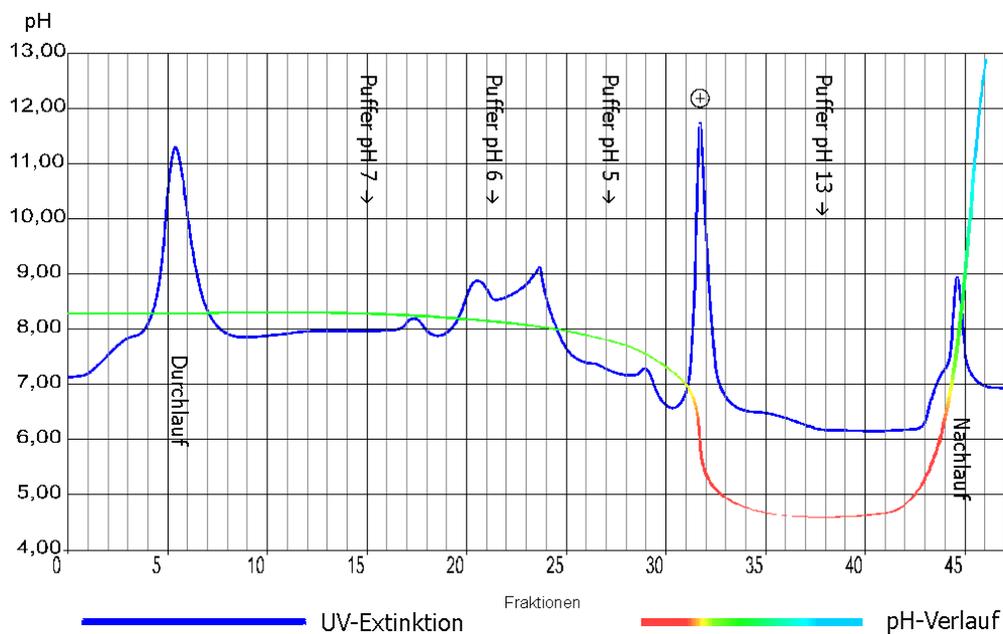
Daher wurden grundsätzliche Veränderungen vorgenommen. Der pH-Wert des gelösten Porins aus *S. griseus* wurde auf 11,5 eingestellt (vorher pH 8), so dass der Anteil der negativen Ladungen im Kanalmund erhöht werden konnte. Mit der pH-Verschiebung sollte die Bindung des gesuchten Proteins an die positiv geladene Säulenmatrix optimiert werden. Als Hochsalzpuffer wurde eine 200 mM NaCl-Lösung verwendet, da der Elutionshochpunkt bereits bei einer Salzkonzentration unter 200 mM erreicht werden konnte (Kim *et al.*, 2001).

Mit diesen Veränderungen ließ sich tatsächlich ein Großteil der restlichen Proteine aus *S. griseus* von den aktiven Fraktionen trennen. Darin lag jedoch eine Überschneidung mit dem vorangehenden Peak vor, die durch ein gestuftes Steuerungsprofil aufgelöst werden sollte. Das damit generierte Laufprofil, mit der höchstmöglichen Aufreinigung im Rahmen der Anionenaustauscherchromatographie, ist in Abbildung 3.2. dargestellt.



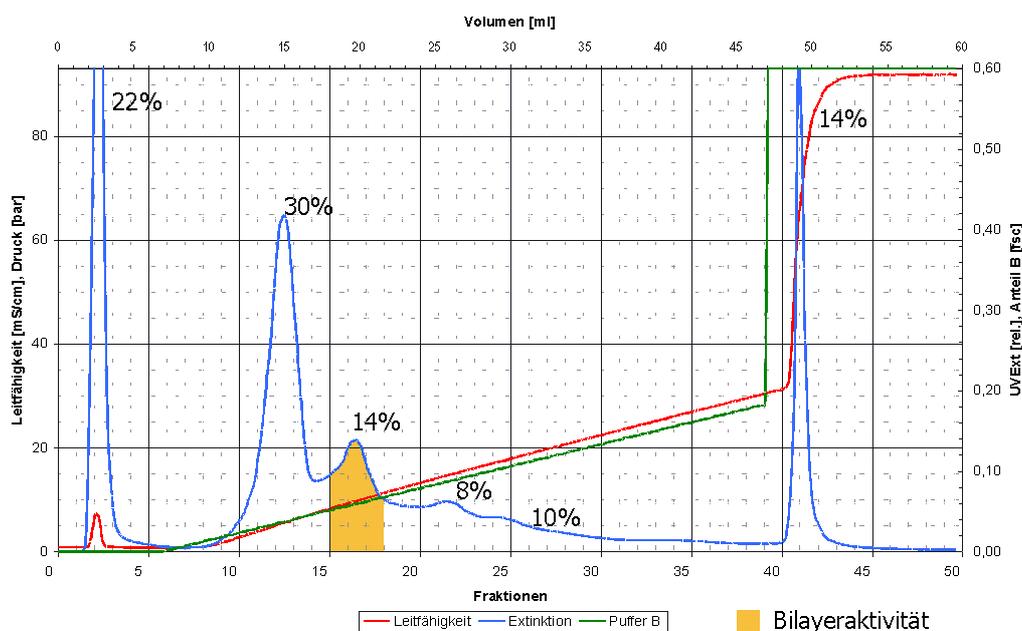
**Abb.3.2.** FPLC-Laufprofil von *S. griseus* (pH 11,5; verändertes Puffersystem; B= 200 mM NaCl). 1 ml des LDAO-Überstands wurde auf die HiTrapQ-Säule aufgetragen; die Hochsalzkonzentration ist in rot, die UV-Absorption des Durchlaufs ist in blau dargestellt. Der porenformende Bereich ist gelb markiert. Die Zahlen an der Grundlinie geben die einzelnen Fraktionen des Fraktionssammlers wider.

Die als „aktiv“ markierten Fraktionen wurden mit der Ultrafiltrationsmethode konzentriert und entsalzt. Im Anschluss wurde diese konzentrierte Probe mithilfe der Streptomycinsäule (Abb. 3.3.) aufgereinigt. Die pH-Elutionslösungen wurden -wie in Abbildung 3.3. markiert- zugegeben, um das Streptomycin-bindende Porin selektiv zu erhalten. Der Schreiber Ausdruck wurde digitalisiert. Der Durchlauf bzw. Nachlauf sowie die Fraktionen 18 bis 30 zeigten keine porenformende Aktivität. In den beiden Fraktionen 32 und 33 konnte die porenformende Aktivität der gesuchten Streptomycin-bindende Pore mithilfe der Black-Lipid-Bilayer Methode nachgewiesen werden. Damit konnte die Trennung der Streptomycin-bindenden Pore aus *S. griseus* von weiteren porenformenden Verunreinigungen erreicht werden.



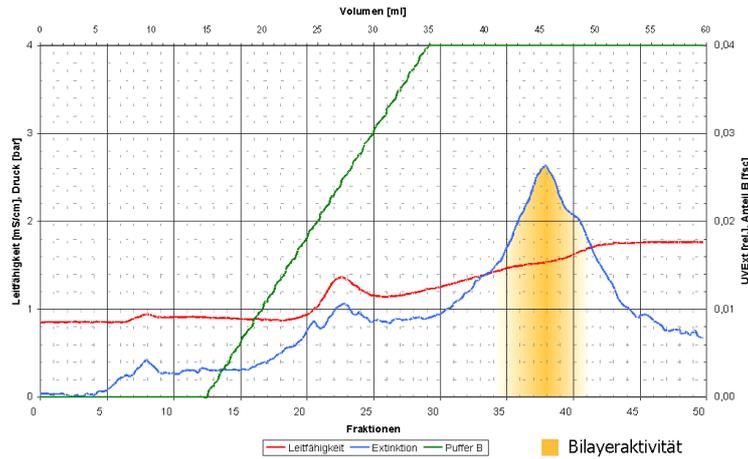
**Abb.3.3.** FPLC-Laufprofil von *S. griseus* (pH 11,5; B= 200 mM NaCl). 1 ml des LDAO-Überstands (nach der Ultrafiltration) wurde auf die Streptomycinsäule aufgetragen; die Hochsalzkonzentration ist in rot, die UV-Absorption des Durchlaufs ist in blau dargestellt. Der porenformende Bereich ist mit einem ⊕ markiert. Die Zahlen an der Grundlinie geben die einzelnen Fraktionen des Fraktionssammlers wieder.

Zur Aufreinigung der Streptomycin-bindenden Pore aus *S. lividans* wurden von Prof. Ramon Santamaria verschiedene Zellwandextrakte zur Verfügung gestellt. Das erarbeitete Aufreinigungsprofil (Abb. 3.4.) zeigte im Vergleich zur Aufreinigung mit *S. griseus*, deutlichere Peaks und musste daher nicht mit einer Stufen-Gradienten-Kombination optimiert werden.



**Abb.3.4.** FPLC-Laufprofil von *S. lividans* (pH 8; B= 1 M NaCl), Salzgradient bis 300 mM. 1 ml des LDAO-Überstands wurde auf die HiTrapQ-Säule aufgetragen; die Hochsalzkonzentration ist in rot, die UV-Absorption des Durchlaufs in blau dargestellt. Der porenformende Bereich ist gelb markiert. Die Zahlen an der Grundlinie geben die einzelnen Fraktionen des Fraktionssammlers wider.

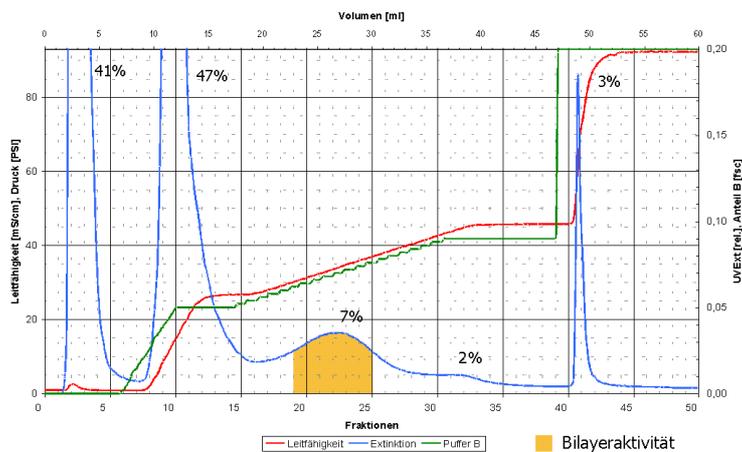
Nach der FPLC-Aufreinigung erfolgte wiederum eine Affinitätschromatographie (Streptomycinsäule), so dass die selektive Aufreinigung der Streptomycin-bindenden Pore aus *S. lividans* gewährleistet werden konnte. Dazu wurden die „aktiven“ Fraktionen nach der FPLC-Aufreinigung vereint, konzentriert und entsalzt. Die entsalzte Probe wurde auf den pH-Wert von 7,5 eingestellt. Während der Aufreinigung (Abb. 3.5.) wurde der pH Wert von 7,5 auf 5,0 im Puffersystem erniedrigt, um die Verunreinigungen von der Säulematrix zu lösen. Nach der Stabilisierung des pH-Wertes (ab Fraktion 39) verringerte sich der Anteil des eluierten Streptomycin-bindenden Porins. Damit konnte das Porin selektiv mithilfe einer pH-Veränderung des Puffersystems gewonnen werden. Die porenformende Aktivität des Streptomycin-bindenden Proteins aus *S. lividans* konnte in Fraktion 38 bestätigt werden.



**Abb.3.5.** FPLC-Laufprofil von *S. lividans* (pH 7,5 nach pH 5; B= 1 M NaCl), Salzgradient bis 300 mM. 1 ml des LDAO-Überstands wurde auf die Streptomycinsäule aufgetragen; die Hochsalzkonzentration ist in rot, die UV-Absorption des Durchlaufs ist in blau dargestellt. Der porenformende Bereich ist gelb markiert. Die Zahlen an der Grundlinie geben die einzelnen Fraktionen des Fraktionssammlers wider.

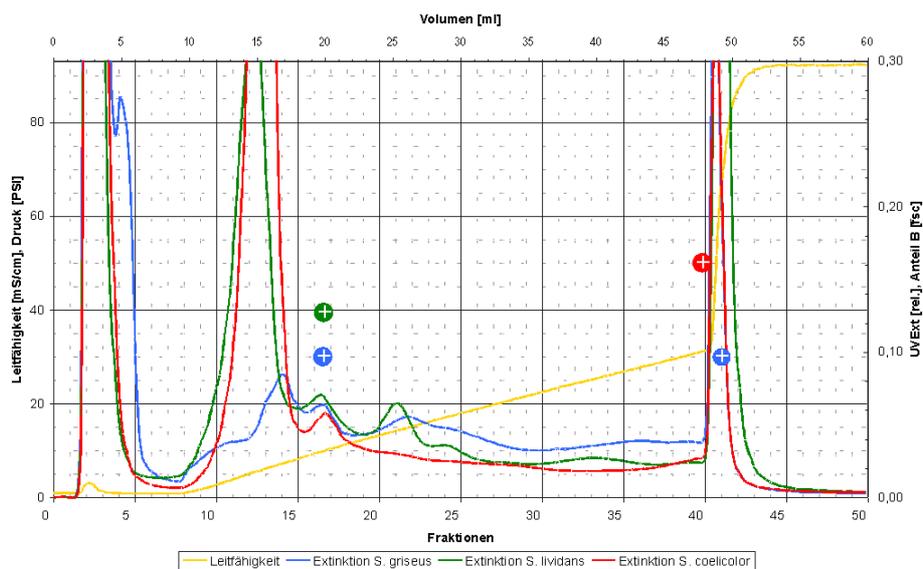
Die FPLC-Aufreinigung der Streptomycin-bindenden Pore aus *S. coelicolor* weicht von der für *S. griseus* ermittelten Elutionskonzentration ab. Die Elutionskonzentration lag mit 300 mM NaCl um 220 mM (*S. griseus*) bzw. 200 mM (*S. lividans*) höher als bei den FPLC-Aufreinigungen der anderen beiden *Streptomyces* Arten.

Abbildung 3.6. veranschaulicht das optimale Aufreinigungsprofil für *S. coelicolor*, das nach einigen Kalibrierungsschritten erhalten werden konnte. Eine Auftrennung der konzentrierten, „aktiven“ Fraktionen mithilfe der Affinitätschromatographie auf der Streptomycinsäule erfolgte für *S. coelicolor* noch nicht.



**Abb.3.6.** FPLC-Laufprofil von *S. coelicolor* (pH 8; B=1 M NaCl), gestufter Salzgradient. 1 ml des LDAO-Überstands wurden auf die HiTrapQ-Säule aufgetragen; die Hochsalzkonzentration ist in rot, die UV-Absorption des Durchlauf ist in blau dargestellt. Der porenformende Bereich ist gelb markiert. Die Zahlen an der Grundlinie geben die einzelnen Fraktionen des Fraktionssammlers wider.

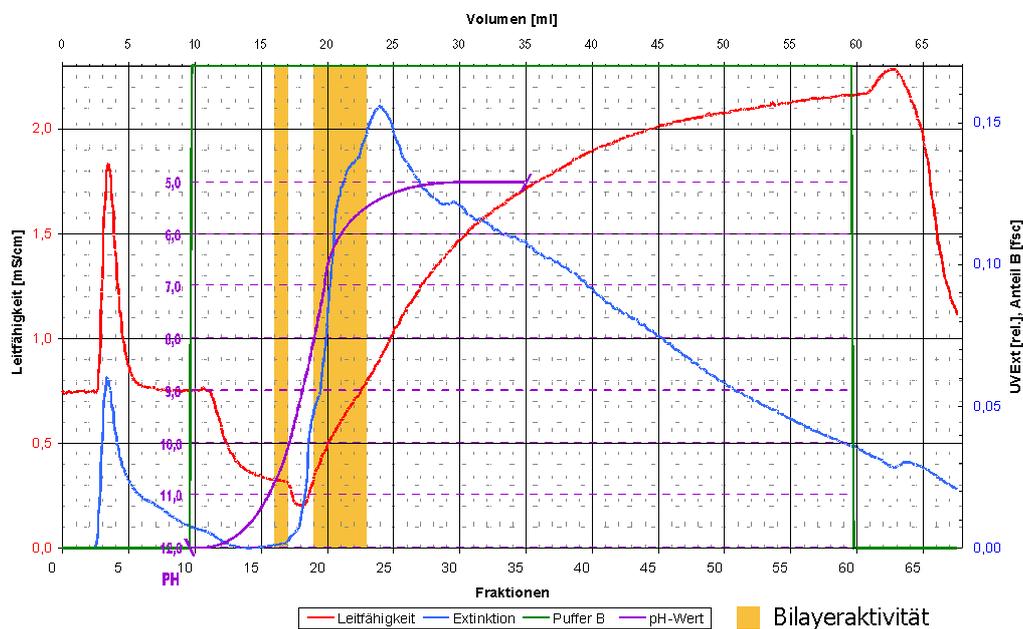
Es wurde für alle drei untersuchten *Streptomyces* Arten im Rahmen der Anionenaustauscherchromatographie die bestmögliche Aufreinigung gefunden. Das Elutionsverhalten war teilweise sehr unterschiedlich. Abbildung 3.7. zeigt den Vergleich von drei FPLC-Läufen mit demselben Steuerungsprofil. Die stärksten Elutionsstellen (porenformende Bereiche) sind durch farbige Punkte mit einem „Plus“ markiert.



**Abb.3.7.** Vergleichendes FPLC-Laufprofil der drei untersuchten *Streptomyces* Arten (pH 8; B= 1 M NaCl), Salzgradient bis 300 mM. 1 ml des LDAO-Überstands wurde auf die HiTrapQ-Säule aufgetragen; die Hochsalzkonzentration ist in gelb, die UV-Absorptionen sind in blau (*S. griseus*), grün (*S. lividans*) bzw. rot (*S. coelicolor*) dargestellt. Die porenformenden Bereiche sind mit einem „Plus“ markiert. Die Zahlen an der Grundlinie geben die einzelnen Fraktionen des Fraktionssammlers wider.

### 3.4.2. Fruktose-induziertes Porin aus *S. griseus* und *S. lividans*

Zu Beginn der Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen, um die porenformenden Proteine über eine andere Eigenschaft als die Ionenstärke der Oberfläche oder den spezifischen Liganden aufzutrennen zu können. Die isoelektrische Fokussierung sollte eine solche Methode sein. Durch gezielte Steuerung des Pufferanteils eines basischen und eines sauren Puffers und die Pufferwirkung des Säulenvolumens konnte ein schmaler Übergangsbereich geschaffen werden. Abbildung 3.8. zeigt den Verlauf der Auftrennung von *S. griseus*. Darin sind zwei voneinander getrennte Bereiche, die als „aktiv“ markiert wurden, erkennbar.



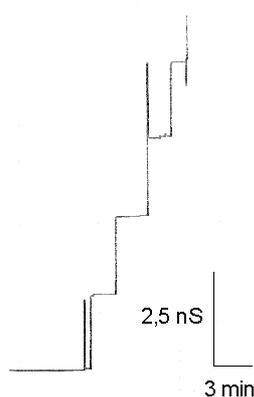
**Abb.3.8.** Isoelektrische Fokussierung im Rahmen eines FPLC-Laufprofils von *S. griseus* (Fruktosemedium). 1 ml des LDAO-Überstands wurde auf die HiTrapQ-Säule aufgetragen; die Hochsalzkonzentration ist in rot, die UV-Absorption des Durchlaufs ist in blau, die pH-Werte sind in lila dargestellt. Der porenformende Bereich ist gelb markiert. Die Zahlen an der Grundlinie geben die einzelnen Fraktionen des Fraktionssammlers wider.

Fraktion 17 zeigte eine porenformende Aktivität mit einer Einzelkanal-Leitfähigkeit von 2,1 nS in 1 M KCl (Abb. 3.9.). Die 2,1 nS Pore konnte bei einem pH-Wert von 10,5 eluiert werden. In 1 M LiCl wurde eine Einzelkanal-Leitfähigkeit von 1,3 nS gemessen. Das Verhältnis zwischen den beiden Werten beträgt 1,6. Dieses Verhältnis entspricht dem Verhältnis aus den beiden generierten Werten von *S. lividans* (4,3 nS in 1 M KCl bzw. 2,8 nS in 1 M LiCl; Dörner, 2004 *Dissertation*). Die Einzelkanal-Leitfähigkeit (850 pS) in den Fraktionen 20 bis 23 bestätigte dabei die bekannte Größe der Streptomycin-bindende Pore aus *S. griseus*. Die Streptomycin-bindende Pore (850 pS) löste sich erst bei einem pH-Wert um 7,5.

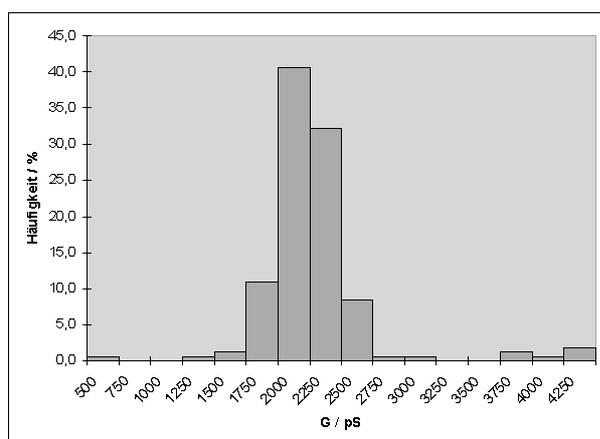
Tabelle 3.2. fasst die Einzelkanal-Leitfähigkeiten der drei *Streptomyces* Arten zusammen. Darüber hinaus geben die Abbildungen 3.10.A. und 3.10.B. die jeweiligen Histogramme, denen die obige Fraktion 17 zugrunde liegt, wider.

