

**Technische Universität München**



Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Molekulare Strukturbiologie

**Strukturuntersuchungen an Porinen  
aus Pro- und Eukaryonten**

Kornelius Zeth

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie,  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. W. Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff
3. Hon.-Prof. Dr. D. Oesterhelt

Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 26.10.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 14.12.2000 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Zusammenfassung/Summary</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1	<b>Allgemeine Einführung</b>	<b>3</b>
1.1.1	Proteine der äußeren Membran	6
	• Strukturprinzipien	6
	• Strukturklassen der äußeren Membran	7
1.2	<b>Spezielle Einführung</b>	<b>9</b>
1.2.1	Porine der AM Gram-negativer Bakterien	9
	• Unspezifische Porine	10
	• Spezifische Porine	10
1.2.2	Porine in pathogenen Bakterien	11
1.2.3	Porine in Mitochondrien	11
1.2.4	Porine in Chloroplasten	12
1.2.5	Funktionelle Charakterisierung von Porinen	13
	• Leitfähigkeitsmessungen	13
	• Der Liposomen-Schwellungsassay	16
1.3	Ziel der Arbeit und Motivation	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	<b>Material und Methoden zu Omp32 und dem 54-AS-Peptid</b>	<b>17</b>
2.1.1	Isolierung und Reinigung des Porin-Peptid-Komplex	17
2.1.2	Reinigung und Sequenzierung des 54-AS Peptids	18
2.1.3	Chemische Modifikation von Omp32 durch Succinylierung	19
2.1.4	Bromcyan- und Trypsinabbau	19
2.1.5	FTIR-Spektroskopie	20
2.1.6	Analyse der Proben über MALDI-MS	21
2.1.7	Analyse der Proteinproben über ESI-MS	22
2.1.8	3D-Kristallisation von Omp32 und S100	22
2.1.9	Kristallmontage und Datenauswertung	23
2.1.10	Derivatanalyse und Phasierung über SIRAS	25
2.1.11	Strukturlösung über den molekularen Ersatz	25

2.1.12	Molekülbau und Verfeinerung der Koordinaten	26
<b>2.2</b>	<b>Material und Methoden zu HVDAC1 und HVDAC2</b>	<b>27</b>
2.2.1	Expression, Reinigung und Rückfaltung	27
2.2.2	Bindung von HVDAC1 an ATP-Agarose	29
2.2.3	Dynamische Lichtstreuung an HVDAC1	29
2.2.4	FTIR-ATR an rückgefalteten VDAC-Proben	29
2.2.5	Elektronenmikroskopie	30
2.2.6	3D-Kristallisation	31
<b>2.3</b>	<b>Material und Methoden zu P100</b>	<b>31</b>
2.3.1	Isolierung und Reinigung von P100	31
2.3.2	FTIR-Spektroskopie an P100	32
2.3.3	2D-Kristallisation von P100	32
2.3.4	Elektronenmikroskopie	33
2.3.5	AFM-Untersuchungen an P100	33
<b>2.4</b>	<b>Puffer.</b>	<b>34</b>
<b>2.5</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Allgemeines</b>	<b>36</b>
<b>3.1a</b>	<b>Allgemeines zu <i>Comamonas acidovorans</i></b>	<b>36</b>
<b>3.1b</b>	<b>Allgemeines zur Funktion von Omp32</b>	<b>37</b>
<b>3.1.1a</b>	Sequenzvergleich zur Porin-Überfamilie	38
<b>3.1.1b</b>	Isolierung und Sequenzierung 54-AS-Peptids	41
<b>3.1.2</b>	Reinigung von Omp32 aus <i>C. acidovorans</i>	42
<b>3.1.3</b>	Chemische Modifikation und deren Analyse	44
<b>3.1.4</b>	3D-Kristallisation und Röntgenkristallografie	50
<b>3.1.5</b>	Molekularer Ersatz und Suche nach Schweratomderivaten	53
<b>3.1.6</b>	Modellbau und Strukturverfeinerung	54
<b>3.1.7</b>	Kristallpackung und Strukturbeschreibung	55
<b>3.1.8</b>	Strukturbeschreibung des Peptid-Komplexes	57
<b>3.1.9</b>	Die Porinstruktur	59
<b>3.1.10</b>	Die Aromaten- und Lysingürtel	61
<b>3.1.11</b>	Elektrostatistische Eigenschaften der Pore	63
<b>3.1.12</b>	Die Pore: Überlegungen zur Struktur und Funktion	63