**Tab. 3.2.** Zusammenfassung der Einzelkanal-Leitfähigkeiten der drei *Streptomyces* Arten in 1 M KCl, 1 M LiCl sowie 1 M KAc. (\* Werte von Dörner, 2004 *Dissertation* bzw. Kim *et al.*, 2001)

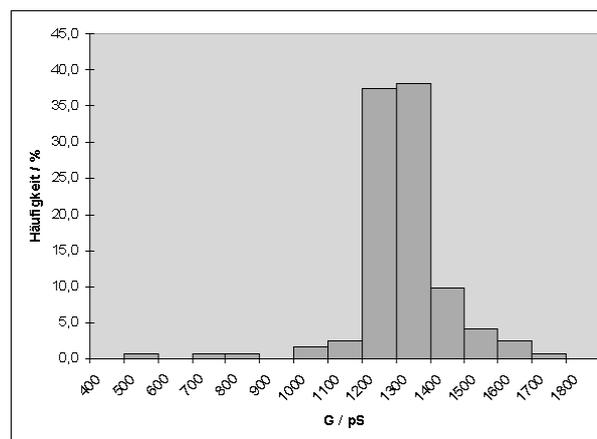
	Einzelkanal-Leitfähigkeit [pS]		
	1 M KCl	1 M LiCl	1 M KAc
<i>S. lividans</i>	1900 *	670 *	1300 *
<i>S. lividans</i> (Fruktose-induziertes Porin)	4250 *	2750 *	3250 *
<i>S. griseus</i>	850 *	530 *	580 *
<i>S. griseus</i> (Fruktose-induziertes Porin)	2100	1300	unbekannt
<i>S. coelicolor</i>	1750 *	600 *	1500 *
<i>S. coelicolor</i> (Fruktose-induziertes Porin)	unbekannt	unbekannt	unbekannt



**Abb.3.9.** Schreiberauszug der Einzelkanal-Leitfähigkeit nach der cis-Zugabe des **Fruktose-induzierten Porins** aus *S. griseus* in 1 M KCl ( $U = 20$  mV;  $10^9$  V/A; 500 mV fsc;  $T = 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan).



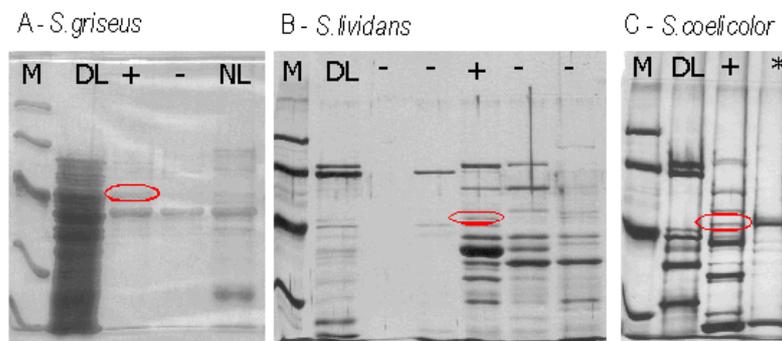
**Abb.3.10.A.** Histogramm der Einzelkanal-Leitfähigkeit nach der cis-Zugabe des **Fruktose-induzierten Porins** aus *S. griseus* in 1 M KCl ( $U = 20$  mV;  $10^9$  V/A; 500 mV fsc;  $T = 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan). Der häufigste Einzelkanal-Leitfähigkeitswert (165 Poren) betrug 2,1 nS.



**Abb.3.10.B.** Histogramm der Einzelkanal-Leitfähigkeit nach der cis-Zugabe des **Fruktose-induzierten Porins** aus *S. griseus* in 1 M LiCl ( $U = 20$  mV;  $10^9$  V/A; 500 mV fsc;  $T = 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan). Der häufigste Einzelkanal-Leitfähigkeitswert (123 Poren) betrug 1,3 nS.

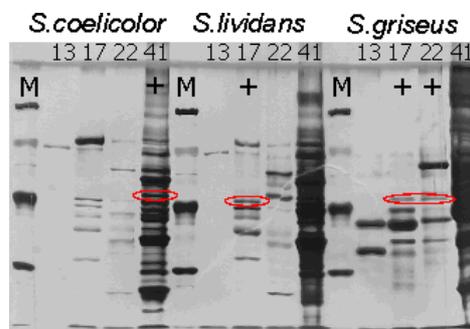
### 3.4.3. Proteinfällungen und SDS-PAGE

Abbildung 3.11. zeigt die SDS-PAGE der drei *Streptomyces* Arten nach der Anionenaustauscherchromatographie. Die rot markierten Banden könnten das gesuchte Protein enthalten. Die Vermutung der richtigen Bande erfolgte insbesondere nach dem Vergleich zwischen der jeweiligen „aktiven“ und *nicht* „aktiven“ Fraktion. Danach traten die rot markierten Banden in den *nicht* „aktiven“ Fraktionen auf der entsprechenden molekularen Laufhöhe nicht auf. Die Anionenaustauscherchromatographie von *S. griseus* (rechtes Gel) wurde auf der UNO-Q-Säule durchgeführt. Zudem wurde im Rahmen der FPLC-Aufreinigung von *S. lividans* bzw. *S. coelicolor* eine HiTrap-Q-Säule (mittiges bzw. linkes Gel) für die Duo-Flow-FPLC adaptiert und verwendet.



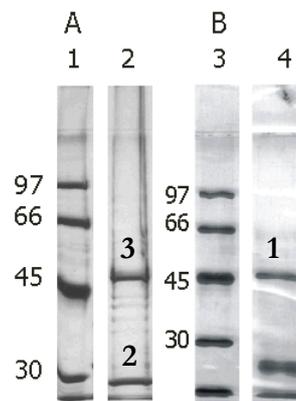
**Abb.3.11.** SDS-PAGE nach der FPLC (HiTrapQ-Säule). **A-** *S. griseus*; **B-** *S. lividans*; **C-** *S. coelicolor*.  
M: Marker; DL: Durchlauf; NL: Nachlauf; +: „aktive“ Fraktion; -: *nicht* „aktive“ Fraktion;  
\*: Zum Vergleich ist die „aktive“ Fraktion von *S. lividans* nach der Aufreinigung (Streptomycinsäule) dargestellt.

Das in Abbildung 3.12. dargestellte SDS-Gel gibt den Vergleich der beschriebenen drei FPLC-Läufe mit demselben Steuerungsprofil wider (siehe Abb. 3.7.). Unter Berücksichtigung der Aktivität der einzelnen Fraktionen und des angenommenen Molekulargewichts konnten durch Ausschluss auch hier Banden gefunden werden, die das gesuchte Protein enthalten könnten.



**Abb.3.12.** SDS-PAGE nach der FPLC (HiTrapQ-Säule bzw. UNO-Q-Säule).  
Vergleich der beschriebenen FPLC-Läufe (siehe Abb.3.7.) der drei *Streptomyces* Arten mit demselben Steuerungsprofil.

Nach der Aufreinigung mithilfe der Streptomycinsäule konnte bei den beiden *Streptomyces* Arten *S. lividans* und *S. griseus* ein einheitliches charakteristisches Bandenmuster erhalten werden (Abb. 3.13.). Dieses Bandenmuster zeigt weniger Verunreinigungen als die Gele unmittelbar nach der Anionenaustauscherchromatographie. Damit bestätigt sich die verbesserte Aufreinigung nach der Anwendung der Streptomycinsäule. Die obere Bande befindet sich auf der Höhe von 51 kDa und die untere bei 28 kDa. Die geringe Abweichung der jeweiligen molekularen Banden ist auf die prozentuale Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele zurückzuführen (**A:** 10% bzw. **B:** 12%). Die drei markierten Banden wurden mithilfe der MALDI-TOF Methode (**M**atrix **a**ssisted **L**aser **d**esorbed **I**onisation – **t**ime **o**f **f**light) sequenziert. Die Banden 1 und 3 ergaben eine Enolase von *S. coelicolor* bzw. eine putative Enolase von *S. avermitilis*. Darüber hinaus konnte in Bande 3 als zweites Protein eine Aminotransferase identifiziert werden. Das Protein aus Bande 2 lieferte eine Eisen-Zink-Superoxid Dismutase von *S. griseus*.



**Abb.3.13.A.:** 10%-ige SDS-PAGE von *S. lividans*; **3.13.B.:** 12%-ige SDS-PAGE von *S. griseus*.

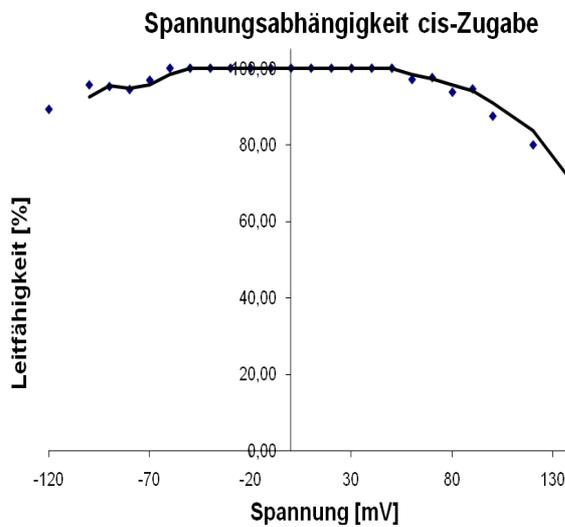
**Spur 1 und 3:** LMW-Marker,

**Spur 2 und 4:** „aktive“ Fraktionen nach der Aufreinigung mithilfe der Streptomycinsäule.

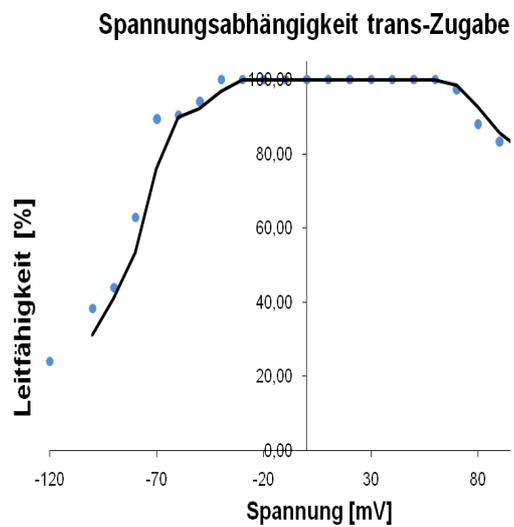
### 3.4.4. Spannungsabhängigkeit der Streptomycin-bindenden Pore

Die Messung der Spannungsabhängigkeit des Streptomycin-bindenden Porins aus *S. griseus* wurde nach der Membransättigung in  $\pm 20$  mV-Schritten durchgeführt. Dabei wurde nach jeder Spannungsänderung über den Schreiberdruck die Restleitfähigkeit in Prozent berechnet. Abbildung 3.14. zeigt die jeweilige Glockenkurve der Spannungsabhängigkeit nach der cis- bzw. trans-Zugabe. Nach der cis-Zugabe ist ein Abfall der Kurve zwischen +70 mV und +130 mV der Leitfähigkeit im positiven Spannungsbereich um bis zu 30% zu beobachten. Im negativen Spannungsbereich nimmt die Leitfähigkeit bei -70 mV lediglich um etwa 10% ab. Nach der

trans-Zugabe des Proteins verhält sich der Effekt genau umgekehrt und die Leitfähigkeit nimmt im negativen Spannungsbereich zwischen -50 mV und -120 mV um 70% ab. Im positiven Bereich konnte nach der trans-Zugabe lediglich eine Erniedrigung der Leitfähigkeit von 20% gemessen werden. Damit bleibt festzuhalten, dass die Seite der Zugabe der Streptomycin-bindenden Pore entscheidend für die Erniedrigung der Gesamtleitfähigkeit ist. Der Schluss liegt dem zur Folge nahe, dass die Pore gerichtet in die künstliche Black-Lipid-Bilayer Membran inseriert und dadurch jeweils einseitig die Konformationsänderungen ausgelöst werden können.



**Abb.3.14.A.** Glockenkurve der Spannungsabhängigkeit. Verhältnis der Leitfähigkeit  $G$  (bei angelegter Spannung  $V_m$ ) zur Leitfähigkeit  $G_0$  (bei 10 mV Spannung) als Funktion der angelegten Spannung  $V_m$ . **Cis-Zugabe** des Streptomycin-bindenden Porins aus *S. griseus* in 1 M KCl ( $U= 20$  mV;  $10^8$  V/Å; 20 V fsc;  $T= 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan).



**Abb.3.14.B.** Glockenkurve der Spannungsabhängigkeit. Verhältnis der Leitfähigkeit  $G$  (bei angelegter Spannung  $V_m$ ) zur Leitfähigkeit  $G_0$  (bei 10 mV Spannung) als Funktion der angelegten Spannung  $V_m$ . **Trans-Zugabe** des Streptomycin-bindenden Porins aus *S. griseus* in 1 M KCl ( $U= 20$  mV;  $10^8$  V/Å; 20 V fsc;  $T= 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan).

## 3.5. Diskussion

### 3.5.1. Streptomycin-bindendes Porin aus *S. coelicolor*, *S. griseus* und *S. lividans*

Innerhalb der Mycobakterien konnten konservierte Porine gefunden werden (Trias und Benz, 1993), die allesamt auf einen gemeinsamen Vorläufer schließen ließen. So könnte auch die Streptomycin-bindende Pore einen Ursprung haben. Das zeigt sich an der gemeinsamen Streptomycin-Bindestelle innerhalb des jeweiligen Porins aus *S. lividans*, *S. griseus* und *S. coelicolor*. Neben *S. lividans* konnte auch in *S. coelicolor* eine Bindestelle für Streptomycin bestimmt werden, obwohl diese beiden *Streptomyces* Arten keine für die Streptomycinsynthese notwendigen Gene besitzen. Interessanterweise liegen die Halbsättigungskonzentrationen bei *S. lividans* und *S. coelicolor* (15  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$ ; Dörner, 2004 *Dissertation*) sogar um einiges niedriger als bei dem Streptomycin-Produzenten *S. griseus* selbst (60  $\mu\text{M}$ ; Kim *et al.*, 2001). Insgesamt ist die Verwandtschaft der *Streptomyces* Arten sehr hoch. Nach einem Vergleich der beiden Stämme *S. coelicolor* und *S. griseus* auf 16sRNA Basis mithilfe von NCBI (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool, Zhang und Madden, 1997; Altschul *et al.*, 1990) konnte eine Identität von über 96% beider Gene ermittelt werden. Demzufolge sollte die Streptomycin-bindende Pore in allen drei untersuchten Arten strukturell sehr ähnlich aufgebaut sein, wenngleich die Streptomycin-bindende Pore aus *S. griseus* im Vergleich zu *S. lividans* und *S. coelicolor* mit 850 pS die geringste Einzelkanal-Leitfähigkeit in 1 M KCl aufweist. Dieser Fakt kann über die Diversität einiger Aminosäuren im Kanal bzw. Kanalmund sowie über denkbare post-translationale Modifikationen erklärt werden. Die geringfügig unterschiedlichen biochemischen bzw. -physikalischen Eigenschaften im Kanalmund der Streptomycin-bindenden Pore könnten daher womöglich durch die alternativ exponierten Aminosäuren variieren. Aufgrund einer veränderten Anordnung bzw. Substitution der Aminosäuren innerhalb der Streptomycin-bindenden Pore kann mit Gentamycin ein weiteres Aminoglykosid-Antibiotikum in *S. coelicolor*, allerdings nicht von der Streptomycin-bindenden Pore in *S. lividans* bzw. *S. griseus* gebunden werden. Daher kann die unterschiedliche Anordnung der Aminosäuren im Kanal bzw. Kanalmund die Selektivität von *S. griseus* (850 pS) im Vergleich zu *S. coelicolor* (1,75 nS) und *S. lividans* (1,9 nS) geringfügig verändern.

Anhand der Titrationsversuche wird deutlich (Dörner, 2004 *Dissertation*), dass die Streptomycin-bindende Pore nicht alle Vertreter der Aminoglykoside bindet. So konnten lediglich Bindestellen für Streptomycin und Gentamycin bestimmt werden. Mithilfe einer Sequenzdatenanalyse konnten bis dato mehr als 20 Cluster im Genom von *S. coelicolor* ermittelt

werden, die für weitere mutmaßliche Sekundärmetabolite codieren (Bentley *et al.*, 2002). Die Funktion dieser Metabolite konnte jedoch noch nicht genauer verifiziert werden (Bentley *et al.*, 2002). Bis heute konnte mit Actinorhodin (Rudd und Hopwood, 1979), Undecylprodigiosin (Feitelson *et al.*, 1985), Methylenomycin (Hopwood, 1994) und einem Calciumabhängigen Antibiotikum (Chater, 1996) die Produktion vier verschiedener Antibiotikaklassen in *S. coelicolor* beschrieben werden. Demnach könnten in der Tat weitere strukturähnliche Aminoglykosid-Antibiotika über die Streptomycin-bindende Pore transportiert werden.

Nach der Zugabe von Streptomycinsulfat zu *S. lividans* konnte die Produktion von Actinorhodin erhöht werden, sobald Konzentrationen erreicht wurden, die eine verringerte Wachstumsrate nach sich zogen (Shima *et al.*, 1996). Um die Actinorhodin Produktion zu steigern, könnte das Streptomycin daher mithilfe der Streptomycin-bindenden Pore aufgenommen werden. Darüber hinaus könnte die Anwesenheit einer Streptomycin-Bindestelle in *S. lividans* die Synthese eines bis dato unbekanntes zu Streptomycin strukturähnlichen Antibiotikums erklären.

Bisher konnte kein vollständiges Zellwandmodell für *Streptomyces* vorgeschlagen werden. *Streptomyces* zählen zu den Mycolsäurefreien Aktinomyceten, weil der Peptidoglykanschicht keine definierte mycolsäurehaltige Struktur aufgelagert ist (Kutzner, 1981). Kim *et al.* (2001) konnten im Fall von *S. griseus* dennoch undefinierte kovalente Lipidverknüpfungen mit der Peptidoglykanschicht nach der Dichtezentrifugation nachweisen. Die Zusammensetzung der enthaltenen Fettsäuren innerhalb der äußeren Zellhülle unterschied sich dabei grundlegend von freien Lipiden. Dahingehend erscheint eine Permeabilitätsbarriere durchaus sinnvoll. Daher ist die Notwendigkeit des Transports von Nährstoffen und anderen Molekülen auch bei *Streptomyces* Arten durch porenformende Proteine denkbar.

### **3.5.2. Sequenzierung und Strukturanalyse der Streptomycin-bindenden Pore**

Alle generierten Sequenzierungsergebnisse zeigen, dass kein klassisches Porin gefunden werden konnte. Es wurden die deutlichsten Banden zur Sequenzierung verwendet (siehe Abb. 3.13.). Das SDS-Gel von *S. lividans* (Abb. 3.13.A.) zeigt zwischen den sequenzierten Banden (50 kDa; 28 kDa) noch weitere dünne Banden. Es besteht somit die Möglichkeit, dass eine dieser Banden mit geringerer Proteinkonzentration das gesuchte Streptomycin-bindende Porin enthält bzw. dass die gesuchte Bande mit den verwendeten Färbemethoden gar nicht sichtbar gemacht werden kann.

Eine andere Erklärung wäre darin zu sehen, dass der Porenkomplex aus einem Hetero-Oligomer bestehen könnte und die Eluate der Banden verschiedener Größen erst kombiniert werden müssten, um die porenformende Aktivität messen zu können. Diese Vorstellung wäre daher denkbar, weil auch eine Gelelektion der monomeren Bestandteile nicht in eine porenformende Aktivität resultierte. Damit könnten nach der Auftrennung mithilfe des SDS-Gels die putativen oligomeren Zustände verloren gegangen sein. Demzufolge kann die Zuordnung einer einzelnen bestimmten Bande der im Black-Lipid-Bilayer detektierten Streptomycin-bindenden Pore nicht erfolgen.

Jedoch konnte die Streptomycin-bindende Pore mithilfe der pH-Verschiebung von 10,5 auf 7,5 einwandfrei von der Fruktose-induzierten Pore getrennt werden.

### **3.5.3. Spannungsabhängigkeit der Streptomycin-bindenden Pore**

Die Ergebnisse der Spannungsabhängigkeit mit dem aufgereinigten Porin aus *S. griseus* (Abb. 3.14.) zeigen, dass die Gesamtleitfähigkeit bei einer positiven Spannungsänderung (ab +40 mV; cis-Zugabe Porin) abnimmt. Darüber hinaus verringerte sich die Gesamtleitfähigkeit noch deutlicher, sobald eine negative Spannungsänderung nach der trans-Zugabe des Porins ab -30 mV erfolgt war. Daraus lässt sich folgern, dass die Streptomycin-bindende Pore spannungsabhängig schließt und zudem gerichtet in die Membran inserieren kann.

So könnte z.B. ein geladener Loop durch das Anlegen einer Spannung eine Konformationsänderung vollziehen, die letztendlich die Streptomycin-bindende Pore blockiert. Ist dieser Loop positiv geladen und ragt in die cis-Seite der Küvette, so würde eine positive Spannung den Loop abstoßen und könnte diesen in die Pore drücken, so dass diese verstopft und für Ionen undurchlässig wird. Eine negative Ladung würde den Loop dann anziehen und es wäre kein Effekt erkennbar, da die Pore voll funktionstüchtig bleibt. Dennoch ist auch bei negativen Spannungen ab -70 mV eine Abnahme der Leitfähigkeit erkennbar. Dies liegt wahrscheinlich an anderen Loops mit negativen Ladungen (Kim *et al.*, 2001), die bei sehr hohen Spannungen reagieren und das Porin blockieren könnten.

#### 3.5.4. Fruktose-induziertes Porin aus *S. griseus* und *S. lividans*

Die innerhalb dieser Arbeit in *S. griseus* zum ersten Mal identifizierte 2,1 nS Pore sollte ein homologes Protein zu der von Dörner (Dörner, 2004 *Dissertation*) beschriebenen Pore aus *S. lividans* darstellen. Diese Fruktose-induzierte Pore aus *S. lividans* ist mit einer Einzelkanal-Leitfähigkeit von 4,3 nS in etwa zweimal größer als die Streptomycin-bindende Pore (1,9 nS). Das Fruktose-induzierte Protein aus *S. griseus* (2,1 nS) ist ebenfalls etwa zweimal größer als die Streptomycin-bindende Pore (0,8 nS). Dieser Kanal zeigt keine Affinität zu Streptomycin. Die Kanalgröße favorisiert eine Diffusionspore und ist daher unspezifisch für Substrate.

Die Expression des Porins insbesondere nach dem Fruktosezusatz unterstützt die beobachteten Wachstumsbedingungen von *S. lividans* (Santamaria *et al.*, 2002). So zeigte *S. lividans* in den Arbeiten von Santamaria *et al.* (2002), morphologische bzw. physiologische Veränderungen nach der Zugabe verschiedener Zucker zu den Wachstumsmedien. So enthielt *S. lividans* nach dem Fruktosezusatz und einem achttägigen Wachstum nur noch vereinzelte, mycelartige Fragmente.

Es ist bekannt, dass *Streptomyceten* im allgemeinen als Bodenbakterien äußerst sensibel auf die Umweltbedingungen reagieren, die ihre spezifischen Entwicklungsmuster nachhaltig beeinflussen können (Santamaria *et al.*, 2002). Demzufolge könnten Zuckermoleküle nicht nur als Nährstoffe wirken, sondern auch als wichtige Genexpressionsregulatoren fungieren. Daher wären für die Funktion der Fruktose-induzierten Pore aus *S. lividans* folgende Erklärungen denkbar. *S. lividans* bildet nach der Induktion mit Fruktose vermehrt Sekundärmetabolite, die wiederum toxische Abbauprodukte zur Folge haben können. Diese Abbauprodukte könnten über die Fruktose-induzierte Pore unmittelbar vor der Absterbephase aus der Zelle transportiert werden und damit die Produktsynthese verlängern.

Im Zusammenhang mit weiteren *Streptomyces* Arten konnte belegt werden, dass Glukose als C-Quelle die Bildung zahlreicher Antibiotika negativ bzw. positiv beeinflussen kann (Demain und Fang, 1995). Erste Versuche mit *S. noursei* ergaben, dass die C-Quellen wie Glukose und Fruktose einen Einfluss auf die Morphologie bzw. auf den Sekundärmetaboliten Nystatin haben können. So konnte die maximale Nystatinausbeute erst nach der Zugabe von Fruktose erreicht werden (Jonsbu *et al.*, 2002). Darüber hinaus konnte in *S. antibioticus* die Produktion des Antibiotikums Oleandomycin nach der Fruktosezugabe auf ein Maximum gesteigert werden (Vilches *et al.*, 1990). Demzufolge könnte das Fruktose-induzierte Porin aus *S. lividans* und *S. griseus* womöglich die Produktionsrate der Antibiotika erhöhen. Der dadurch bedingte

effektivere Antibiotikatransport könnte eine erhöhte Nettokonzentration unmittelbar vor der Absterbephase von *S. lividans* und *S. griseus* hervorrufen.

Innerhalb dieser Arbeit konnte die Fruktose-induzierte Pore von der Streptomycin-bindenden Pore aufgrund der unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften im Kanalmund getrennt werden. Die Fruktose-induzierte Pore war bereits im basischen Bereich (pH 10,5) ungeladen, die Streptomycin-bindende Pore hingegen erst im neutralen Bereich (pH 7,5). Zur Auftrennung der Streptomycin-bindenden Pore ist ein linearer pH-Gradient demnach ungeeignet. Daher konnte der Aufreinigung zur Folge das Vorliegen einer identischen Pore ausgeschlossen werden, weil beide Proteine unterschiedliche isoelektrische Punkte besitzen. Aus dem Extinktionsverlauf in Abbildung 3.8. konnte man schließen, das eine Vielzahl von Proteinen im neutralen Bereich ungeladen sind. Die entsprechenden porenformenden Aktivitäten waren lediglich in den gelb markierten Bereichen (Fraktionen) messbar. Darüber hinaus waren keine Fremdporen mithilfe der Black-Lipid-Bilayer Methode detektierbar, so dass etwaige porenformende Verunreinigungen nach der Aufreinigung ausgeschlossen werden konnten.

### **3.5.5. Ausblick**

Der Umstand, dass die meisten porenformenden Proteine an der Seite, an der sie mit den Fettsäuren der Membran in Kontakt stehen, hydrophobe Eigenschaften aufweisen, macht die Reverse-Phase-FPLC zu einem der geeignetsten Mittel der Aufreinigung. Bei dieser Chromatographie-Methode werden Proteine und niedermolekulare Komponenten wie kleinere Peptide, Aminosäuren oder auch Nucleinsäuren anhand ihrer hydrophoben Eigenschaften getrennt. Die Reverse-Phase-FPLC ermöglicht eine schnelle Auftrennung und eine gute Auflösung der Einzelkomponenten. Als stationäre Phase wird ein relativ unpolares Medium verwendet, wie zum Beispiel ein Silica-Gel, an das Kohlenhydratketten (zum Beispiel C8 oder C18) gekoppelt sind. Die mobile hydrophile Phase besteht aus einem organischen Lösungsmittel in wässriger Lösung (beispielsweise Methanol und/oder Acetonitril). Je lipophiler eine Substanz in der zu trennenden Probe ist, desto eher wird sie an die lipophile, stationäre Phase binden und auf der Säule zurückgehalten werden. Umgekehrt gilt: je hydrophiler eine Komponente ist, desto schneller wird sie sich in der hydrophilen, mobilen Phase bewegen. Wie hydrophil die mobile Phase ist, hängt vom Anteil des organischen Lösungsmittels ab. Je mehr organisches Lösungsmittel in der wässrigen Phase enthalten ist, desto besser werden sich auch hydrophobe Komponenten in der mobilen Phase bewegen. Mit dieser Methode könnten die cytosolische

Proteine, wie zum Beispiel Enzyme, wie sie in den Sequenzierungsgelen dieser Arbeit auftraten, von lipophilen Proteinen getrennt werden.

### 3.6. Referenzen

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman, (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill & D. A. Hopwood, (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- Benz, R., K. Janko, W. Boos & P. Lauger, (1978) Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **511**: 305-319.
- Blanchette R. A., J. B. Sutherland. & D. L Crawford, (1981a) Actinomycetes in discolored wood of living silver maple. *Can. J. Botany* **59**: 1-7.
- Blanchette R.A., J. B. Sutherland & D. L. Crawford, (1981b) The role of actinomycetes in the discoloration and decay process of living silver maple trees. *Phytopathology* **71**: 204.
- Blum, H., H. Beier H. & J. Gross, (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Chater, K. F. & M. J. Bibb, (1996) Regulation of bacterial antibiotic production. *Bio/Technology* **7**: 57-105.
- Demain, A. L. & A. Fang, (1995) Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. *Actinomycetology* **9**: 98-117.
- Dorner, U., (2004) Lipids and Porins in the Cell Wall of Actinomycetes. *Dissertation*.
- Eisenhaber, F., F. Imperiale, P. Argos & C. Froemmel, (1996) Prediction of Secondary Structural Content of Proteins from their Amino Acid Composition Alone (I&II). *Proteins: Struct.,Funct.,Design* **25**: 157-79
- Feitelson, J. S., F. Malpartida & D. A. Hopwood (1985) Genetic and biochemical characterization of the red gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol.* **131**: 2431-2441
- Hopwood, D. A., K. F. Chater & M. J. Bibb, (1995) Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model streptomycete. *Biotechnology* **28**: 65-102.
- Jonsbu, E., M. McIntyre, & J. Nielsen, (2001) The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *Journal of Biotech.* **95**: 133-144.
- Kennedy, B. W. & S. M. Alcorn, (1980) Estimates of US crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease* **64**: 674-676.

- Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater & D. A. Hopwood, (2000) Practical Streptomyces genetics. *The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom*. Buch.
- Kim, B. H., C. Andersen & R. Benz, (2001) Identification of a cell wall channel of Streptomyces griseus: the channel contains a binding site for streptomycin. *Mol Microbiol* **41**: 665-673.
- Klug, M., (2005) Untersuchung der wachstumsabhängigen Porinexpression in Streptomyces. *Diplomarbeit*.
- Krügel, H., P. Krubasik, K. Weber, H. P. Saluz & G. Sandmann, (1999) Functional analysis of genes from Streptomyces griseus involved in the synthesis of isorenieratene, a carotenoid with aromatic end groups, revealed a novel type of carotenoid desaturase. *Biochim Biophys Acta* **1439**: 57-64.
- Kutzner, H. H., M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows & H. Schlegel (1981) The family Streptomycetaceae. *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Berlin; Springer-Verlag, 2028-2090.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Loria, R., R.A. Bukhalid, B.A. Fry & R. R. King, (1997) Plant pathogenicity in the genus Streptomyces. *Plant disease* **81**: 836-846.
- Mariat, F., (1958) Physiology of pathogenic aerobic Actinomycetes; research on the proteolytic activity and on the nitrogen and carbon metabolism of Nocardia asteroides, N. brasiliensis, Streptomyces madurae, S. pelletieri and S. somaliensis. *Mycopathol Mycol Appl* **9**: 111-49.
- Nkanga, E. J. & C. Hagedorn, (1978) Detection of antibiotic-producing Streptomyces inhabiting forest soils. *Antimicrob Agents Chemother* **14**: 51-59.
- Rudd, B. A. & D. A. Hopwood, (1979) Genetics of actinorhodin biosynthesis by Streptomyces coelicolor A3(2). *J Gen Microbiol* **114**: 35-43.
- Santamaria, R. I., F. Leal, M. Diaz & J. M. Fernandez-Abalos (2002) Morphological and physiological changes in Streptomyces lividans induced by different yeasts. *Arch Microbiol*. **177**(3): 259-66.
- Santamaria, R. I., (2005) Universidad de Salamanca, Facultad de Biología. Zellwandextrakte Streptomyces lividans.
- Shima, J., A. Hesketh, S. Okamoto, S. Kawamoto & K. Ochi, (1996) Induction of actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in Streptomyces lividans and Streptomyces coelicolor A3(2). *J Bacteriol* **178**: 7276-7284.
- Trias, J. & R. Benz, (1993) Characterization of the channel formed by the mycobacterial porin in lipid bilayer membranes. Demonstration of voltage gating and of negative point charges at the channel mouth. *J Biol Chem* **268**: 6234-6240.

Vilches, C., C. Mendez, C. Hardisson & J. A. Salas, (1990) Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: influence of nutritional conditions and development of resistance. *J Gen Microbiol* **136**: 1447-1454.

Wessel, D. & U. I. Flügge, (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141-143.

Zhang, J. & T. L. Madden, (1997) Power BLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res* **7**: 649-656.

## **Aufreinigung und Stromfluktuationsanalyse des zucker-spezifischen Porins OmpS aus *Vibrio cholerae***

### **4.1. Zusammenfassung**

*Vibrio cholerae* ist ein Gram-negatives, fakultativ aerobes Stäbchenbakterium mit aquatischer Lebensweise in Süßwasserhabitaten. *Vibrio cholerae* ist der Erreger der Cholera (Turnbull *et al.*, 1985). Um die hohen Cholera-Mortalitätsraten zu kontrollieren sind zahlreiche Forschungsansätze im Gange. Die genauere Kenntnis der Zellhülle von *Vibrio cholerae* könnte der Schlüssel zu einer wirksamen Bekämpfung sein. Die Funktionsweise der Außenmembranporine verdient deshalb besondere Aufmerksamkeit, da sie maßgeblich für den Nährstofftransport und Antibiotikaresistenzen verantwortlich sind (Sarkar *et al.*, 1993).

Das OmpS Porin (**O**uter **m**embrane **p**rotein **S**ugar) steht im Zusammenhang mit dem Maltosetransport und wurde bereits als wachstumsphasenabhängiges Porin in der äußeren Membran von *Vibrio cholerae* beschrieben (Lang und Palva, 1993). OmpS zeigt in der Genom- bzw. in der Proteinsequenz eine starke Homologie zum Maltoporin LamB aus *Escherichia coli* (30% Identität), sowie zum Sucroseporin ScrY, aus enterischen Gram-negativen Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* (bis zu 20% Identität). Es wurden bereits sowohl für LamB (Benz *et al.*, 1986; 1987; Andersen *et al.*, 1995), als auch für ScrY (Andersen *et al.*, 1998) die Bindekonstanten für verschiedene Zucker untersucht.

In dieser Arbeit konnte die Aufreinigung von rekombinantem OmpS optimiert werden, so dass mithilfe eines Amylose-Resin-Batches aus cytoplasmatischen Extrakten detektierbare Proteinkonzentrationen des OmpS-Porins im SDS-Gel erhalten werden konnten. Das aufgereinigte Protein wurde anschließend mithilfe der Black-Lipid-Bilayer Methode hinsichtlich seiner biophysikalischen Eigenschaften charakterisiert. Die Messungen der Stromfluktuationsanalyse zeigten eine hochspezifische Bindung von OmpS zu den ausgewählten Maltosederivaten mit Bindekonstanten von  $250 \text{ M}^{-1}$  –  $1300 \text{ M}^{-1}$ , abhängig von der Länge des jeweiligen Zuckers. Dennoch liegt diese Affinität um das 17 – 24-fache unter der bekannten Bindungsaffinität vom LamB WT (Benz *et al.*, 1987; Andersen *et al.*, 1995).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich die OmpS-Monomere spontan zu Trimeren zusammenfinden können; eine Eigenschaft, die LamB-Monomere nicht besitzen.

## 4.2. Einleitung

*Vibrio cholerae* ist ein Gram-negatives, fakultativ aerobes Stäbchenbakterium mit aquatischer Lebensweise in Süßwasserhabitaten. Ebenso ist es in der Lage, sich im Darm von Tieren und Menschen zu vermehren (Makri *et al.*, 2007). *Vibrio cholerae* zählt zu den Proteobakterien und wird daher in die  $\delta$ -Gruppe eingeordnet. Die  $\delta$ -Gruppe wiederum gliedert sich in die Ordnung *Vibrionales*, zu der die Familie *Vibrionaceae* gezählt wird und innerhalb dieser sich die Gattung *Vibrio* wiederfindet, die ihrerseits eine Vielfalt von Arten umfasst. Es existieren alleine über 20 bekannte *Vibrio cholerae* Stämme. *Vibrio cholerae* ist der Erreger der Cholera (Turnbull *et al.*, 1985). Diese potentiell tödliche Krankheit tritt dort als Epidemie auf, wo schlechte hygienische Umstände vorliegen und ist daher oft nach Katastrophen für viele Tote verantwortlich (Glass *et al.*, 1991). Die Symptome der Krankheit zeichnen sich durch starken Durchfall aus, der über einen kurzen Zeitraum zur Schwächung und zum Tod des Betroffenen führen kann, da es zu einem starken Elektrolytverlust und infolgedessen zu einer Dehydrierung kommt (Abuaita und Withey, 2009).

Das zuckerspezifische OmpS-Porin (**O**uter **m**embrane **p**rotein **S**ugar) könnte einen Selektionsvorteil in einer solchen Umgebung darstellen. Die genauere Kenntnis der äußeren Hülle von *Vibrio cholerae* müsste der Schlüssel zu einer wirksamen Bekämpfung sein (Chatterjee und Chaudhuri, 2003). Deshalb verdienen die Außenmembranporine besondere Aufmerksamkeit, da sie den Nährstofftransport über die impermeable, äußere Membran sicherstellen können. Darüber hinaus könnte die impermeable, äußere Membran zahlreiche Antibiotikaresistenzen zur Folge haben (Sarkar *et al.*, 1993). Das OmpS-Porin besitzt ein Molekulargewicht von ca. 43 kDa und steht im Zusammenhang mit dem Maltosetransport. Es wurde bereits als wachstumsphasenabhängiges Porin in der äußeren Membran von *Vibrio cholerae* beschrieben (Lang und Palva, 1993). Dieses wird in einem offenen Leseraster durch das Gen *ompS* encodiert und ist 412 Aminosäuren lang. OmpS zeigt eine starke Homologie zum Maltoporin LamB aus *Escherichia coli* (30% Identität), sowie zum Sucroseporin ScrY aus enterischen Gram-negativen Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* (bis zu 20% Identität).

Die Röntgenstrukturanalyse von LamB (ca. 48 kDa) ergab, dass die Monomere folgende Struktur aufweisen (Schirmer *et al.*, 1995): LamB-Monomere besitzen eine zylinderartige Form, die von 18  $\beta$ -Faltblättern (*engl.*  $\beta$ -barrels) gebildet wird (siehe Abb. 4.13). Die dritte Peptidschleife (*engl.* Loop) L3 ist in den Kanal gefaltet. Der Kanal wird zusätzlich dadurch verengt, dass die Loops L1, L4 und L6 sowie der Loop L2 eines benachbarten Monomers ebenfalls in das

Kanallumen ragen. Dabei bildet jedes Monomer für sich eine wassergefüllte Pore mit einer Bindestelle für Maltosederivate. Für die porenformende Aktivität von LamB werden drei dieser Monomere benötigt, die das native bzw. funktionale Trimer generieren (Schirmer *et al.*, 1995). Die restlichen Loops auf der extrazellulären Seite bilden eine schirmartige Struktur über dem jeweiligen Monomer, die einen Großteil der Kanalöffnung bedeckt. Bei der Zuckerbindung spielt vor allem die „greasy-slide“ eine wichtige Rolle. Die „greasy-slide“ besteht aus sechs aromatischen Resten, die das Kanallinnere in Form einer linksgängigen Helix von der extrazellulären bis zur periplasmatischen Kanalöffnung auskleiden. Die „greasy-slide“ geht hydrophobe Wechselwirkungen mit den Zuckermolekülen ein und dient als Führungsschiene. Zuckermoleküle werden am extrazellulären Ende der „greasy-slide“ zur Kanallengstelle ausgerichtet und gleiten dann entlang der aromatischen Reste durch die Engstelle bis zur periplasmatischen Seite (Dutzler *et al.*, 1996). Ionisierbare Aminosäurereste in der Kanallengstelle stellen den zweiten wichtigen Bereich der Bindestelle dar. Diese polaren Reste sind um die Engstelle herum verteilt. Sie bilden ein ausgeprägtes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen mit den Zuckermolekülen aus. Die Aminosäurereste sind dabei z.T. strukturell durch Salzbrücken mit benachbarten Säureresten stabilisiert.

Die Lage der aromatischen Aminosäuren sowie die zentrale Aminosäure (Y118) an der Engstelle von LamB sind innerhalb von ScrY stark konserviert und auch bei OmpS zu finden, was ein Hinweis auf die Zuckerbindestelle sowie das Vorhandensein einer „greasy-slide“ ist (Dutzler *et al.*, 1996; Forst *et al.*, 1997). Darüber hinaus sind nach eigenen Untersuchungen die  $\beta$ -Faltblätter von OmpS ebenso durch Loops miteinander verbunden. Nach dem Vergleich der Primär- bzw. Sekundärstrukturen von LamB und OmpS kann daher davon ausgegangen werden, dass bei OmpS ebenfalls drei Monomere für die porenformende Aktivität benötigt werden. LamB gehört zum Maltoseaufnahmesystem der Zelle und seine Expression wird durch Maltose im Medium induziert. Für LamB wurden bereits die Bindekonstanten für verschiedene Zucker untersucht (Benz *et al.*, 1986; 1987; Andersen *et al.*, 1995). Die Messungen der Stromfluktuationsanalyse zeigten eine spezifische Bindung von LamB zu den ausgewählten Maltosederivaten, die mit wachsender Länge des Zuckers affiner wurde (Andersen *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit konnte die Aufreinigung von rekombinantem OmpS optimiert werden, so dass mithilfe eines Amylose-Resin-Batchs aus cytoplasmatischen Extrakten detektierbare Proteinkonzentrationen des OmpS-Porins im SDS-Gel erhalten werden konnten. Das aufgereinigte Protein wurde anschließend mithilfe der Black-Lipid-Bilayer Methode hinsichtlich seiner Zuckerspezifität charakterisiert und die generierten Daten denen von LamB gegenübergestellt.

### 4.3. Material und Methoden

#### 4.3.1. Verwendete Stämme und Wachstumsbedingungen

Für die Aufreinigung von OmpS wurde ein am Lehrstuhl vorhandener porinfreier *E. coli* Stamm (KS262) verwendet. Das Gen für OmpS wurde von Dr. Robert Anderson (Department of Molecular Genetics, University of Uppsala) in den Expressionsvektor pRA802 kloniert und dem Lehrstuhl für Biotechnologie im Jahr 1996 zur Verfügung gestellt. *E. coli* KS262\_ompS wurde in LB-Medium bei 37°C mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert (Tab. 4.1.). *E. coli* KS262\_ompS enthält das ompS-Gen auf einem pRA802 Expressionsplasmid, welches von malT kontrolliert wird. Als Selektionskonzentrationen wurden 100 µg/ml Ampicillin bzw. 40 µg/ml Kanamycin gewählt. Der bekannte Lac-Repressor (Vektor rREP4) dient als Inhibitor der Expression. Diese kann durch die Zugabe von Lactose oder den Ersatzstoff IPTG induziert werden. Um etwaige Mutationen innerhalb des ompS-Gens des rekombinanten Vektors auszuschließen, wurden Sequenzierungen durchgeführt. Dazu wurden zwei Primer „designed“, die von vorne und hinten auf die genomische Sequenz von OmpS [pubmed.com maltoporin (vibrio cholerae RC 385)] gelegt wurden. Die erhaltenen Sequenzen dienten zum erneuten Primerdesign. Diese Vorgehensweise wurde fortgeführt, bis die komplette Sequenz des Gens, sowie der umgebenden Regionen zusammengesetzt werden konnte. Die Sequenz zeigt kleine Abweichungen im Vergleich zur Literatur. Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mithilfe von ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>) übersetzt. Die resultierenden Aminosäuresequenzen des wildtypischen ompS-Gens wurden mit denen des vektorialen ompS-Gens überprüft. Anhand des Alignments (Daten nicht angegeben) lässt sich erkennen, dass die Proteinsequenzen zu 100% identisch sind. Zusätzlich erkennt man, dass -bedingt durch das Einführen der Schnittstelle- die ersten vier Aminosäuren am N-terminalen Ende fehlen.