<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse zu VDAC</b>	<b>66</b>
3.2.1	Sequenzanalyse	66
3.2.2	Sekundärstrukturvorhersage	67
3.2.3	Expression von HVDAC1 und HVDAC2	68
3.2.4	ATP-Bindung, DLS und FTIR Spektroskopie	71
3.2.5	Elektronenmikroskopie an HVDAC1	73
3.2.6	<i>Peptide mapping</i> und die Topologie von HVDAC1	76
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse zu Porin P100 aus <i>Thermus thermophilus</i></b>	<b>79</b>
3.3.1	Homologieüberlegungen und Sekundärstrukturvorhersagen	79
3.3.2	Zellzucht und Reinigung	82
3.3.3	FTIR Spektroskopie.	83
3.3.4	2D-Kristallisation und Elektronenmikroskopie	84
3.3.5	AFM-Untersuchungen an 2D-Kristallen von P100	86
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>92</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion zu Omp32</b>	<b>92</b>
4.1.1	Sequenzanalyse von Omp32 und verwandten Porinen	92
4.1.2	Topologieuntersuchungen an Omp32	94
4.1.3	Kristallisation und Datensammlung	95
4.1.4	<i>Molecular replacement</i> und SIR-Strukturlösung	95
4.1.5	Strukturanalyse und Vergleich mit bekannten Porinen	96
	• Architektur des Porin-Peptid-Komplexes	96
	• Faltungsstruktur des Porins	98
	• Der Trimerkontaktbereich	100
	• Der hydrophobe Membran-exponierte Bereich	101
	• Der hydrophile Membranbereich	102
	• Das polare Poreninnere	102
	• Die Ca <sup>2+</sup> -Bindungsstelle	104
	• <i>Molecular modelling</i> von Porinen	106
<b>4.2</b>	<b>Diskussion zu VDAC</b>	<b>109</b>
4.2.1	Sequenzanalyse von HVDAC1 und HVDAC2	109
4.2.2	Expression und Rückfaltung	109
4.2.3	Oligomerisation und Sekundärstrukturanalyse	112
4.2.4	Elektronenmikroskopische Analyse von HVDAC1	114



4.2.5	<i>Peptide-mapping-Analyse</i>	. . .	116
4.3	<b>Diskussion zu P100</b>	. . . . .	118
4.3.1	Homologiebetrachtungen	. . . . .	118
4.3.2	Sekundärstrukturanalyse	. . . . .	119
4.3.3	2D-Kristallisation und Ultrastrukturanalyse	. . . . .	120
4.3.4	2D-Kristalle und Rasterkraft-Mikroskopie	. . . . .	121
5	<b>Literatur</b>		122

---

## Strukturuntersuchungen an Porinen aus Pro- und Eukaryonten

Die hier vorliegende Arbeit beschreibt strukturelle Untersuchungen an den Porinen Omp32 aus *Comamonas acidovorans*, P100 aus *Thermus thermophilus* sowie HVDAC1 und HVDAC2 aus *Homo sapiens*.

In der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und Mitochondrien existieren porenbildende integrale Proteine, die Porine, welche die Membran für die Translokation von Ionen und kleinen Molekülen permeabel machen. Gemessen an der Vielzahl funktioneller Messungen, die für diese Proteinklasse beschrieben wurden, fällt deren Interpretation durch den Mangel an strukturellen Daten immer noch schwer. Um diese Lücke teilweise zu schließen, werden in dieser Abhandlung drei strukturell noch weitgehend unbekannte Porine vorgestellt.

Die Struktur des bakteriellen Porins Omp32 wurde durch Röntgenkristallografie über die SIRAS-Methode bei 2,1 Å gelöst. Das homotrimere Protein ist den bisher bekannten Porinen bezüglich ihrer Architektur sehr ähnlich, allerdings zeigt es hinsichtlich seiner Porengeometrie und Oberflächenladung neue Eigenschaften, die im Zusammenhang mit den funktionellen Aspekten neue Erklärungsansätze bieten. Die Struktur enthält ein in der Porenengstelle gebundenes Anion, das eine Funktion des Porins als Anionen-spezifischen Kanal für kleine organische Säuren nahelegt. Das Protein wurde im Komplex mit einem periplasmatischen Peptid kristallisiert, dessen Lokalisation und Sequenz eine Beteiligung an der Peptidoglykanbindung vermuten lässt. Damit ist in dieser Arbeit erstmals der strukturelle Nachweis für einen Porin-Peptid-Komplex gelungen.