Der Vergleichsstamm *E. coli* Mn 25/44 (=Mn26) (Niederweis, 1996) ist ein Derivat von CE 1224, enthält das wildtypische LamB und wurde unter gleichen Bedingungen wie der OmpS-Expressionsstamm kultiviert.

**Tab. 4.1.** Verwendete Stämme und Plasmide bzw. deren relevante Eigenschaften und Referenzen.

	Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
1.	<i>E. coli</i> KS262_ompS	OmpS-Expressionsstamm, Amp-Resistenz, Km-Resistenz	(Anderson, 1996)
2.	<i>E. coli</i> Mn 25/44 (=Mn26)	LamB WT-Expressionsstamm, OmpC bzw. OmpF defizient Derivat von CE1224, keine Resistenz	(Niederweis, 1996)

	Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
1.	pRA802	Amp-Resistenz Gen <i>ompS</i>	(Anderson, 1996)
2.	rREP4	Lac-Repressor	(Anderson, 1996)

#### 4.3.2. Expression und Aufreinigung von OmpS in *E. coli*

Für die Proteinexpression wurden die beiden porinfreien *E. coli* KS262\_ompS bzw. *E. coli* Mn 25/44 (=Mn26) Stämme in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 1 M IPTG versetzt, um die Expression von OmpS bzw. LamB zu induzieren. Nach weiteren 16 Stunden Inkubation (130 rpm) bei 16°C wurden die Zellen bei 5000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und in 10 ml 10 mM Tris pH 8 resuspendiert. Zusätzlich wurde ein 100 µl Protease Inhibitor Cocktail (Calbiochem) nach dreimaligem Waschen der Zellen zugegeben, bevor die Bakterien mithilfe der French-Press Methode bei einem Druck von 900 – 1500 psi aufgeschlossen wurden. Die Zellbestandteile wurden bei 5000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde darüber hinaus bei 48000 x g für 1 h bei 4°C zentrifugiert, um das Membranpellet zu gewinnen. Frei gelöste Proteine sind im Überstand verblieben (Cytosolfraktion). Aus dem erhaltenen Membranpellet wurden die Membranproteine mit Hilfe verschiedener Detergenzien herausgelöst (Membranfraktion). Für die Membranproteinextraktion wurde das generierte Membranpellet zunächst in 10 mM Tris/1% Genapol/pH 8 und Protease Inhibitor Cocktail Set II (Calbiochem) gelöst. Die Suspension wurde 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und für weitere 30 min bei 48000 x g und 4°C zentrifugiert. Darüber hinaus konnten die OmpS Monomere ebenfalls aus dem Überstand (Cytosolfraktion) aufgereinigt werden. Im Rahmen der Aufreinigung wurde jeweils 2,5 ml des Cytosolüberstands bzw. 2,5 ml des Membranüberstands in 2,5 ml Säulenpuffer (10 mM Tris/1% Genapol/0,2 M NaCl/pH 7,4) gelöst, mit 1 ml gewaschenen Amylose-Resin-Beads versetzt und auf dem Drehrad über Nacht bei 11 rpm und 4°C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen der Amylose-Beads in Säulenpuffer (siehe oben) konnten die OmpS-Monomere bzw. LamB-Monomere mit 10 mM Tris/1% Genapol/0,2 M NaCl/50 mM Maltose/pH 7,4 (Elution 1) bzw. 10 mM Tris/1% Genapol/0,2 M NaCl/500 mM Maltose/pH 7,4 (Elution 2) selektiv von den Amylose-Beads eluiert werden.

### 4.3.3. SDS-PAGE

Die sogenannte SDS-PAGE (**S**odium**d**odecyl**s**ulfate-**P**olyacrylamide **G**el **E**lektrophorese) wurde nach dem Laemmli Gelsystem (Laemmli, 1970) durchgeführt. Das Gelsystem nach Laemmli stellt ein etabliertes Standardverfahren zur Trennung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 200 kDa dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 10% und 12%-ige SDS-Gele verwendet. Die OmpS-Monomere wurden unter denaturierenden Bedingungen mithilfe eines Bio-Rad Elektrophorese-Systems (Proben in 4x SDS Puffer gekocht für 10 min bzw. ungekocht) bei 110 V und Raumtemperatur aufgetrennt. Für die Detektierung der Proteine wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen (Blum *et al.*, 1987).

Für die Gelelution wurde unmittelbar nach der SDS-PAGE ein Teil des Gels, inklusive des Markers, abgeschnitten und mit Silbernitrat eingefärbt. Der Rest des Gels verblieb zwischen den Glasplatten im Kühlschrank. Nach der Färbung wurden die beiden Gelteile wieder aneinander gelegt und auf der Laufhöhe der interessanten Banden ein Gelstück herausgeschnitten. Dieses Gelstück konnte in 1%-igem Genapol gelöst und zerkleinert werden. Der Ansatz wurde auf einem Schüttler über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proteine lösen sich über Nacht im Kühlschrank aus dem Gel. Der nach der Zentrifugation generierte Überstand wurde mithilfe der Black-Lipid-Bilayer Methode auf die entsprechende porenformende Aktivität untersucht.

### 4.3.4. Black-Lipid-Bilayer Methode

Das Verfahren der Black-Lipid-Bilayer Experimente wurde bereits beschrieben (Benz *et al.*, 1978). Die Messapparatur ist auf einer schwingungsgedämpften Unterlage aufgebaut, um erschütterungsbedingte Signalschwankungen und ein Zerreißen der Membran zu reduzieren. Die Messküvette und die Elektroden befinden sich in einem Metallgehäuse, welches als Faraday'scher Käfig wirkt. Durch ein Loch im Metallgehäuse kann die Membran mit einem Ablesefernrohr beobachtet werden. Eine externe Lichtquelle ermöglicht eine Beleuchtung der Membran. Die um 10° schräggestellte Trennwand zwischen den Kompartimenten bewirkt, dass Lichtreflexionen am Glasfenster der Küvette die Beobachtung nicht stören. Unter dem Metallgehäuse befindet sich ein Magnetrührer, der eine Mischung der Elektrolytlösung durch kleine Magnetrührfische erlaubt.

Das Kernstück der Apparatur ist die Teflonküvette, die durch eine Trennwand in zwei Kompartimente geteilt ist. In der Trennwand befindet sich eine kreisförmige Öffnung, die auf der Vorderseite kegelförmig gesenkt ist (Bohrungsstärke: 0,07 mm; Bohrungsfläche: 0,5 mm<sup>2</sup>).

Der Lipidfilm wird über die Öffnung gespreitet. Die in dieser Arbeit verwendeten künstlichen Lipidbilayermembranen wurden mithilfe des 1%-igen (w/v) in *n*-Dekan gelösten Diphytanoylphosphatidylcholin (PC) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) generiert. Die Öffnung schillert zunächst in den Newton'schen Farben, bis durch Abfließen der Lösung aus dem vielschichtigen Lipidfilm eine bimolekulare Schicht entstanden ist. Der erhaltene Bilayer hat die Dicke einer natürlichen Membran (ca. 6 nm) und erscheint schwarz. Die OmpS-Ansätze konnten daraufhin in die Elektrolytlösungen zugegeben werden. Das sog. „Schwarzwerden“ der Membran beruht darauf, dass das von der Membran auf der Vorder- und Rückseite reflektierte Licht einen Gangunterschied von  $\lambda/2$  besitzt und sich die Wellen der gleich großen Amplituden gegenseitig auslöschen. Die flächenspezifische Leitfähigkeit einer reinen Lipidmembran beträgt in 1 M NaCl-Lösung etwa 10 nS/cm<sup>2</sup>. In die elektrolytgefüllten Kompartimente tauchen Ag/AgCl-Elektroden ein. Eine Elektrode ist an die Spannungsquelle angeschlossen, die andere leitet den durch die Membran fließenden Strom ab. Sie ist je nach Art der Messung mit einem Elektrometer (Selektivitätsmessung) oder einem Verstärker (Einzelkanalmessung) verbunden. Der Verstärker (Keithley 427) wandelt ein Stromsignal in ein Spannungssignal mit einer Verstärkung von 10<sup>7</sup> V/A bis zu 10<sup>11</sup> V/A um und überträgt das Signal auf einen Streifenschreiber und ein Oszilloskop. Die Temperatur während den Messungen betrug durchweg 20°C.

Der Stofftransport durch eine Pore kann nicht direkt gemessen werden. Dafür bedient man sich der Titrationsmethode. Bindet ein Molekül in der OmpS-Pore, ist der Kanal für den Durchtritt nachfolgender Ionen blockiert. Der durch Ionen verursachte Stromfluss durch eine mit OmpS-Poren dotierte Membran nahm auf diese Weise mit steigender Stoffkonzentration ab. Eine Titrationsmessung ermöglichte somit die Bestimmung der Bindekonstante *K*. Dabei wird die Michaelis-Menten-ähnliche Kinetik verwendet. Sie setzt die zunehmende Stoffsättigung *G*(*c*) mit der steigenden Stoffkonzentration (1+*K* · *c*) in Beziehung.

Es gilt:

$$(1) \quad G(c) = \frac{G_{\max}}{1 + K \cdot c}$$

$G_{\max}$  = maximale Leitfähigkeit (vor der Stoffzugabe *S*)

$G_{(c)}$  = Leitfähigkeit (nach Stoffzugabe *S*)

*K* = Stabilitätskonstante (M<sup>-1</sup>)

*c* = Stoffkonzentration (mol/l)

Zu Versuchsbeginn wurden 10 µl des aufgereinigten OmpS-Proteins (ca. 15 ng/ml) ein- oder beidseitig (je nach Versuchsanordnung) in die Kammern gegeben. Der Einbau der Poren, der den Anstieg der Gesamtleitfähigkeit zur Folge hatte, zeigte auf dem Streifenschreiber einen sigmoiden Kurvenverlauf. Nach einiger Zeit verlangsamte sich die Insertion und blieb schließlich konstant. Damit lag ein dynamisches Gleichgewicht vor, das heißt: genauso viele Poren inserieren in die Membran, wie sich im selben Zeitraum aus der Membran herauslösen. Sobald dieser Zustand erreicht wurde, konnte die eigentliche Titration beginnen: unter Rühren wurde nacheinander die Konzentration der zu untersuchenden Maltosederivate durch Zugabe (cis/trans) definierter Mengen erhöht. Das Rühren gewährleistete eine maximal gleichmäßige Verteilung des jeweiligen Zuckers im Elektrolyten. Als Folge der Bindung des Stoffes in der Pore sank die Leitfähigkeit stufenartig ab, bis sich schließlich eine jeweils ca. 70%-ige Sättigung der OmpS-Pore einstellen konnte. Aus der Leitfähigkeitsabnahme der Membran wurde in Abhängigkeit von der Stoffkonzentration die Prozentzahl der besetzten Poren bestimmt.

In Analogie zur Michaelis-Menten-Kinetik konnte die Stabilitätskonstante  $K$  der Stoffbindung ermittelt werden. Die Anzahl der besetzten OmpS-Poren wird in Abhängigkeit von der Stoffkonzentration aufgetragen und mit folgender Gleichung angefitet:

$$(2) \quad \frac{G_{\max} - G(c)}{G_{\max}} = \frac{K \cdot c}{K \cdot c + 1}$$

$G_{\max}$  = maximale Leitfähigkeit (vor Stoffzugabe S)

$G(c)$  = Leitfähigkeit (nach Stoffzugabe S)

$K$  = Stabilitätskonstante ( $M^{-1}$ )

$c$  = Stoffkonzentration (mol/l)

wobei  $G_{\max}$  die maximale Leitfähigkeit und  $G_c$  die Leitfähigkeit bei der Zuckerkonzentration  $c$  ist. Die Halbsättigungskonzentration  $k_{1/2}$  -die Konzentration, bei der 50% der Poren mit Zuckermolekülen besetzt sind- ergibt sich aus:

$$(3) \quad k_{1/2} = \frac{1}{K}$$

Die Stromfluktuationsanalyse (Rauschmessung) kann parallel zur Titration durchgeführt werden; die experimentelle Vorgehensweise ist die gleiche. Bevor man eine Rauschmessung startet, wird immer der Rührer abgeschaltet und ca. 1 min gewartet. Vor der ersten Zuckerzugabe wird ein Referenzspektrum aufgezeichnet. Dieses Untergrundrauschen wird später von jedem

aufgenommenen Spektrum abgezogen. Nach jeder Zuckerzugabe wird abgewartet, bis sich die Leitfähigkeit auf einen neuen Gleichgewichtswert eingestellt hat. Der Rührer wird abgeschaltet und nach 1 min das Rauschspektrum aufgezeichnet. Schnelle A/D-Wandlerkarten haben es auch möglich gemacht, dass Signal direkt mit dem PC aufzunehmen und darin zu verarbeiten. Wichtig ist dabei der vorgeschaltete Tiefpassfilter, bei dem man die Grenzfrequenz variabel einstellen kann. Frequenzen oberhalb der Nyquist-Frequenz werden so ausreichend herausgefiltert. Mithilfe des Programms „Bilmess“ wird das Signal aufgezeichnet. In dem Programm kann man die Abtastrate und die Dauer der Messung einstellen. Es wird so lange aufgezeichnet, dass anschließend mindestens 100 Mittlungen durchgeführt werden können. Das aufgezeichnete Signal wird mit dem Programm „FFT“ gemittelt und fouriertransformiert.

Die Auswertung der Rauschspektren erfolgte mit dem Programm „Easyplot“. Das  $1/f$  Rauschen, das bei den Referenzkurven auftritt, wurde mit folgender Gleichung angefitet:

$$(4) \quad S(f) = \frac{A}{f^c}$$

A ist der Wert der Amplitude bei 1 Hz. c sollte Werte um 1 annehmen. Das Differenzspektrum (das Referenzspektrum wird von den Spektren, die in Anwesenheit von Zucker aufgenommen werden, abgezogen) sollte die Form eines Lorentz-Spektrums aufweisen, welches sich mit folgender Gleichung anfiten lässt:

$$(5) \quad S(f) = \frac{A}{1 + (f/f_c)^2} = \frac{A}{1 + (2\pi \times \tau)^2 f^2}$$

$f_c$  wird als die Eckfrequenz bezeichnet (Verveen und De Felice, 1974; Conti und Wanke, 1975; De Felice, 1981). Das ist die Frequenz, bei der der Plateauwert (Amplitude bei niedrigen Frequenzen) um die Hälfte abgenommen hat.

Der Fit liefert also Werte für A und  $\tau$ . Der Wert  $1/\tau$  ist definiert als:

$$(6) \quad \frac{1}{\tau} = 2\pi \times f_c = k_{on} + k_{off} = k_1 \times c + k_{-1}$$

Die Auftragung von  $1/\tau$  gegen die Konzentration kann man mithilfe der linearen Regression anfiten (Verveen und De Felice, 1974; De Felice, 1981). Man erhält eine Gerade mit der Steigung  $k_1$  und dem Ordinatenabschnitt  $k_{-1}$ . Aus dem Quotient beider Werte ergibt sich die Stabilitätskonstante K.

## 4.4. Ergebnisse

### 4.4.1. Induktion und Expression von OmpS in *E. coli*

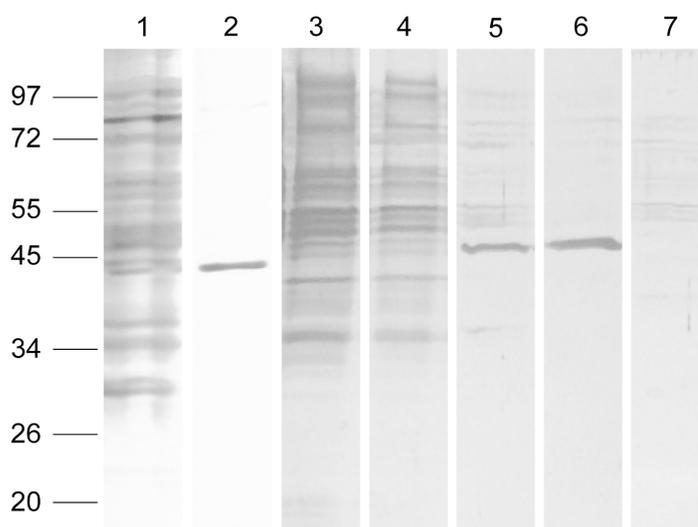
Das Porin OmpS wurde für die im beschriebenen Versuche aus einem transformierten *E. coli* KS262\_ompS Stamm isoliert, in den die Plasmide pRA802 und rREP4 eingebracht wurden. Das Plasmid pRA802 enthält das Gen für OmpS, ein Resistenzgen für Ampicillin und wird von dem Promotor malT kontrolliert; das Plasmid rREP4 produziert den Lac-Repressor und trägt eine Kanamycin-Resistenz. Der zusätzliche Lac-Repressor ist notwendig, da die von *E. coli* KS262\_ompS allein produzierte Repressor-Menge nicht ausreicht, um die Expression von OmpS zu inhibieren. Diese kann durch die Zugabe von Lactose oder den Ersatzstoff IPTG induziert werden.

### 4.4.2. Aufreinigung und SDS-PAGE von OmpS

Innerhalb der Diplomarbeit von Schmid (1996) wurde bereits versucht das OmpS-Porin mithilfe der klassischen Stärke-Affinitäts-Säule aufzureinigen. Dies gelang nur unzureichend und die unsauberen OmpS-Fractionen konnten aufgrund von zu starkem Hintergrundrauschen nicht in KCl-Lösung, sondern nur in LiCl-Elektrolyt analysiert werden. Die Optimierung der Aufreinigung im Rahmen dieser Arbeit erfolgte mithilfe der Affinitäts-Chromatographie über einen Amylose-Resin-Batch (siehe 4.3.2.). Dazu wurden jeweils 2,5 ml des erhaltenen Cytoplasma-Überstands (ca. 15 ng/ml Protein) verwendet. Nach der Durchführung der nötigen Binde-, Wasch- und Elutionsschritte wurden alle Proben mithilfe der SDS-Gele und sich anschließender Silberfärbung auf das Vorhandensein und der Reinheit der 43 kDa OmpS-Bande untersucht. Hierfür wurden die ausgewählten Waschschrte sowie die Elutionen mittels Speedvac bei +60°C eingengt. Zusätzlich sollte als Vergleich das monomere, wildtypische LamB nach dem identischen Aufreinigungsprotokoll generiert werden.

Abbildung 4.1. zeigt die parallele Aufreinigung von OmpS (Spur 1 – 2) und dem wildtypischen LamB (Spur 3 – 7). Im Rahmen der OmpS-Aufreinigung enthielten die Waschschrte 1 – 4 zu viele der zuvor erhaltenen cytoplasmatischen Verunreinigungen. Daher zeigt die erste Spur in Abbildung 4.1. mit dem 5. Waschschrte eine erste sinnvolle Proteinmengenauffrennung von OmpS. In Spur 2 konnte das monomere OmpS nach der ersten Elution mit 50 mM Maltose selektiv von der Säule gelöst werden. Die Spuren 3 und 4 zeigen die repräsentativen Waschschrte 2 und 3 vom LamB WT nach dem Amylose-Resin-Batch.

Die Spuren 5 und 6 bestätigen die Reinheit des monomeren LamB-Porins bei einer molekularen Laufhöhe um die 45 kDa nach der ersten bzw. zweiten Elution (50 mM bzw. 500 mM Maltose). Damit konnte der monomere Zustand des LamB-Proteins ebenfalls nach der Behandlung mit +60°C in den Elutionsfraktionen erhalten werden. Mit der unbehandelten LamB-Probe (*ohne* +60°C, *ohne* Speedvaq) konnte das Monomer in der Elution nicht generiert werden. Daher ist in Spur 7 keine Bande bei 45 kDa erkennbar. Es bleibt festzuhalten, dass sowohl OmpS als auch der LamB WT nach der Behandlung bei +60°C in ihre monomeren Untereinheiten zerlegt werden können. Darüber hinaus konnten beide zuckerspezifischen Porine mithilfe des Amylose-Resin-Batches reproduzierbar aufgereinigt werden.



**Abb.4.1.** Silbergefärbte SDS-PAGE (Laemmli, 1970) nach der Amylose-Resin-Batch Aufreinigung des heterolog in *E. coli* exprimierten OmpS aus *V. cholerae* bzw. vom LamB WT aus *E. coli*. Die molekularen Laufhöhen sind links angegeben.

**Spur 1:** Waschschrift 5 OmpS;

**Spur 2:** Elution 1 OmpS;

**Spur 3:** Waschschrift 2 LamB WT;

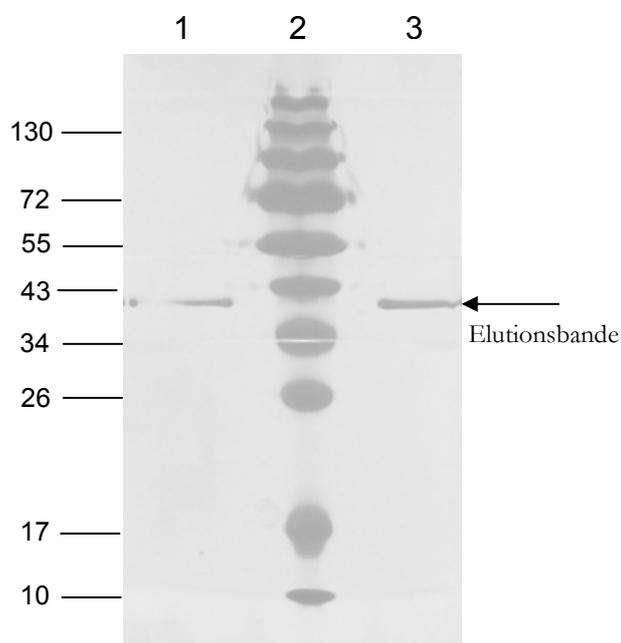
**Spur 4:** Waschschrift 3 LamB WT;

**Spur 5:** Elution 1 LamB WT;

**Spur 6:** Elution 2 LamB WT;

**Spur 7:** Kontrolle LamB WT.

Nach der Auswertung der Gele wurde für die Elution mit 50 mM Maltose (E1) ein Gel zur Gelelution (Abb. 4.2.) vorbereitet.



**Abb.4.2.** SDS-Gelstreifen zur Gelelution. Silbergefärbte SDS-PAGE (Laemmli, 1970) nach der Amylose-Resin-Batch Aufreinigung des heterolog exprimierten OmpS aus *V. cholerae*. Die molekularen Laufhöhen sind links angegeben.

**Spur 1:** Elution 1 OmpS;  
**Spur 2:** Prestained Page Ruler Marker;  
**Spur 3:** Elution 1 OmpS.

Auf dem Gelstreifen ist die 43 kDa Elutionsbande zu erkennen. Die Elution erfolgte anschließend über Nacht bei +4°C in 1% Genapol auf dem Schüttler. Mit diesem optimierten Aufreinigungsprotokoll konnte das OmpS-Monomer erstmals definiert aufgereinigt werden.

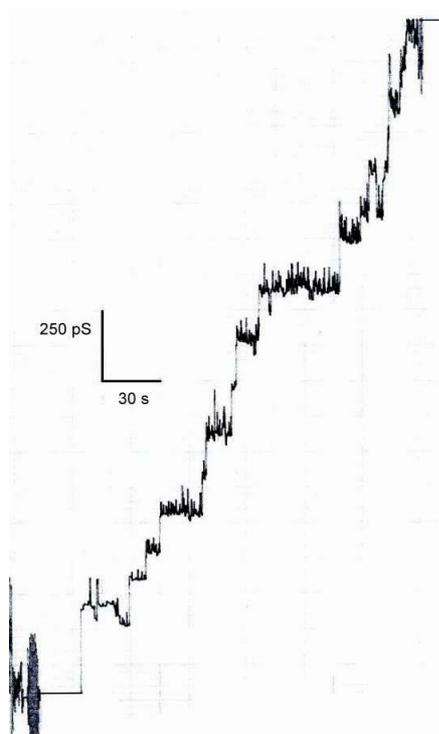
### 4.4.3. Einzelkanal-Leitfähigkeit von OmpS

Die Messungen der Einzelkanal-Leitfähigkeit von allen aufgereinigten bzw. unbehandelten OmpS-Elutionen ergaben ein deutlich erkennbar verrauschtes Signal mit treppenartigen Anstiegen. Erst nach weiterer Aufreinigung mithilfe der Gelelution (1% Genapol über Nacht bei +4°C) konnte eine definierte, porenformende Aktivität bestimmt werden. Weiterhin zeigte die aktive Konformation von OmpS eine Temperaturabhängigkeit. So konnte die Einzelkanal-Leitfähigkeit von OmpS erst nach einer Lagerung der Elutionen bei +4°C bzw. -20°C (über Nacht) gemessen werden. Die Bestimmung der Einzelkanal-Leitfähigkeit des aufgereinigten OmpS wurde in 0,1 M; 0,3 M; 1 M und 3 M KCl sowie in 1 M LiCl und 1 M KAc durchgeführt (siehe Tab. 4.2.).

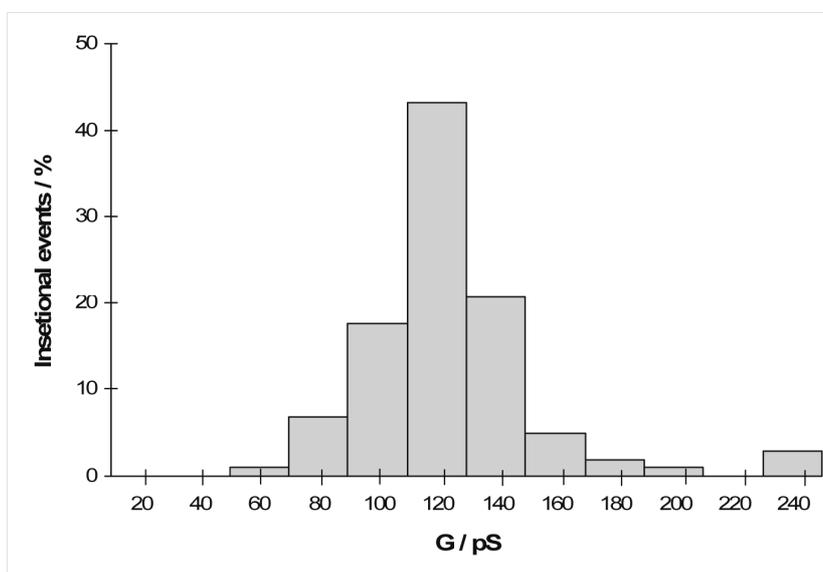
**Tab.4.2.** Einzelkanal-Leitfähigkeit nach der cis/trans-Zugabe des aufgereinigten OmpS zu den jeweiligen Elektrolyten ( $U= 20 \text{ mV}$ ;  $10^9 \text{ V}/\text{A}$ ;  $100 \text{ mV fsc}$ ;  $T= 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan).

Elektrolyt	Konzentration [M]	G [pS]
KCl	0.1	52
	0.3	67
	1	120
	3	423
LiCl	1	65
KCH3COO (pH 7)	1	105

Die Einzelkanal-Leitfähigkeit betrug in 1 M KCl 120 pS und lag damit höher als in 1 M KAc (105 pS) bzw. in 1 M LiCl (65 pS). Abbildung 4.3. zeigt einen repräsentativen Schreiberauszug der Einzelkanal-Leitfähigkeit von OmpS in 1 M KCl. Das zugehörige Histogramm in Abbildung 4.4. dokumentiert die Verteilung der Einzelkanal- Leitfähigkeitsanstiege.



**Abb.4.3.** Schreiberauszug der Einzelkanal-Leitfähigkeit nach der cis/trans-Zugabe des aufgereinigten OmpS in 1 M KCl ( $U= 20 \text{ mV}$ ;  $10^9 \text{ V}/\text{A}$ ;  $100 \text{ mV fsc}$ ;  $T= 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan).

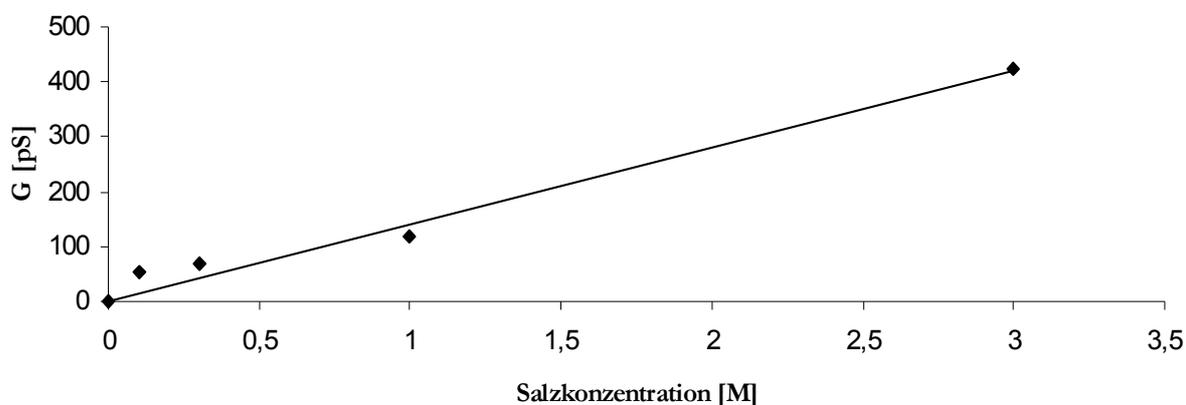


**Abb.4.4.** Histogramm der Einzelkanal-Leitfähigkeit nach der cis/trans-Zugabe des aufgereinigten OmpS in 1 M KCl ( $U= 20 \text{ mV}$ ;  $10^9 \text{ V}/\text{A}$ ;  $100 \text{ mV fsc}$ ;  $T= 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan,  $\sim 100$  Poren). Der häufigste Einzelkanal-Leitfähigkeitswert betrug 120 pS.

Trägt man die Einzelkanal-Leitfähigkeit gegen die Salzkonzentration (KCl) auf, so verdeutlicht sich der lineare Zusammenhang in Abbildung 4.5.

**Tab.4.3.** Einzelkanal-Leitfähigkeit von OmpS bei verschiedenen KCl-Konzentrationen.

Salz KCl	0,1 M	0,3 M	1 M	3 M
G [pS]	52	67	120	423



**Abb.4.5.** Lineare Abhängigkeit zwischen der Einzelkanal-Leitfähigkeit von OmpS und der KCl-Konzentration.

#### 4.4.4. Selektivitätsbestimmung von OmpS

Die Messung der Selektivität wurde ebenfalls in drei verschiedenen Salzen durchgeführt (KCl, LiCl, KAc). Dabei wurde jeweils eine 0,3 M Salzlösung in die Küvette vorgelegt. Die Zugaben erfolgten mit 3 M Salzlösung auf der cis-Seite der Küvette. Die Ergebnisse entsprechen der zu erwarteten geringen Kationenselektivität, die sich bereits nach den Einzelkanalmessungen der verschiedenen Salze gezeigt hatte.

**Tab.4.4.** Selektivität von OmpS in verschiedenen Salzen;  $p_K/p_A$ -Werte.

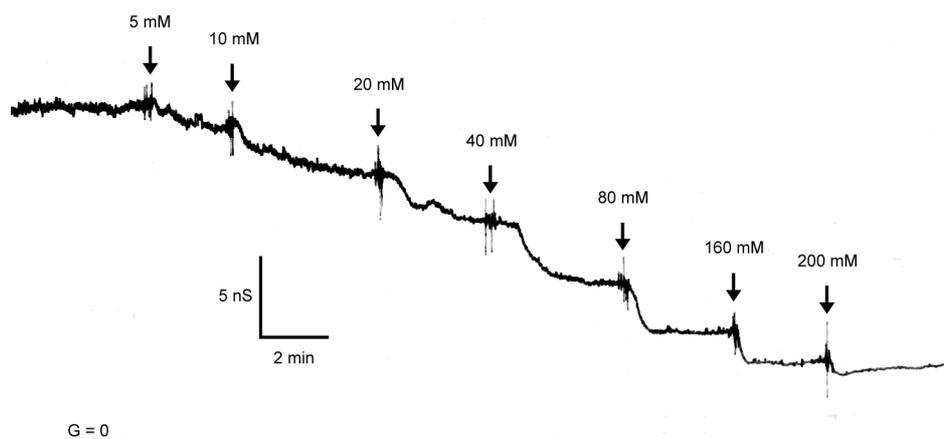
Salz (0,3 M)	KCl	KAc	LiCl
<b>Mittelwert</b>	<b>3,2</b>	<b>3,7</b>	<b>1,5</b>

Man erhielt einen  $p_K/p_A$ -Wert für KCl von 3,2 und für KAc einen  $p_K/p_A$ -Wert von 3,7 sowie für LiCl einen  $p_K/p_A$ -Wert von 1,5.

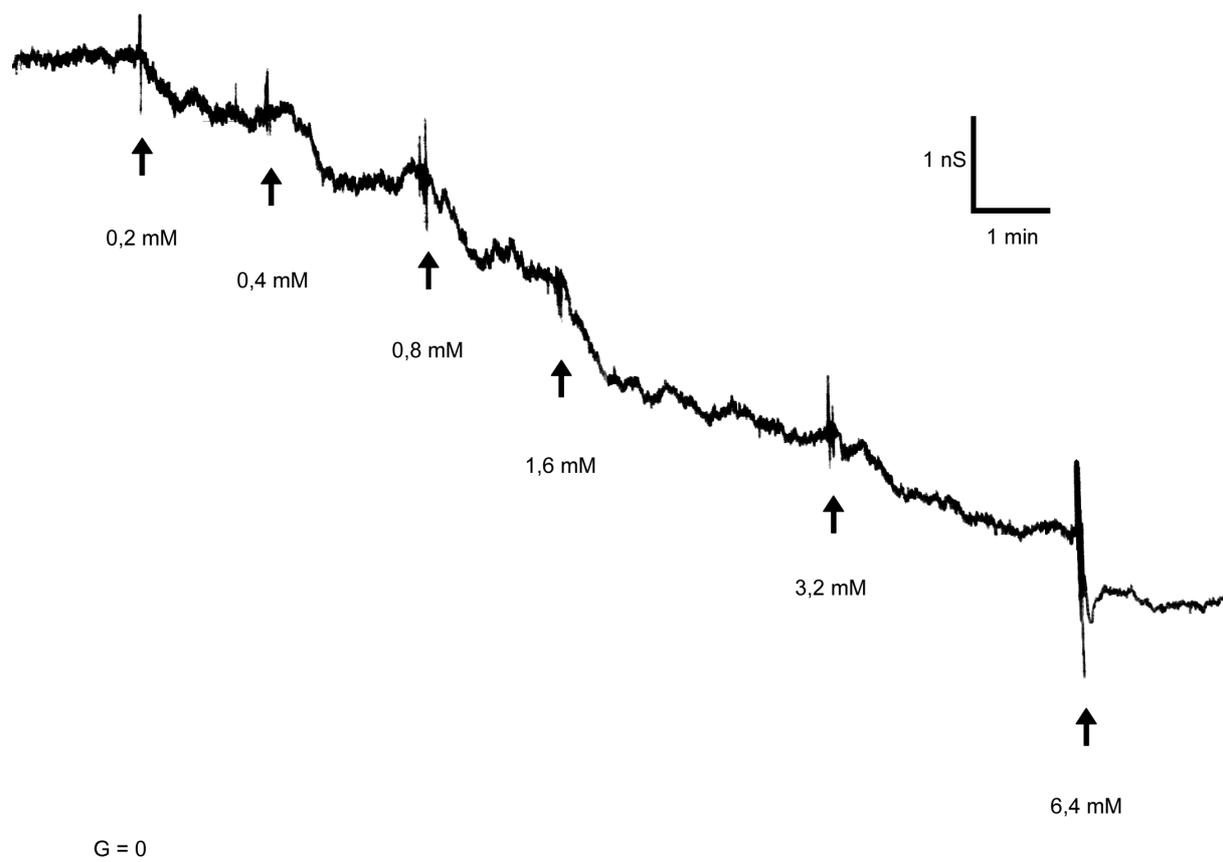
#### 4.4.5. Titration mit Maltosederivaten von OmpS

Die Titrations von OmpS mit den Maltosederivaten wurden absolviert, um die Unterschiede der Bindeaffinitäten zum LamB WT (Benz *et al.*, 1986; 1987) ermitteln zu können. Darüber hinaus sollten die Messungen der Einzelkanal-Titrations bzw. der pH-Abhängigkeit etwaige Aussagen über den Aufbau der OmpS-Pore bzw. einen biophysikalischen und strukturellen Vergleich zum LamB WT ermöglichen. Die Titrations mit den Maltosederivaten wurden in 1 M KCl durchgeführt. Je nach der Bindeaffinität des Maltooligosaccharides wurde die Molarität erhöht oder gesenkt. Mithilfe der Titrationsmessungen von Maltose, Maltotriose, Maltopentaose und Maltoheptaose sollten Bindungsaffinitäten der OmpS-Pore bestimmt werden. Dieselben Maltooligosaccharide wurden für die Stromfluktuationsanalyse ausgewählt.

Abbildung 4.6. veranschaulicht exemplarisch die stufenweise Abnahme der Gesamtleitfähigkeit des aufgereinigten OmpS nach der sukzessiven Zugabe von Maltose. In Abbildung 4.7. hingegen ist die stufenweise Abnahme der Gesamtleitfähigkeit mithilfe von Maltopentaose erreicht worden. Die Zugabe des jeweiligen Zuckers erfolgte beidseitig der Lipidmembran. Nach der Zugabe von Maltose konnte bei einer 200 mM Endkonzentration eine Abnahme der Gesamtleitfähigkeit von etwa 70% beobachtet werden. Die Stabilitätskonstanten K konnten auch mithilfe des Linweaver-Burke-Plots (Abb. 4.8.) ermittelt werden. Die Titration mit Maltose ergab eine Bindekonstante von  $20 \text{ M}^{-1}$  (Halbsättigungskonstante  $k_{1/2} = 50 \text{ mM}$ ).



**Abb.4.6.** Titrationskurve einer mit aufgereinigtem OmpS dotierten Membran. Die Gesamtleitfähigkeit sinkt bei schrittweiser Zugabe von Maltose stetig ab. Die angegebenen Molaritäten geben die absolute Konzentration in den Küvettenkammern wider ( $U = 20 \text{ mV}$ ;  $T = 20^\circ\text{C}$ ; 1% DiphPC in n-Dekan).



**Abb.4.7.** Titrationskurve einer mit aufgereinigtem OmpS dotierten Membran. Die Gesamtleitfähigkeit sinkt bei schrittweiser Zugabe von Maltopentaose stetig ab. Die angegebenen Molaritäten geben die absolute Konzentration in den Küvettenkammern wider (U= 20 mV; T= 20°C; 1% DiphPC in n-Dekan).

Abbildung 4.7. belegt eine Abnahme der Gesamtleitfähigkeit von OmpS um etwa 70% bei einer Endkonzentration von 6,4 mM Maltopentaose. Damit korreliert die Zuckerlänge tatsächlich ganz offensichtlich mit der Bindungsaffinität. Mithilfe des Lineweaver-Burke-Plots konnte eine Erhöhung der Bindekonstante nach der Zugabe von Maltopentaose um den Faktor 24 auf  $480 \text{ M}^{-1}$  (Halbsättigungskonstante  $k_{1/2} = 2,1 \text{ mM}$ ) errechnet werden. Abbildung 4.8. zeigt den Lineweaver-Burke-Plot aller Maltooligosaccharide im Überblick.



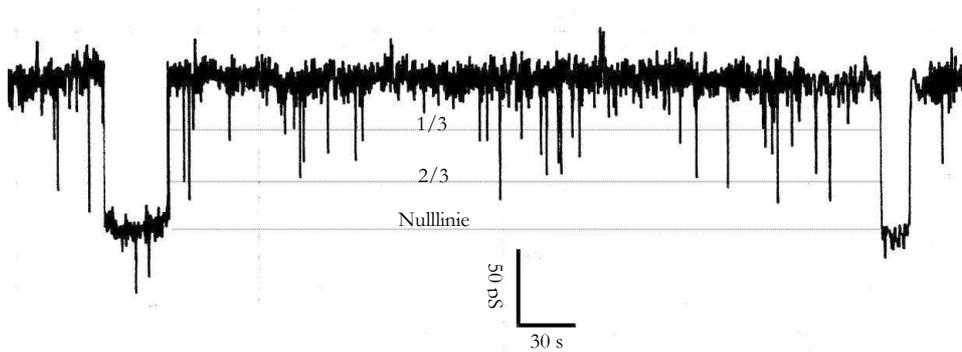
**Abb.4.8.** Lineweaver-Burke-Plot der Blockierung von OmpS-Poren durch verschiedene Maltosederivate. Die durchgezogene Kurve korrespondiert mit der entsprechenden Stabilitätskonstanten K für OmpS mit den jeweiligen Maltooligosacchariden.

Tabelle 4.5. enthält alle ermittelten Titrationsdaten des aufgereinigten, wildtypischen OmpS-Porins. Diese Werte sind zum Vergleich denen vom LamB WT gegenübergestellt worden (Benz *et al.*, 1987; Andersen *et al.*, 1995). Dabei ist eine Korrelation der Affinität zur Zuckerlänge zu erkennen. Die Werte für die Affinitätskonstanten zeigen sowohl bei OmpS als auch beim LamB WT eine Zunahme pro Glucoseeinheit des jeweiligen Maltooligosaccharides. Die Varianz innerhalb der einzelnen OmpS-Messungen pro Maltosederivat ist vernachlässigbar gering. Desweiteren wird deutlich, dass die Bindungsaffinitäten beim LamB WT bis zum 31-fachen höher liegen als bei OmpS. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf Unterschiede in den Loops zurückzuführen, die an der Zuckerbindung beteiligt sind.

**Tab.4.5.** Bindekonstanten K [M<sup>-1</sup>] der verwendeten Maltosederivate für OmpS WT aus *V. cholerae* bzw. LamB WT aus *E. coli* im Vergleich. Legende: n.m.= nicht messbar;  
 \* Wert für den LamB WT von Benz *et al.*, 1987;  
 \*\* Werte für den LamB WT von Andersen *et al.*, 1995.