Protein P100 repräsentiert ein Porin aus einem thermophilen Bakterium, das drei neue strukturelle Merkmale zeigt: Neben einer ungewöhnlich großen integralen Membrandomäne, besitzt das homotrimere Protein einen langen *triple-coiled-coil*-Stil und eine SLH-Domäne, die als Peptidoglykan-Bindungsdomäne bekannt ist. P100 wurde mittels Elektronenmikroskopie, Rasterkraftmikroskopie und FTIR-Spektroskopie untersucht. Die elektronenmikroskopischen Daten negativ-kontrastierter 2D-Kristallen zeigen drei Symmetrie-verwandte Poren, die mit einem Durchmesser von 5 - 6 nm den der bisher strukturell bekannten Porine bei weitem übersteigt. Die drei Poren und die ca. 10 nm lange stiftförmige Struktur der *coiled-coil*-Domäne ließen sich im Rasterkraftmikroskop getrennt voneinander durch Variation des Abstandes zwischen Spitze und Probe darstellen. Die Daten der FTIR-Spektroskopie bestätigen schließlich, dass es sich im Fall von P100 tatsächlich um ein Porin mit einem ungewöhnlich hohen  $\alpha$ -helicalen Anteil handelt.

Zwei humane Isoformen des mitochondrialen Porins wurden in *E. coli* kloniert und exprimiert. Das in Form ungefalteter *inclusion bodies* produzierte Protein konnte durch die Entwicklung eines effizienten Verfahrens in großen Mengen in seine native Form zurückgefaltet werden. Die Sekundärstrukturanteile der beiden rückgefalteten Isoformen wurden über FTIR-ATR-Messungen bestimmt. Die Struktur des Proteins wurde über Elektronenmikroskopie von in Eis eingebetteten 2D-Kristallen untersucht. Die Daten zeigen ein monomeres Barrelprotein mit den Dimensionen und der Sekundärstruktur eines bakteriellen Porins. Durch *peptide mapping* von HVDAC1 in Kombination mit MALDI-MS-Analysen der Fragmente wurde ein Topologiemodell des Porins entwickelt, das dieses als 16-strängiges Porin mit acht relativ langen Loop- und sieben kurzen Turnstrukturen vorschlägt.

---

### Structural Studies of Porins from Pro- und Eukaryotes

The PhD thesis presented describes structural studies of porin Omp32 from *Comamonas acidovorans*, P100 from *Thermus thermophilus* and HVDAC1 and HVDAC2 from *Homo sapiens*. Porins are found in the outer membrane of Gram-negative bacteria and mitochondria. They are pore-forming integral membrane proteins that allow the diffusion of ions and small molecules. A variety of functional measurements describing the properties of this protein class exist but their interpretation is still complicated due to the lack of reasonable structural information. In order to fill this gap data of three structural unknown porins are presented.

The structure of the bacterial porin Omp32 was solved at 2.1 Å by X-ray crystallography using the SIRAS method. The overall architecture of the homotrimeric protein is similar to all known proteins of this class but it shows remarkable differences concerning its pore geometry and surface potential. The data allow the development of new approaches to explain their functional properties based on structural data. The structure shows an anion bound to the pore constriction site that suggests the function of this porin as an anion-specific channel for organic acids. The protein was crystallized in complex with a small periplasmic protein that is supposed to be involved in peptidoglycane binding and it is therefore the first structural indication of such a protein-protein interaction is thereby presented.

Protein P100 is a porin from a thermophilic bacterium that shows three new structural features which are: an unusual big membrane spanning part, a long triple coiled coil stalk and a SLH domain supposed to be involved in peptidoglycane binding. P100 was studied using electron microscopy, atomic force microscopy and FTIR-spectroscopy. Electron micrographs of negatively stained 2D-crystals show three symmetry related pores of 5 - 6 nm in diameter much larger than the diameter known for structural known porins. The pore and the approx. 10 nm long coiled coil domain could be visualized under the atomic force microscope independently using forces image modes. FTIR data of P100 confirm the presence of a high  $\alpha$ -helical content unusual for bacterial porins.

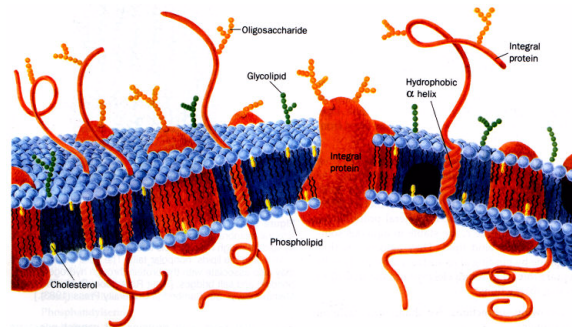
Two human isoforms of the mitochondrial porin were cloned and expressed in *E. coli*. The protein was produced as inclusion bodies and highly efficient procedure for refolding of the protein was developed. The secondary structure content of the refolded samples was determined using FTIR-ATR spectroscopy. The structure of the protein was analyzed using electron microscopy of ice embedded 2D crystals. The data show a monomeric barrel protein with dimensions and secondary structure similar to a bacterial protein. Peptide mapping of HVDAC1 in combination with MALDI-MS lead to the development of a topology model of the porin as a 16-stranded  $\beta$ -barrel protein with eight longer loops and seven small turns.