Mutante	Maltose	Maltotriose	Maltopentaose	Maltoheptaose
	K [M <sup>-1</sup> ]			
OmpS WT	20	330	480	1000
LamB WT	100 *	4300 **	13000 **	31000 **

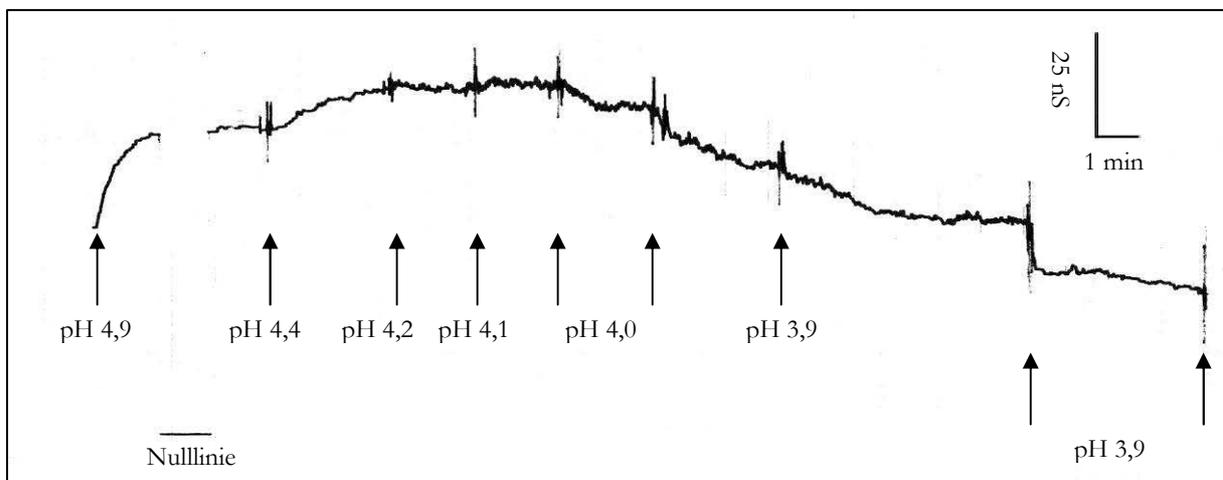
Um den mutmaßlichen trimeren Aufbau der Pore (siehe LamB WT) nachzuweisen, wurde im Folgenden eine Einzelkanal-Titration von OmpS durchgeführt. Dazu wurden verschiedene, stark verdünnte Porinlösungen in der Küvette vorgelegt, bis ein stabiler Einbau einer einzelnen OmpS-Pore über einen längeren Zeitraum mit dem Schreiber aufgezeichnet werden konnte. Die in Abbildung 4.9. dargestellte Pore wurde mit einer Endkonzentration von 4 mM Maltoheptaose titriert.



**Abb.4.9.** Einzelkanal-Titration; Gesamtzugabe von 200  $\mu$ l einer Maltoheptaose-Lösung (0,2 M).

Innerhalb des aufgezeichneten Signals sind deutliche Fluktuationen der Einzelkanal-Leitfähigkeit zu erkennen. Eine Abnahme der Gesamtleitfähigkeit um 1/3, 2/3 und 100% nach der Zugabe der Maltoheptaose-Lösung, sind ein Hinweis auf den trimeren Aufbau der Pore. Die Häufigkeit der Fluktuationen nahm mit einer steigenden Konzentration des Zuckers weiter zu.

Da vom wildtypischen LamB eine pH-Abhängigkeit bei sauren pH-Werten bekannt ist (Andersen *et al.*, 2002), wurde dieser Versuch auch mit aufgereinigtem OmpS durchgeführt. Dazu wurde in der Küvette entweder einseitig oder auf beiden Seiten der pH-Wert mittels Kaliumcitrat verringert.



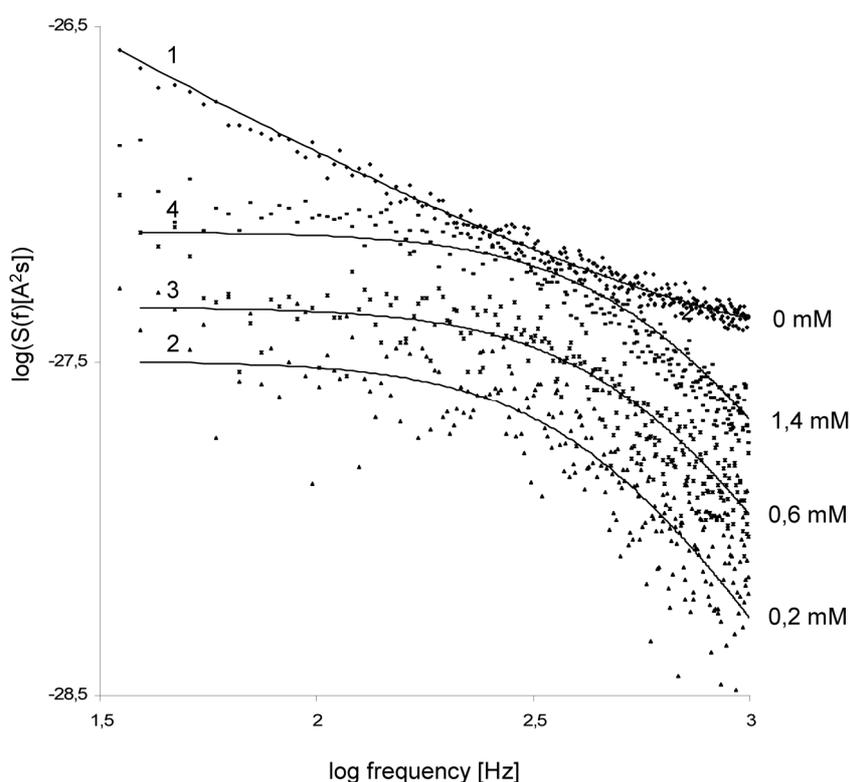
**Abb.4.10.** pH-Titration; Zugaben: 2,5  $\mu$ l; 5  $\mu$ l; 10  $\mu$ l; 20  $\mu$ l; 40  $\mu$ l; 160  $\mu$ l; 300  $\mu$ l; 1000  $\mu$ l Citrat pH 3 beidseitig.

Der Graph der pH-Titration (Abb. 4.10.) zeigt nach der ersten Zugabe zunächst einen starken Anstieg der Gesamtleitfähigkeit. Anschließend bleibt die Leitfähigkeit bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 4,0 stabil. Am Ende kommt es bedingt durch die Verdünnungseffekte nochmals zu einer starken Abnahme. Eine signifikante Abnahme der Leitfähigkeit konnte erst bei saurem pH 3,9 beobachtet werden. Aufgrund des sauren Milieus (pH 3,9) konnten die künstlichen Lipidmembranen nicht dauerhaft stabil generiert werden, weshalb keine pH-Abhängigkeit unterhalb pH 3,9 getestet werden konnte. Im Vergleich zum LamB WT weist OmpS damit nur eine sehr geringe pH-Abhängigkeit auf.

#### 4.4.6. Stromfluktuationsanalyse von OmpS

In Analogie zur Titrationsmessung dient auch die Stromfluktuationsanalyse (Rauschmessung) zum besseren Verständnis der Kinetik einer Pore. Infolgedessen wurde eine Messreihe mithilfe der Maltosederivate Maltotriose, Maltopentaose und Maltoheptaose durchgeführt. Dazu wurde bei jeder Messung zunächst das Grundrauschen der Membran bestimmt und anschließend nach jeder Zuckerzugabe ein Rauschspektrum gemessen. Die erhaltenen Daten wurden nach Fourier transformiert und mittels EasyPlot graphisch dargestellt. Die spektrale Dichte einer mit OmpS gesättigten Membran (Abb. 4.11.) zeigt im Frequenzbereich von 1 Hz – 500 Hz eine lineare Abnahme bei doppelt logarithmischer Auftragung ( $1/f$ -Verhalten). Schließlich kommt es zu einem Abflachen bis hin zu einem möglichen Anstieg bei ca. 1000 Hz (Nekolla *et al.*, 1994; Jordy *et al.*, 1996; Wohnsland und Benz, 1997). In Abbildung 4.11. ist ein deutlicher Anstieg der spektralen Dichte nach jeder Zugabe zu erkennen. Dabei tendiert das  $1/f$ -Verhalten des Graphen immer mehr zu einem  $1/f^2$  Verhalten. Dafür wurde zunächst die Referenzkurve eingelesen, angefüttet und anschließend von allen ermittelten Rauschkurven abgezogen. Die erhaltenen Kurven wurden wiederum gefittet und aus den erhaltenen Graphen die Eckfrequenz sowie die  $\tau$ -Werte bestimmt. Abbildung 4.11. zeigt stellvertretend für alle Maltosederivate das ermittelte Rauschspektrum für Maltopentaose. Der Referenzfit wird durch die Kurve 1 wiedergegeben, die anhand des Grundrauschens der Membran erstellt wurde. Die Werte des Referenzfits wurden zunächst vom Rauschspektrum nach der jeweiligen Zugabe von Maltopentaose subtrahiert, so dass sich eine charakteristische Punktemenge ergab. Daraus folgte eine Zunahme der spektralen Dichte nach der jeweiligen Maltopentaose-Zugabe (0,2 mM, 0,6 mM bzw. 1,4 mM). Die Spur 2 zeigt das Spektrum nach der Zugabe einer Maltopentaose-Konzentration von 0,2 mM (Referenzspektrum der Kurve 1 ist bereits abgezogen). Das Rauschspektrum des OmpS-Porins konnte mit der Lorentzian-Gleichung [siehe 4.3.4. Gleichung (5)] angefüttet werden.

Dieses Resultat stimmt mit den Eigenschaften vom LamB WT überein, weil dessen Bindungsaffinitäten ebenfalls nach der jeweiligen Zuckerzugabe mit der Lorentzian-Gleichung [siehe 4.3.4. Gleichung (5)] beschrieben werden konnten (Verveen und De Felice, 1974; Conti und Wanke, 1975; De Felice, 1981). Nach dem Einstellen einer Maltopentaose-Konzentration von 0,6 mM (Spur 3) sowie nach dem Erreichen einer Endkonzentration von 1,4 mM (Spur 4) konnten weitere Rauschspektren für OmpS generiert werden, die mithilfe der Lorentzian-Gleichung [siehe 4.3.4. Gleichung (5)] angefitet wurde.



**Abb.4.11.** Spektren des Maltopentaose-induzierten Lorentzian-Rauschens der aufgereinigten OmpS Kanäle aus *V. cholerae*. Die durchgezogenen Linien sind die Fitkurven des  $1/f$ - bzw. des Lorentzian-Rauschens. **Kurve 1** mit angefitetem  $1/f$ -Rauschen:  $c= 0$  mM;  $A= 0,03 \cdot 10^{-24} \text{A}^2\text{s}$ ; **Kurve 2:** Nach Gleichung (5) angefitetes Rauschspektrum bei einer Konzentration von 0,2 mM Maltopentaose nach Abzug der Referenzkurve 1 ( $S_0= 3,2 \cdot 10^{-28} \text{A}^2\text{s}$ ). **Kurve 3:** Siehe Kurve 2, Spektrum jedoch bei einer Konzentration von 0,6 mM Maltopentaose aufgezeichnet ( $S_0= 4,6 \cdot 10^{-28} \text{A}^2\text{s}$ ). **Kurve 4:** Siehe Kurve 3, Spektrum jedoch bei einer Konzentration von 1,4 mM Maltopentaose aufgezeichnet ( $S_0= 7,2 \cdot 10^{-28} \text{A}^2\text{s}$ ); ( $U= 20$  mV;  $T= 20^\circ\text{C}$ ; 1 M KCl; 1%DiphPC in n-Dekan).

Demzufolge konnten mithilfe der Gleichung (6) (siehe 4.3.4.) die jeweiligen Eckfrequenzen  $f_c$  nach der Zugabe der entsprechenden Maltosederivate berechnet werden. Am linearen Fit des daraus resultierenden  $\tau$ -Graphen kann über die Steigung der Wert für  $K$  und über den Schnittpunkt des Graphen mit der y-Achse der Wert von  $k_1$  abgelesen werden. Darüber hinaus lieferte die Gleichung (6) (siehe 4.3.4.) den Wert für  $k_1$  (Verveen und De Felice, 1974; De Felice,

1981). Da für die Stabilitätskonstante  $K = k_1/k_{-1}$  gilt, kann das Ergebnis der Rauschmessung mit dem Titrationsergebnis verglichen werden. Der Vergleich der Titrations- und Rauschdaten der Maltosederivate zeigt eine allgemeine Übereinstimmung innerhalb der gemessenen Oligosaccharide bei den  $K$  und  $k_{1/2}$ -Werten. Übereinstimmend mit den Werten der Titration zeigen die Rauschdaten eine Zunahme der Affinität mit steigender Maltooligosaccharidlänge. Die Messungen ergaben auch hier nur kleine Varianzen innerhalb eines Maltosederivates. Für OmpS konnten für Maltose keine Geschwindigkeitskonstanten bestimmt werden, weil die Zuckeraffinität nicht in den messbaren Frequenzbereich fiel. Die mithilfe der Geschwindigkeitskonstanten errechneten Bindekonstanten  $K$  für OmpS nehmen in Analogie zu den LamB WT-Werten mit steigender Maltooligosaccharidlänge zu (siehe Tab. 4.6.). In Tabelle 4.6. sind die Messungen der Stromfluktuationsanalyse von OmpS den Messungen mit dem LamB WT (Benz *et al.*, 1987; Andersen *et al.*, 1995) gegenübergestellt.

**Tab.4.6.** Vergleich der Bindungsparameter verschiedener Maltosederivate zwischen OmpS aus *V. cholerae* und LamB aus *E. coli*. Legende: n.m.= nicht messbar; \* Wert für den LamB WT von Benz *et al.*, 1987; \*\* Werte für den LamB WT von Andersen *et al.*, 1995.

Zucker / Mutante	$K$ [ $M^{-1}$ ]	$k_1$ [ $103 M^{-1} s^{-1}$ ]	$k_{-1}$ [ $s^{-1}$ ]
Maltose			
OmpS WT	n.m.	n.m.	n.m.
LamB WT	100 *	1100 **	11000 **
Maltotriose			
OmpS WT	250	420	1700
LamB WT	4300 **	8400 **	2000 **
Maltopentaose			
OmpS WT	700	1900	2600
LamB WT	13000 **	5300 **	420 **
Maltoheptaose			
OmpS WT	1300	630	520
LamB WT	31000 **	5600 **	180 **

Ein Vergleich der Bindekonstanten  $K$  und  $k_{1/2}$  (Stromfluktuationsanalyse) ergibt bei OmpS eine 17 – 24-fache geringere Affinität zu den gemessenen Maltosederivaten als beim LamB WT. Diese Unterschiede werden in 4.5.3. bzw. 4.5.6. anhand eines Strukturvergleichs der beiden Porine diskutiert.

#### 4.4.7. Asymmetrischer Zuckertransport von OmpS

Zuletzt wurde noch mittels einseitiger Zugabe überprüft, inwieweit es zu einem asymmetrischen Bindeverhalten bzw. Inserieren der OmpS-Pore kommt. Auch diese Versuche wurden in Anlehnung zu den Versuchen mit dem wildtypischen LamB gestaltet, die einen gerichteten Einbau von 80% bei nahezu symmetrischem Maltosetransport ergaben (Andersen *et al.*, 2002). Die Werte, die mithilfe der Titrations- bzw. Stromfluktuationsanalyse nach cis-, trans- bzw. cis/trans-Zugaben erhalten wurden, sind im Rahmen der Auswertung gemittelt worden. Tabelle 4.7 zeigt eine Näherung der ermittelten Bindekonstanten K nach beidseitiger Zugabe und nach cis-Zugabe der Maltopentaose in die Küvette. Nach trans-Zugabe von Maltopentaose nimmt die aus dem  $k_1/k_{-1}$  Verhältnis errechnete Bindekonstante K hingegen leicht ab. Die Daten geben einen Hinweis auf einen gerichteten Einbau der Pore und eine damit verbundene geringe Asymmetrie beim Zuckertransport. Beides kann mit dem N-terminalen Ende von OmpS in Verbindung gebracht werden (siehe 4.5.7.).

**Tab.4.7.** Zusammenfassung der Bindekonstanten K von OmpS aus *V. cholerae* nach asymmetrischer bzw. symmetrischer Zugabe von Maltopentaose. (\* Vergleichswerte LamB sowie verschiedene LamB-Deletionsmutanten von Andersen *et al.*, 1999; \*\* Mittlung K-Werte nach Titrations- bzw. Stromfluktuationsanalyse). Die prozentualen Ausbeuten vom LamB WT und dessen Mutanten nach der Aufreinigung mittels Stärke-Säule sind im rechten Teil der Tabelle dargestellt. Legende: n.b.= nicht bestimmt worden;

+ Affinität zur Stärke-Säule ausreichend für die Aufreinigung;

– Affinität zur Stärke-Säule *nicht* ausreichend für die Aufreinigung (Andersen *et al.*, 1999).

Zugabe von Maltopentaose	cis-Seite	trans-Seite	beidseitig	Stärke-Bindung [%]	Stärke-Sepharose-Aufreinigung
Mutante	K [M <sup>-1</sup> ]				
OmpS WT	**470	**240	**590	n.b.	n.b.
LamB WT *	9800	11000	17000	100	+
LamB ΔL4 *	4900	6400	7900	3	–
LamB ΔL6 *	4000	6100	8900	1	–
LamB ΔL9v *	4300	6000	18000	89	+
LamB ΔL4ΔL6 *	11000	21000	19000	102	+
LamB ΔL4ΔL6ΔL9v *	9600	9000	20000	37	+

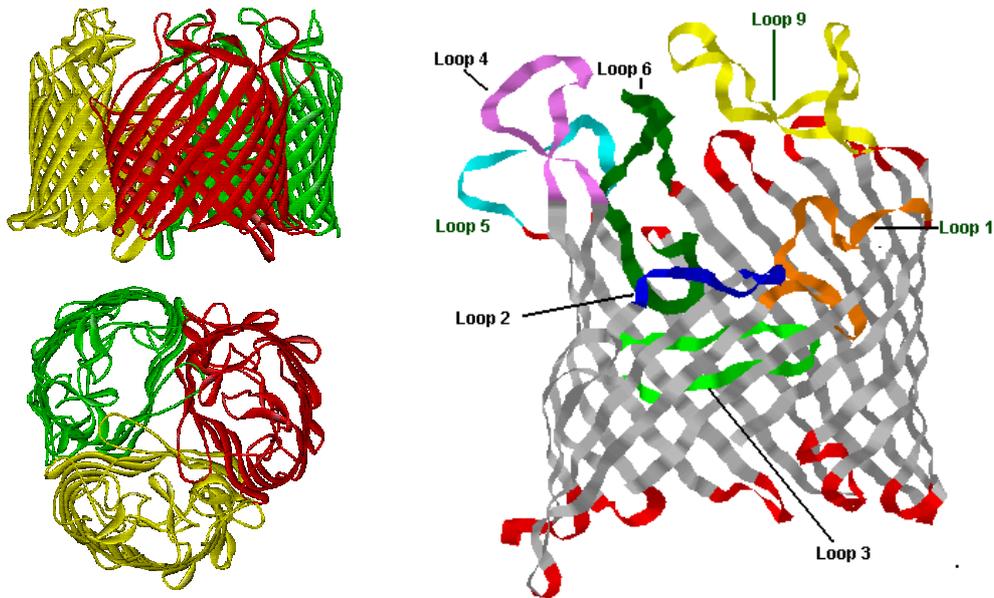
Der Sequenzvergleich und das zugehörige Strukturmodell (siehe Abb. 4.12. und Abb. 4.13.) zeigen, dass sich das OmpS WT-Porin und das LamB WT-Porin in der Länge der extrazellulären Loops unterscheiden. Tabelle 4.7. zeigt zudem, dass sich z.B. die Bindekonstanten  $K$  innerhalb der beiden LamB-Loopdeletionsmutanten  $\Delta L4$  bzw.  $\Delta L9$  nach der cis-Zugabe um jeweils etwa bis zu 50% im Vergleich zum LamB WT verringerten (Andersen *et al.*, 1999). Auch OmpS enthält weder einen Loop L4 noch einen Loop L9. Daher kann die höhere Affinität der Maltooligosaccharide im LamB WT zum Teil über die Strukturloops erklärt werden (siehe 4.5.3.). Im rechten Teil der Tabelle 4.7. sind die prozentualen Ausbeuten vom LamB WT und den LamB-Mutanten nach der Stärke-Säule-Aufreinigung dargestellt (Andersen *et al.*, 1999). Interessanterweise konnten die beiden Einzeldelentionsmutanten LamB  $\Delta L4$  bzw. LamB  $\Delta L6$  nicht mithilfe der Stärke-Säule gereinigt werden. Die LamB-Doppelmutante  $\Delta L4 \Delta L6$  hingegen konnte wieder an die Stärke-Säule binden und somit aufgereinigt werden. Die Notwendigkeit der Loops für die Stärkebindung wird in diesem Beispiel deutlich (siehe 4.5.3.).

#### **4.4.8. Proteinsequenzvergleich zwischen OmpS und LamB**

Ein Blick auf die Primärstrukturen der beiden Proteine LamB und OmpS zeigt eine sehr hohe Homologie, vor allem in den Aminosäuren der „greasy-slide“ und der zentralen Aminosäure Tyrosin 118 im LamB WT (Y118). Aufgrund des N-terminalen Restes liegt das zentrale Tyrosin im OmpS an Position 140 (Y140). Auch die Aminosäuren, die die  $\beta$ -Faltblätter zur Bildung des  $\beta$ -barrels enthalten, zeigen eine gewisse Konserviertheit. Größere Unterschiede zeigen sich an den Stellen, die den Loopstrukturen zugeordnet werden können. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Sekundärstrukturvorhersage in Abbildung 4.12. näher betrachtet. Hier kann man deutlich erkennen, dass die Porine große Einheiten mit identischer Sekundärstrukturvorhersage besitzen. Die markierten Bereiche innerhalb von Loop L4, L7 und L9 unterscheiden sich stark in ihrer Länge. Während bei OmpS Loop L7 um 16 Aminosäuren länger ist als beim LamB WT, besitzt der LamB WT im Vergleich zum OmpS einen größeren Loop L4 (15 Aminosäuren) und Loop L9 (24 Aminosäuren).



In Abbildung 4.13. ist das zugehörige Strukturmodell vom LamB WT (Schirmer *et al.*, 1995) dargestellt. Innerhalb des trimeren LamB-Moleküls sind die Monomere gelb, grün und rot markiert. Die Loops innerhalb des wildtypischen LamB-Monomers wurden farblich hervorgehoben.



**Abb.4.13.** Kristallstruktur vom LamB WT (Schirmer *et al.*, 1995).

**Links unten:** Aufsicht des trimeren LamB WT;

**Links oben:** Seitenansicht des trimeren LamB WT;

**Rechts:** Monomeres LamB WT mit eingefärbten Loopedomänen.

## 4.5. Diskussion

### 4.5.1. Induktion und Expression von OmpS in *E. coli*

Der verwendete Expressionsstamm *E. coli* KS262\_ompS enthält das *ompS*-Gen auf einem Vektor, der seinerseits über einen Regulationsmechanismus verfügt. Dieser entspricht im Aufbau der Regulationseinheit MalT von *E. coli* und wird daher vom Lac-Repressor inhibiert. Der von *E. coli* KS262\_ompS produzierte Lac-Repressor erreicht jedoch keine vollständige Suppression der Expression von OmpS, weshalb ein zusätzlicher Vektor mit einem weiteren Lac-Repressor-Gen eingebracht wurde. Auf den SDS-Gelen war zu erkennen, dass sich die Expressionsrate von OmpS in den verschiedenen Ansätzen (induziert und *nicht* induziert) kaum unterscheidet (Daten nicht angegeben). Man kann daher davon ausgehen, dass die Induktion von OmpS nicht der Theorie folgt. Dies könnte drei mögliche Ursachen haben. Erstens könnte der Expressionsstamm den Vektor des zusätzlichen Repressors abgestoßen haben, was eine gleichmäßig hohe Expression zur Folge hätte. Zweitens könnte eine Mutation die DNA-Bindungsstelle des Repressors verändert haben, so dass keine Hemmung der Expression von OmpS trotz des vorhandenen Repressors stattfindet. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Mutation in der Bindestelle von IPTG am Repressor. Dadurch würde eine dauerhafte Repression des *ompS*-Gens trotz der Induktion resultieren. Ein sehr geringer Proteingehalt wäre die Folge.

Da OmpS nur in sehr geringen Mengen aufgereinigt werden konnte, kann man vermuten, dass die zuletzt genannte Situation für die gleichbleibende Expression verantwortlich ist. Weiterhin kann man feststellen, dass in den verschiedenen untersuchten Fraktionen der Aufreinigung der Hauptanteil von OmpS im Cytoplasma vorlag (Daten nicht angegeben). Erst eine Umklonierung in einen bekannten Expressionsvektor würde zeigen, inwieweit eine größere Proteinausbeute durch funktionierende Induktion erreicht werden könnte.

### 4.5.2. Aufreinigung und SDS-PAGE von OmpS

Da es in früheren Arbeiten (Schmid, 1996 *Diplomarbeit*) aufgrund zahlreicher Verunreinigungen nicht gelungen war, die notwendigen Daten der Stromfluktuationsanalyse von OmpS in KCl-Lösung zu ermitteln, wurde innerhalb dieser Arbeit zunächst die Aufreinigung des OmpS-Porins optimiert. Die Aufreinigungsmethode mithilfe des Amylose-Resin-Batchs lieferte bereits mit den Maltose-Elutionen ein Protein, das in Black-Lipid-Bilayer Messungen messbare, sehr verrauschte Leitfähigkeitssignale zeigte, welche einen Einzelkanal-Leitfähigkeitswert von

120 pS erreichten. Da die Einzelkanal-Leitfähigkeitswerte bis auf wenige Ausreißer homogen waren, kann von einer hohen Reinheit des Proteins ausgegangen werden.

Die Detektion von OmpS mithilfe der SDS-PAGE konnte nur nach der Konzentrierung (Speedvac bei +60°C) der jeweiligen Fraktionen erzielt werden. OmpS zeigte nach dieser Behandlung eine monomere Bande mit dem entsprechenden Molekulargewicht von ca. 43 kDa, die anschließend zur Gelelektion verwendet wurde. Die biophysikalischen Analysen der eluierten Bande ergaben definierte Einzelkanal-Leitfähigkeitswerte von OmpS. OmpS-Proben, die bei +30°C inkubiert wurden, zeigten die gleiche porenformende Aktivität. Nach einer Inkubation bei +100°C konnte diese nicht mehr beobachtet werden. Daraus kann man folgern, dass es bis +60°C zur Trennung der Monomere von OmpS kommt, die wiederum nach der Inkubation bei +100°C vollständig denaturieren. Diese Monomere können sich -im Gegensatz zu den Monomeren von LamB- spontan zu Trimeren zusammen lagern. Dasselbe Aufreinigungsverfahren führte beim LamB WT zwar zu einer Vereinzelung der Monomere (ca. 45 kDa), die jedoch nach der Gelelektion keine porenformende Aktivität mehr aufwies. Der im LamB fehlende  $\alpha$ -helikale Teil (26 Aminosäuren bei OmpS) kann die Monomere womöglich nicht zum porenformenden Trimer dirigieren. Eine denkbare Erklärung hierfür ergibt sich überdies aus den Strukturvergleichen zwischen OmpS und dem wildtypischen LamB unter 4.5.6.

### **4.5.3. Vergleich der biophysikalischen Daten von OmpS und LamB**

OmpS zeigt eine große Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit dem LamB WT (30%-ige Identität der Aminosäuren). Trotzdem zeigen sich deutliche Unterschiede in den biophysikalischen Eigenschaften. OmpS-Poren zeigen eine leichte Kationenselektivität, während LamB-Porine keine Selektivität besitzen. Die Ursache dieser geringen Selektivität bei OmpS wird aus dem Modell der Sekundärstruktur (Abb. 4.12.) deutlich: Die Aminosäuren in einem  $\beta$ -Faltblatt sind „zick-zack-förmig“ angeordnet. Dabei zeigt die Seite mit den meisten hydrophilen, polaren Aminosäuren ins Kanallinnere. Die Seite, bei der die apolaren, hydrophoben Aminosäuren überwiegen, ist zur Membran hin ausgerichtet. Überträgt man diese Regel auf die  $\beta$ -Faltblätter der OmpS-Pore, so kann das Verhältnis der die ins Kanallinnere gerichteten negativ bzw. positiv geladenen Aminosäuren ermittelt werden. Es sind demnach 22 Aminosäuren mit negativer Ladung (Glutamat und Aspartat) im Kanallinneren zu finden, denen 12 positiv geladene Aminosäuren (Histidin, Lysin und Arginin) gegenüber stehen. Dieser Überschuss an negativen Ladungen könnte Kationen das Durchqueren der Pore erleichtern und somit der Grund der geringen Kationenselektivität sein.

Wie man aus der Tabelle 4.6. entnehmen kann, unterscheiden sich die Bindekonstanten von OmpS und dem LamB WT für verschiedene Maltooligosaccharide sehr deutlich. Dieser Unterschied wird mit steigender Zuckerlänge größer. Betrachtet man die Bindungsraten der beiden Porine für die verschiedenen Zucker, so ist ein Grund dafür der kleinere  $k_1$ -Wert. Dieser ist bei OmpS für die langkettige Maltoheptaose um das 9-fache kleiner als der  $k_1$ -Wert beim LamB WT. Der  $k_{-1}$ -Wert ist dagegen für Maltoheptaose bei OmpS um den Faktor 3 größer. Die Unterschiede in den Bindungsraten zwischen OmpS und LamB können evtl. durch strukturelle Abweichungen der Proteine erklärt werden. Die vom wildtypischen LamB bekannte „greasy-slide“ (Schirmer *et al.*, 1995) spielt auch bei OmpS eine wichtige Rolle. Dabei kann man sich den Transport der Zucker durch die Pore wie ein „Vor- und Zurückgleiten“ der Zuckermoleküle durch Wechselwirkung mit den aromatischen Aminosäuren der „greasy-slide“ vorstellen. Die Aminosäuren der „greasy-slide“ sind in OmpS und im LamB WT an identischer Stelle platziert und hochgradig konserviert (z.B. Y118 beim LamB WT; Y140 bei OmpS). Die deutlich höhere Bindungsaffinität vom LamB WT im Vergleich zu OmpS zu den Maltosederivaten kann demnach nicht über die innere Struktur der Porine erklärt werden.

Die größten Effekte hinsichtlich einer verringerten Zuckerbindung konnten nach der jeweiligen Einzeldelation von Loop  $\Delta L4$ ,  $\Delta L6$  bzw.  $\Delta L9$  im LamB WT beobachtet werden (Andersen *et al.*, 1999). Die beiden Loops L4 und L9 sind beim OmpS WT nur kurz und nicht so ausgeprägt wie beim LamB WT. Dementsprechend ähnelt die LamB  $\Delta L4$ -Deletionsmutante hinsichtlich ihrer gesamten Sekundärstruktur mehr dem OmpS WT als dieser wiederum dem LamB WT. So hatte diese Deletionsmutante LamB  $\Delta L4$  gänzlich die Fähigkeit verloren, an die Stärke-Affinitätssäule zu binden (Andersen *et al.*, 1999) und musste deshalb über die FPLC gereinigt werden.

Ergänzend dazu, dass diese Mutante nicht an die Stärke-Säule bindet, ist es von Interesse, die *in vivo* Aufnahme von Maltose und Maltopentaose zu betrachten. Im Vergleich zum LamB WT zeigt die LamB  $\Delta L4$ -Mutante nur eine geringe Maltoseaufnahme. Bei einer Konzentration von 4  $\mu$ M Maltopentaose war die *in vivo* Aufnahme ebenfalls stark beeinträchtigt. Sie betrug nur 2,5% der Wildtypaufnahme (Andersen *et al.*, 1999). Betrachtet man weiterhin die Loopbereiche an der Außenseite vom LamB WT, so kann man zwei dominante Funktionsgruppen erkennen. Die Loops L4, L5 und L6 bilden eine davon. Sie interagieren über Wechselwirkungen miteinander. Ihnen gegenüber steht der Loop L9. Wird nun durch Deletion der Loop  $\Delta L4$  entfernt (Aminosäuren 148-165), so fehlt ein wichtiges Mitglied dieser einen Gruppe. Die beiden übrigen Loops L5 und L6 werden labiler und erhalten mehr Bewegungsfreiraum. Sie „flattern“ auf ihrem Porenrand und verstopfen so zeitweise den

Poreneingang. Dies erklärt die schlechte Aufnahme von Maltose und Maltopentaose. Die Substrate finden keinen Zugang zu dem Kanal, da dieser stark verengt oder teilweise blockiert ist. Die *in vitro* Messungen der Mutante LamB  $\Delta L4$  ergaben eine Reduzierung der Bindungskonstante  $K$  um bis zu 50% bei allen Maltosederivaten. Damit war die Auswirkung der verminderten Bindungsaffinität größer als nach der Doppeldeletion der beiden Loops L4 und L6, weil der fehlende Loop L6 nicht mehr zusammen mit dem wesentlich kürzeren Loop L5 den LamB-Kanal versperren konnte. Nach der Deletion der kompletten Struktureinheit ( $\Delta L4\Delta L5\Delta L6$ ) konnte lediglich eine um 9% verringerte Affinität zur Stärke-Säule im Vergleich zum LamB WT gemessen werden.

Weiterhin schrieben Klebba und Mitarbeiter (1994) dem neunten Loop L9 eine wichtige Bedeutung bei der Zuckerbindung zu. In Wachstumsexperimenten haben sie gezeigt, dass alle Mutanten, bei denen der neunte Loop  $\Delta L9$  deletiert worden ist, nicht mehr auf Maltooligosacchariden als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können. Interessant an dem neunten Loop L9 ist eine Struktur aus vier aromatischen Aminosäuren, die in dieser Form aber nur in dem Maltoporin von *E. coli* vorkommen. Die Aminosäuren W375, Y377, Y379 und F390 könnten wie die sechs Aromaten der „greasy-slide“ eine Art Zuckerbindestelle bilden (siehe Abb. 4.12.). Durch Bindung an aromatische Aminosäurereste der Loops wird ein Vorgleichgewicht eingestellt. Die Zuckermoleküle richten sich aus und das Einfädeln in den Kanal ist erleichtert. Fehlt nun solch eine Vorinstanz -vergleichbar mit einem Platzanweiser- so herrscht molekulares Durcheinander und die Zucker behindern sich gegenseitig. So zeigte die Deletionsmutante LamB  $\Delta L9$  in den Arbeiten von Andersen *et al.*, 1999 eine verringerte Stärke-Säulen-Affinität um 11%. Darüber hinaus ergaben die Black-Lipid-Bilayer Experimente eine verringerte Aufnahme von Maltose bzw. Maltopentaose um etwa bis zu 50%. In Analogie zu diesen Ergebnissen könnte auch der extrem verkürzte Loop L9 im OmpS WT die geringeren Bindungskonstanten erklären, weil das optimale Einfädeln der Zucker nicht gewährleistet werden kann.

Es gibt zwischen den beiden Porinen aber noch weitere gravierendere Unterschiede in der Ausprägung der Loops. Während Loop L5 und L6 von der Länge her ungefähr gleich sind, findet man bei OmpS einen großen Loop L7. Dieser ist beim LamB WT nur drei Aminosäuren lang. Es wäre denkbar, dass die Loops L1 und L7 bei OmpS weiter über die Kanalöffnung gefaltet sind, und den Zuckermolekülen dadurch der Eintritt ins Lumen erschwert wird. Bis zur Strukturaufklärung von OmpS kann aber darüber nur spekuliert werden.

Insgesamt betrachtet hatten alle LamB-Deletionsmutanten einen deutlich kleineren  $k_1$ -Wert als das LamB WT-Porin (Andersen *et al.*, 1999). Da OmpS nahezu der ganze Loop L9

fehlt, kann dies die Ursache des um eine Größenordnung kleineren  $k_1$ -Werts sein. Da wildtypisches OmpS im Prinzip einer gekoppelten Deletion von Loop L4 bzw. L9 entspräche, erklären diese beiden Einzeldelationen der Loops L4 bzw. L9 nur zum Teil die insgesamt deutlich verminderte Bindungsaffinität im OmpS WT. Das Fehlen von Loop L9 im OmpS WT bedingt eine verminderte Kontaktaufnahme zwischen der ersten aromatischen Aminosäure aus der „greasy-slide“ und dem Zucker. Durch das Fehlen von Loop L4 im OmpS WT kollabieren die beiden Loops L5 und L6 und machen den Kanal damit schlechter zugänglich für die Zuckermoleküle. Erst eine Doppelmutante LamB  $\Delta L4\Delta L9$  könnte den vollständigen Beweis für eine 17 – 24-fache geringere Zuckeraffinität des wildtypischen OmpS liefern.

Es ist vorstellbar, dass eine andere komplexe Strukturvielfalt des Eingangsbereich der Pore und des Kanals dazu führt, dass vor allem länger-kettige Zucker schlechter in die Pore gelangen und mehr Probleme haben, richtig in die „Zuckerrutschbahn“ eingefädelt zu werden. Dass bei diesen Prozessen neben den von Dutzler und Mitarbeitern (1996) bestimmten Aminosäuren weitere Reste von Bedeutung sind, steht außer Frage. Diese Tatsache kann mithilfe der LamB-Triplemutante ( $\Delta L4\Delta L6\Delta L9$ ) erklärt werden (Andersen *et al.*, 1999).

#### **4.5.4. Trimernachweis von OmpS**

Um eine etwaige Aktivität des OmpS-Monomers auszuschließen, wurden Einzelkanal-Titrations durchgeführt. Dabei konnte der trimere Aufbau des Porins bewiesen werden. Dieser vom LamB WT bekannte Aufbau zeigt sich in der Fluktuation der Leitfähigkeit einer Pore in drei gleichgroßen Schritten, bei genügend hoher Maltoheptaosekonzentration. Daraus kann man schließen, dass die als Monomer aufgereinigten Proteine in Form eines Trimers in der Membran aktiv sind. Ein Verschluss der Pore von ca. 1/3 der Gesamtleitfähigkeit entspricht der Bindung eines Maltosemoleküls an eines der Monomere des Trimers. Bei einem doppelt so großen Ereignis kann man davon ausgehen, dass gleichzeitig zwei Monomere besetzt sind. Bei einem Abfall der Leitfähigkeit zurück auf die Nulllinie könnte eine gleichzeitige Blockierung aller drei Monomere oder ein Ausbau der Pore aus der Membran die Ursache sein. Die Ereignisse sind dabei am Schreiber nicht als Schließen und Öffnen in Treppenform zu erkennen, da sie sich zeitlich nicht in dieser Detailtiefe auflösen lassen. Für solche Versuche müssten computergestützte Einzelkanal-Titrations durchgeführt werden.

Zum weiteren Vergleich von OmpS und dem LamB WT wurden pH-Titrations durchgeführt. Wie aus der Literatur bekannt (Andersen *et al.*, 2002), schließt der LamB WT bei

Erniedrigung des pH-Wertes im umgebenden Medium nahezu vollständig. Dieses Verhalten stellt vermutlich einen Schutzmechanismus von *E. coli* dar, um das stark saure Milieu des Magens unbeschadet zu überstehen. Da es sich auch bei *Vibrio cholerae* um einen enterischen Organismus handelt, wurde dieser Versuch mit OmpS überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass eine geringe Leitfähigkeitsabnahme der Poren erst ab einem pH von deutlich unter 4 zu erkennen war. Bei diesen Bedingungen ist der LamB WT bereits vollständig geschlossen. Das weitere Verhalten von OmpS bei noch niedrigeren pH-Werten konnte auf Grund der Instabilität der Membran bei stark saurem pH nicht ermittelt werden. Eine mögliche Erklärung für die schwächere pH-Abhängigkeit wäre, dass OmpS erst in größerer Menge exprimiert wird, sobald sich der Erreger im Magen befindet. Dadurch könnten Schädigungen durch einen vermehrten Protoneneinstrom bei niedrigem pH, wie er im Magen vorliegt, vermieden werden. Zusätzlich kann man auch die bei der pH-Titration gesammelten Daten mit Kenntnis der Loopstruktur bei OmpS und dem LamB WT erklären (siehe Abb. 4.12.), weil bereits in vorangegangenen Versuchen mit Loop-Deletionsmutanten vom LamB WT gezeigt werden konnte, dass die beschriebene Funktionseinheit („Dachkonstruktion“) aus Loop L4 und L6 bei Absenkung des pH-Wertes ins Innere der Pore kollabiert und diese damit verschließen kann (Andersen *et al.*, 2002). Das Fehlen eines großen Teils von Loop L4 bei OmpS WT kann demnach die dort beobachtete schwächere pH-Abhängigkeit bedingen.

#### 4.5.5. Asymmetrischer Zuckertransport von OmpS

Die Affinitätswerte nach einseitiger Zugabe liegen deutlich unter den Werten nach beidseitiger Zugabe, da der Pore insgesamt eine geringere Oligosaccharidkonzentration zur Verfügung steht. Dennoch wird eine ähnliche Affinität erreicht. Anders verhält es sich bei den  $k_1$  und  $k_{-1}$ -Werten, über deren Verhältnis zueinander man eine Aussage zur Asymmetrie des Maltosetransports treffen kann. Nimmt man an, dass die Poren bei einseitiger Zugabe gerichtet in die Membran einbauen (beim LamB WT 70% – 80%), so erwartet man beim symmetrischem Transport ein gleich bleibendes Verhältnis zwischen  $k_1$  und  $k_{-1}$ , wie es beim LamB WT beobachtet wird (Orlik *et al.*, 2002). Die tatsächliche Verschiebung des Verhältnisses von  $k_1$  zu  $k_{-1}$  nach der trans-Zugabe des Zuckers (cis-Zugabe OmpS WT) lässt erkennen, dass hier eine leichte Asymmetrie im Maltosetransport vorliegt. Nimmt man für OmpS einen gerichteten Einbau an, so scheint Loop L4 tatsächlich wie nach der Einzeldelation beim LamB WT (LamB  $\Delta L4$ ) nach der cis-Zugabe einen Einfluss auf den Zuckertransport zu haben, weil der Zugang zur

„greasy-slide“ nicht ermöglicht werden kann (siehe Aufreinigung LamB  $\Delta$ L4). Damit könnte der Zucker lediglich von der trans-Seite die „greasy-slide“ erreichen.

#### 4.5.6. Proteinsequenzvergleich zwischen OmpS und LamB

Die Identität der Aminosäuren zwischen OmpS und dem LamB WT liegt bei insgesamt 30% (siehe Abb. 4.12). Die sechs Aromaten der „greasy-slide“ sind hochkonserviert und bis auf die Aminosäure Arginin 82 (R82) finden sich auch diejenigen Aminosäuren wieder, die mit den Zuckern Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. Der Kanalengpass scheint auch sehr gut konserviert zu sein, da fast alle Aminosäuren auf dem dritten Loop, die in den Kanal gerichtet sind, erhalten sind. Die Einzelkanal-Leitfähigkeit liegt beim LamB WT mit 160 pS in 1 M KCl (Benz *et al.*, 1986) im Bereich von OmpS. Loop L3 faltet sich, wie man innerhalb der Abbildung 4.13. des Monomers von LamB erkennen kann, ins Lumen der Pore und verringert dadurch den Durchmesser. Zusätzlich verändert Loop L3 die Beschaffenheit des Inneren und enthält unter anderem die zentrale Aminosäure Tyrosin (Y118 beim LamB WT; Y140 bei OmpS). Da dieser Loop in OmpS hochgradig homolog zum Loop 3 im LamB WT ist, kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass auch die Faltung erhalten bleibt. Der Sequenzvergleich und das darin integrierte Sekundärstrukturmodell (Abb. 4.12.) zeigen aber, dass sich die beiden Proteine in der Länge anderer extrazellulärer Loops unterscheiden. Die Loops L4 und L9 sind im OmpS um 15 bzw. 23 Aminosäuren kürzer als beim LamB WT, der Loop L7 ist um 16 Aminosäuren länger als der Loop L7 beim LamB WT (Abb. 4.12.).

Nach den Ergebnissen von Dutzler *et al.* (1996) besitzt der LamB WT eine ausgedehnte, komplexe Bindestelle, die sich in vier Glucosyl-bindende Untereinheiten aufteilen lässt. Die Bindungen mit den Glucosyl-Einheiten der Zuckermolekülen beruhen auf zwei Kräften: Ein wichtiger Teil der Bindestelle ist die beschriebene apolare „greasy-slide“, sozusagen eine molekulare Rutsche für Zuckermoleküle, die von sechs aromatischen Aminosäuren gebildet wird: Tyrosin 6 (Y6), Tyrosin 41 (Y41), Phenylalanin 227 (F227), Tryptophan 358 (W358), Tryptophan 420 (W420) und Tryptophan 74 (W74) einer benachbarten Untereinheit. Diese Aminosäuren kleiden das Kanalinnere von der cytoplasmatischen bis zur periplasmatischen Kanalöffnung aus und stehen mit den Maltooligosacchariden in apolarem van der Waals-Kontakt. Das Tyrosin 118 (Y118) gehört zwar nicht zur „greasy-slide“, wirkt aber mit dieser zusammen und geht ebenfalls hydrophobe Wechselwirkungen mit den Zuckermolekülen ein. Neben diesen hydrophoben Wechselwirkungen werden die Glucosyl-Einheiten durch Interaktion mit ionisierbaren, polaren Aminosäuren gebunden.

Diese kleiden die Engstelle des Porins aus und gehen komplexe Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hydroxylgruppen der Zuckermoleküle ein, wie in Abbildung 4.14. zu sehen ist. Die beteiligten Aminosäuren sind Arginin 8 (R8), Arginin 33 (R33), Glutamat 43 (E43), Arginin 82 (R82), Arginin 109 (R109), Arginin 113 (R82) und Aspartat 116 (D116). Aus dem Aminosäurenvergleich zwischen OmpS und dem LamB WT geht hervor, dass beide Porine, in diesen für Zuckerbindung Ausschlag gebenden Aminosäuren, übereinstimmen. Die Ausnahme ist das Arginin 82 (R82), das in OmpS durch Alanin ersetzt ist. Man könnte annehmen, dass diese ausgetauschte Aminosäure für den geringeren  $k_1$ -Wert für Maltose bei OmpS verantwortlich ist. Die Ergebnisse der LamB-Mutante R82S, die an dieser Stelle ein Serin besitzt, widersprechen dieser Annahme (Schmid, 1996 *Diplomarbeit*). Ein Austausch des relativ großen Arginins durch die kleinere Aminosäure Serin führt eher zu einer Zunahme des  $k_1$ -Werts. Somit kann man davon ausgehen, dass die Stelle 82 nicht für den geringeren  $k_1$ -Wert der Zuckerbindung bei OmpS verantwortlich ist. Ein weiterer konservierter Loop ist der Loop L2. Dieser greift von einem Monomer in das nächste Monomer über und trägt dort zur Ausbildung der „greasy-slide“ bei. Es wurde bisher angenommen, dass dieser Loop verhindert, dass sich vereinzelte Monomere vom LamB WT wieder zu einer funktionellen Form zusammen fügen können. Dem widerspricht die Tatsache, dass OmpS zwar den Loop L2 in ähnlicher Form besitzt, aber ebenso die Fähigkeit zeigt, spontan trimere Poren aus Monomeren zu formen. Auch hier kann bisher nur spekuliert werden, warum beide Maltoporine diese Eigenschaft nicht miteinander teilen. Daher könnte hierbei der N-terminale Rest von OmpS eine Rolle spielen (siehe Abb. 4.12.). Der schlechtere Konservierungsgrad der Transmembrandurchgänge im Bereich der extrazellulären Kanalöffnung ist ein weiterer Hinweis darauf, dass sich die Strukturen der beiden Proteine in diesem Bereich unterscheiden.

Insgesamt betrachtet sollte die Struktur von OmpS, aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen Eigenschaften, der vom LamB WT (Abb. 4.13.) ähneln. Die Einflüsse der Loopdomänen auf die Zuckerbindung können daher erst nach der dreidimensionalen Strukturaufklärung von OmpS auch *in vivo* bestätigt werden.



In diesem Zusammenhang könnten die höheren  $k_1$ -Werte durch das schnelle Ablösen des Zuckers durch den N-terminalen Rest aus dem Inneren der Pore heraus erklärt werden. Die kleineren  $k_1$ -Werte ergeben sich dadurch, dass der N-terminale Rest die Pore abschirmt. Da das N-terminale Ende von OmpS *in vivo* in den periplasmatischen Raum ragt, könnte es die Rolle eines Maltosebindeproteins übernehmen, wie es für ScrY gezeigt wurde (Dumas *et al.*, 2000a).

#### **4.5.8. Ausblick**

Zusammenfassend kann man aus den erhaltenen Daten und den gezogenen Vergleichen zu LamB und ScrY sagen, dass OmpS in *V. cholerae* dieselbe Aufgabe übernimmt wie LamB in *E. coli*. Diese besteht darin, dem Organismus eine weitere Nahrungsressource zu erschließen. Die unterschiedlich hohe Spezifität der Porine kann eventuell über die unterschiedliche Lebensweise erklärt werden, denn während *E. coli* ein enterisches Bakterium ist, kann *V. cholerae* auch außerhalb des Körpers überleben, wo ein kleinerer Selektionsdruck auftreten kann. Allgemein kann man bei der hohen beobachteten Homologie von OmpS und LamB, wie auch ScrY, davon ausgehen, dass ein gemeinsames Vorläuferprotein wohl der Grundbaustein zur Aufspaltung dieser drei zuckerspezifischen Porine war. Alle drei Porine stammen aus Bakterien, die sich stoffwechselphysiologisch sehr nahe stehen. Es ist deshalb nicht abwegig, wenn man vermutet, dass alle drei Porine von einem gemeinsamen phylogenetischen „Ur-Porin“ abstammen. Aufgrund der unterschiedlichen Lebensweise der Bakterien wurden im Laufe der Evolution verschiedene Mutationen des „Ur-Porins“ selektiert. *E. coli* gehört zur Gruppe der *Enterobacteriaceae* und ist ein Darmbewohner. Es konkurriert deshalb mit anderen Darmbewohnern und auch dem Wirt um die vorhandenen Zucker. Mutationen, die eine bessere Zuckerbindung des LamB-Porins bewirken, werden sich in einer solchen Umgebung durchsetzen. *Vibrio cholerae* dagegen ist kein enterisches Bakterium, kann sich aber fakultativ auch im Darm vermehren. Da sich demnach der natürliche Lebensraum von *E. coli* unterscheidet, war eine bessere Bindungsrate des OmpS eventuell nicht überlebenswichtig.

Weitere Versuche mit Mutanten, des in dieser Arbeit aufgereinigten OmpS bzw. die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur, werden in Zukunft vielleicht die hier gemachten Vermutungen bezüglich der Funktion bestätigen. Damit könnte ein weiterer Schritt zur Aufklärung der äußeren Zellmembran von *V. cholerae* gemacht und damit eventuell zur Bekämpfung eines potentiell tödlichen Pathogens beigetragen werden.

## 4.6. Referenzen

- Abuaita, B. H. & J. H. Withey, (2009) Bicarbonate induces *Vibrio cholerae* virulence gene expression by enhancing ToxT activity. *Infect Immun.*
- Andersen, C., C. Bachmeyer, H. Täuber, R. Benz, J. Wang, V. Michel, S. M. Newton, M. Hofnung & A. Charbit, (1999) In vivo and in vitro studies of major surface loop deletion mutants of the *Escherichia coli* K-12 maltoporin: contribution to maltose and maltooligosaccharide transport and binding. *Mol Microbiol* **32**: 851-867.
- Andersen, C., R. Cseh, K. Schülein & R. Benz, (1998) Study of sugar binding to the sucrose-specific ScrY channel of enteric bacteria using current noise analysis. *J Membr Biol* **164**: 263-274.
- Andersen, C., M. Jordy & R. Benz, (1995) Evaluation of the rate constants of sugar transport through maltoporin (LamB) of *Escherichia coli* from the sugar-induced current noise. *J Gen Physiol* **105**: 385-401.
- Andersen, C., B. Schiffler, A. Charbit & R. Benz, (2002) PH-induced collapse of the extracellular loops closes *Escherichia coli* maltoporin and allows the study of asymmetric sugar binding. *J Biol Chem* **277**: 41318-41325.
- Anderson, R. (1996) Department of Molecular Genetics, University of Uppsala. Expressionsstamm *E. coli* KS262\_ompS.
- Benz, R., K. Janko, W. Boos & P. Läuger, (1978) Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **511**: 305-319.
- Benz, R., A. Schmid, T. Nakae & G. H. Vos-Scheperkeuter, (1986) Pore formation by LamB of *Escherichia coli* in lipid bilayer membranes. *J Bacteriol* **165**: 978-986.
- Benz, R., A. Schmid & G. H. Vos-Scheperkeuter, (1987) Mechanism of sugar transport through the sugar-specific LamB channel of *Escherichia coli* outer membrane. *J Membr Biol* **100**: 21-29.
- Blum, H., H. Beier & H. J. Gross, (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Chatterjee, S. N. & K. Chaudhuri, (2003) Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochim Biophys Acta* **1639**: 65-79.
- Conti, F. & E. Wanke, (1975) Channel noise in nerve membranes and lipid bilayers. *Q Rev Biophys* **8**: 451-506.
- De Felice, L.J., (1981) Introduction to Membrane Noise. Plenum Press, New York.
- Dumas, F., S. Frank, R. Koebnik, E. Maillet, A. Lustig & P. Van Gelder, (2000a) Extended sugar slide function for the periplasmic coiled coil domain of ScrY. *J Mol Biol* **300**: 687-695.

- Duplay, P., H. Bedouelle, A. Fowler, I. Zabin, W. Saurin & M. Hofnung, (1984) Sequences of the malE gene and of its product, the maltose-binding protein of Escherichia coli K12. *J Biol Chem* **259**: 10606-10613.
- Dutzler, R., Y. F. Wang, P. Rizkallah, J. P. Rosenbusch & T. Schirmer, (1996) Crystal structures of various maltooligosaccharides bound to maltoporin reveal a specific sugar translocation pathway. *Structure* **4**: 127-134.
- Forst, D., W. Welte, T. Wacker, K. Diederichs, (1997) Structure of ScrY, the sucrose-specific porin from *Salmonella typhimurium*, and its complex with sucrose at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 37-46.
- Glass, R. I., M. Claeson, P. A. Blake, R. J. Waldman & N. F. Pierce, (1991) Cholera in Africa: lessons on transmission and control for Latin America. *Lancet* **338**: 791-795.
- Jordy, M., C. Andersen, K. Schulein, T. Ferenci & R. Benz, (1996) Rate constants of sugar transport through two LamB mutants of Escherichia coli: comparison with wild-type maltoporin and LamB of Salmonella typhimurium. *J Mol Biol* **259**: 666-678.
- Kim, B. H., C. Andersen, J. Kreth, C. Ulmke, K. Schmid & R. Benz, (2002) Site-directed mutagenesis within the central constriction site of ScrY (sucroseporin): effect on ion transport and comparison of maltooligosaccharide binding to LamB of Escherichia coli. *J Membr Biol* **187**: 239-253.
- Klebba, P. E., M. Hofnung & A. Charbit, (1994) A model of maltodextrin transport through the sugar-specific porin, LamB, based on deletion analysis. *EMBO J* **13**: 4670-4675.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lang, H. & E. T. Palva, (1993) The ompS gene of Vibrio cholerae encodes a growth-phase-dependent maltoporin. *Mol Microbiol* **10**: 891-901.
- Makri, S., A. E. Purdy, D. Bartlett & J. Fierer, (2007) Pathogenicity of environmental isolates of V. cholerae in mice. *Microbes Infect* **9**: 1351-1358.
- Michels, J., A. Geyer, V. Mocanu, W. Welte, A. L. Burlingame & M. Przybylski, (2002) Structure and functional characterization of the periplasmic N-terminal polypeptide domain of the sugar-specific ion channel protein (ScrY porin). *Protein Sci* **11**: 1565-1574.
- Nekolla, S., C. Andersen & R. Benz, (1994) Noise analysis of ion current through the open and the sugar-induced closed state of the LamB channel of Escherichia coli outer membrane: evaluation of the sugar binding kinetics to the channel interior. *Biophys J* **66**: 1388-1397.
- Niederweis, M., (1996) Lehrstuhl für Biotechnologie, Würzburg. Expressionsstamm E. coli Mn 25/44 (=Mn26).
- Orlik, F., C. Andersen & R. Benz, (2002) Site-directed mutagenesis of tyrosine 118 within the central constriction site of the LamB (maltoporin) channel of Escherichia coli. II. Effect on maltose and maltooligosaccharide binding kinetics. *Biophys J* **83**: 309-321.

- Sarkar, B. L., S. P. De, B. K. Sircar, S. Garg, G. B. Nair & B. C. Deb, (1993) Polymyxin B sensitive strains of *Vibrio cholerae* non-O1 from recent epidemic in India. *Lancet* **341**: 1090.
- Schirmer, T., T. A. Keller, Y. F. Wang & J. P. Rosenbusch, (1995) Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**: 512-514.
- Schmid, E., (1996) Charakterisierung des Zuckerbindenden Porins Omp S aus *Vibrio cholerae* und der LamB-Substitutionsmutanten Y118S und R82S aus *Escherichia coli* mit Hilfe der Stromfluktuationsanalyse. *Diplomarbeit*.
- Schüle, K., C. Andersen & R. Benz, (1995) The deletion of 70 amino acids near the N-terminal end of the sucrose-specific porin ScrY causes its functional similarity to LamB in vivo and in vitro. *Mol Microbiol* **17**: 757-767.
- Turnbull, P. C., J. V. Lee, M. D. Miliotis, C. S. Still, M. Isaacson & Q. S. Ahmad, (1985) In vitro and in vivo cholera toxin production by classical and El Tor isolates of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol* **21**: 884-890.
- Verveen, A. A. & L. J. DeFelice, (1974) Membrane noise. *Prog Biophys Mol Biol* **28**: 189-265.
- Wohnsland, F. & R. Benz, (1997) 1/f-Noise of open bacterial porin channels. *J Membr Biol* **158**: 77-85.

## 5.1. Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Dipl. Biol. Christian Kläckta  
geboren am 30. Juli 1979 in Coburg  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Studium / Universitätsausbildung

---

- Okt. 2000 – April 2005 **Studium der Biologie** an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
  
Hauptfach: Biochemie, Nebenfächer: Biotechnologie, Mikrobiologie
- Mai 2005 – März 2006 **Diplomarbeit**  
„Charakterisierung von Zellwandproteinen aus mycolsäurehaltigen Aktinomyceten“
- April 2006 **Diplom in Biologie**
- Seit April 2006 **Promotionsstudium** in der AG Prof. Dr. Dr. h.c. Roland Benz,  
„Biochemische und -physikalische Charakterisierung von rekombinanten Porinen aus den beiden pathogenen Bakterien *Nocardia farcinica* und *Vibrio cholerae* sowie von nativen Porinen aus drei *Streptomyces* Arten“

### Schulausbildung

---

- Sept. 1986 – Juni 1999 Grundschule, Gymnasium Ernestinum Coburg
- Juni 1999 Abitur

## 5.2. Danksagung

Im folgenden möchte ich denjenigen Personen danken, die mich (nicht nur) die letzten drei Jahre hinweg so tatkräftig unterstützt haben.

### Ich bedanke mich bei...

... **Prof. Dr. Dr. h. c. Roland Benz**, für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe, für die Förderung und Unterstützung zahlreicher Weiterbildungen neben dem Laboralltag, für die Möglichkeit meine Projekte mit Diplomanden sowie Praktikanten zu meistern, seine ständige Hilfsbereitschaft bei allen Sachfragen, die Kaffeerunden, Symposien und Bürgerspitalabende, die die Geselligkeit niemals zu kurz kommen ließen.

...**Prof. Dr. Jürgen Kreft**, für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und das Erwecken meines Interesses an der Angewandten Mikrobiologie während des F1-Praktikums im WS 03/04.

... **Dr. Christian Andersen**, für seine Hilfsbereitschaft und Einführung in die Genetik sowie für die vielen Ideen und Anregungen, die leider nicht immer alle umsetzbar waren.

...**Ursel**, für ihre kompetente Einführung in das *Streptomyces* Projekt, ihre endlose Hilfsbereitschaft, die gute Laune, und last but not least ihre beiden Geburtstagspartys in Wittighausen.

...meinen Diplomanden **Philipp Knörzer**, **Dominik Montag** sowie **Christoph Beitzinger**, für die durchweg perfekte Zusammenarbeit. Darüber hinaus danke ich **Philipp**, für die Einführung in das Basteln von „Karnevalswagen“, **Dominik**, für sein Engagement und Einsatz in einem nicht ganz einfachen Diplomarbeitsthema die Orientierung zu behalten sowie **Christoph**, für die durchweg interessanten Gespräche und „Ausflüge“ in die Welt der Terraristik, Knobelaufgaben, Bastelstunden (Frustbäume, 3D-Animationen) und Modellflieger.

...**Harry Falk**, für die Überzeugungsarbeit, dass Fermenter nicht riechen, „neue Medien“ Voraussetzung zum Überleben in der heutigen Zeit sind, für seine organisatorische Hilfsbereitschaft und subtile Wortakrobatik sowie für viele tiefgründige Gespräche und die daraus entstandene Freundschaft.

... den beiden Assistenten **Elke Maier**, für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft in allen Laborfragen sowie **Bettina Schiffler**, für die Möglichkeit in „ihrem“ Labor meine Versuche durchführen zu dürfen, ihre Hilfsbereitschaft sowie die witzigen Dialoge abseits des Laboralltags.

## Vielen Dank weiterhin an...

...**Tobias Knaf**, für seine große Hilfsbereitschaft bei allen organisatorischen Fragen, sein großes Sportinteresse und den Ehrgeiz uns die hessische Frohnatur näher zu bringen.

...**Iván Bárcena-Uribarri, Dr. Lidia Ruiz**, für das spanische Temperament in unserer Gruppe.

... allen weiteren aktuellen sowie ehemaligen Mitarbeitern der AG Benz für eine super schöne Zeit,...

...**Dr. Enrico Barth, Angelika Kronhardt, Tobias Dörr, Claudia Rehberger, Marco Lolicato, Jennifer Rausch, Florian Rohleder, Martin Mau, Christian Löw, Moritz Ewald, Martin Wirsching, Dr. Bernd Pfaff, Nicolas Frank, Anna Sacher, Dr. Katrin Lokaj** (ehemals: Denker), **Bettina Mühling** für den Spaß in dieser Gruppe.

...**Dr. Marcus Thein**, für die vielen, vielen schönen Gespräche und Bierabende abseits des gemeinsamen Laboralltags, seine Erklärungen der „Brandschen“ Taktik sowie für seine unglaubliche, tägliche!!! Freundlichkeit, die diese Arbeitsgruppe stets bereichert hat.

...**Dr. Josch Stegmeier**, für die optimale Integration innerhalb der damaligen Arbeitsgruppe, die vielen unvergessenen Dialoge innerhalb bzw. außerhalb des Laboralltags, seine Gastfreundschaft, seine wertvolle Meinung in allen Lebensbereichen sowie dieselbe Fanfreundschaft zum großartigen FCB.

... **Alexander Molitor alias Molinsky**, für die geniale, gemeinsame Studienzzeit, seinen Humor, den er nicht nur in dieser Arbeitsgruppe unter Beweis stellen konnte, seine Ehrlichkeit und Zuverlässigkeit; für die Möglichkeit bei seinen lieben „Würzburger Bayern“, schöne Abende zu verbringen und für seine Freundschaft.

...**Dr. Peter Reichling** und **Dr. Georg Polleichtner**, für die zahlreichen Ratschläge sowie stets lustigen Dialoge.

...**Dr. Martin Kiesel** sowie **Dr. Kilian Müller**, für die zahlreichen, unterhaltsamen „After-Work-Sessions“ in unserem gemeinsamen Lehrstuhl.

...und allen weiteren Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biotechnologie, die mich wunderbar aufgenommen haben.

## **Und ganz besonderen Dank an...**

...**meine restlichen Würzburger und Coburger Freunde**, die immer an meiner super schönen Studienzeit teilnahmen und mir so manchen Tipp gaben.

...**Judith und Alex**, für die zahlreichen Einladungen nach „Ascheberg“, für den Ausflug nach Slowenien und die große Anteilnahme an meiner Doktorarbeit.

...**meine Eltern Gabriele und Michael Kläckta**, für die grenzenlose Unterstützung in allen Lebensbereichen sowie für die „Wertevermittlung“ sich „Dinge“ zu verdienen, insofern man die dafür nötigen Anstrengungen aufwendet. Danke für die unermessliche Geborgenheit, die Ihr mir schenkt.

...**meine Schwester Kathrin, meinen Schwager Tommi und mein Patenkind Julius**, für die entspannten Stunden in den schönsten Biergärten Münchens, für die schönen Gespräche abseits der Forschungstätigkeiten und die ehrenvolle Aufgabe, mir das Patenamnt für ihren Julius zu übertragen.

...**meine Großeltern Erni und Werner Kläckta**, für die liebevolle Begleitung meines Werdegangs über die letzten 30 Jahre hinweg. Es ist wunderbar Großeltern zu haben, die es schaffen Lebenserfahrung mit Modernität zu vereinen.

... **Emmi und Woody**, für das tierische Geschenk der Ruhe und Ausgeglichenheit.

...**Annika**, für das (Mit-)Durchleben aller Höhen und Tiefen während meiner Doktorarbeit, für ihre vielen Ratschläge, ihre Gelassenheit beim Zuhören und den Glauben an mich. Danke, dass Du stets mein Ruhepol warst, ohne den vieles nicht möglich gewesen wäre.