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einführung

Biologische Membranen bilden die Urform der zellulären Kompartimentierung und ermöglichen eine räumliche Abgrenzung sowie eine autarke Organisation des Stoffwechsels einzelner Zellen und Organellen [Voet & Voet, 1994]. Membransysteme bestehend aus einer hydratisierten Lipidmatrix und integralen sowie peripheren Membranproteinen stellen sehr selektive Permeabilitätsbarrieren des Stoffaustausches dar. Die Durchlässigkeit solcher Membranen für Moleküle verschiedenster Größe hängt dabei sehr stark von den in der Membran integrierten Membranproteinen ab. Neben Rezeptoren, Transportern und Ionenkanälen mit einer hohen Substratspezifität finden sich in pro- und eukaryontischen Membranen Porine mit relativ geringer Selektivität [Engel *et al.*, 1995].

Der schematische Aufbau einer eukaryontischen Modellmembran, bestehend aus Phospholipiden, Glykolipiden, Cholesterin, integralen und in der Membran verankerten Proteinen, ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung einer biologischen Membran bestehend aus Cholesterin, Phospholipiden, Glykolipiden, integralen Membranproteinen und in der Membran verankerten Proteinen [Voet & Voet, 1994].

Im Fall der kleinsten autarken Lebens- und Replikationsform - der bakteriellen Zelle - kann auf Grund der Membranzusammensetzung zwischen Gram-positiven (mit einer Zellmembran) und Gram-negativen Zellen (mit äußerer und innerer Membran) unterschieden werden.

Biologische Membranen stellen teilweise stark deformierbare biologische Systeme dar (z.B. in roten Blutkörperchen), in denen die laterale Diffusion von Lipiden und

Proteinen weitgehend unbeeinflusst voneinander stattfinden kann. In Bakterienzellmembranen hingegen ist die freie Diffusion durch vielfältige Wechselwirkungen zwischen ihren Bestandteilen nur noch eingeschränkt möglich. In der äußeren Membran (AM) Gram-negativer Bakterien kommt es so durch Interaktionen zwischen den Proteinen und dem Lipopolysaccharid, aber auch durch Wechselwirkungen mit dem periplasmatischen Peptidoglykan, zur Bildung einer sehr rigiden Membranstruktur. Das periplasmatische Netzwerk ist funktionell somit in erheblichem Maße für die Stabilisierung und Strukturierung der bakteriellen Zelle verantwortlich [Höltje, 1998].

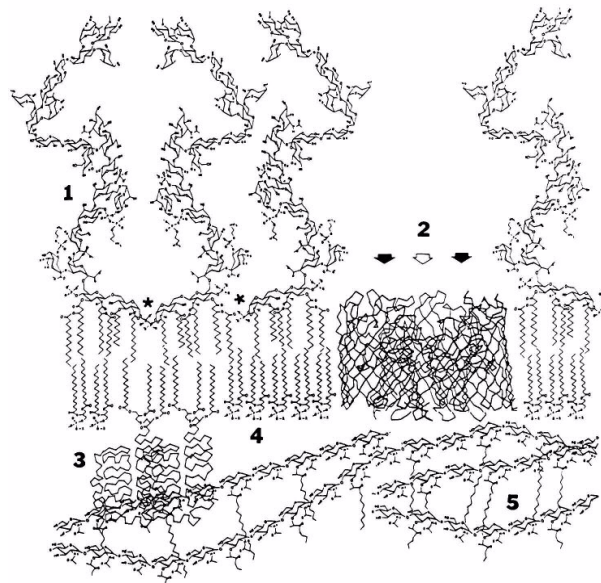
Um die Zelle vor dem Angriff durch Bakteriophagen und Toxinen zu schützen, kann die AM Gram-negativer bzw. die Oberfläche von Gram-positiven Bakterien zusätzlich von einem *surface-layer* (*S-layer*) bedeckt sein, der durch seine Verankerung in der Membran neben einer Schutzfunktion auch eine strukturgebende Funktion besitzen kann [Messner & Sleytr, 1992].

Die äußere Membran vieler Gram-negativer Bakterien zeigt sich - einem Sieb ähnlich - als Filter mit molekularen Dimensionen [Nikaido, 1992]. Ihr asymmetrischer Aufbau aus vier strukturell und funktionell unterschiedlichen biologischen 'Bausteinen' ist - sehr vereinfacht - in Abb. 2 dargestellt. Da sich diese vier 'Bausteine' in vielen bakteriellen Membranen so oder in ähnlicher Form wiederfinden lassen, sollen sie hier kurz beschrieben werden:

- Lipopolysaccharide (1, LPS) stellen stark glykosylierte Lipide dar, deren Zuckerreste, die durch Phosphatgruppen verknüpft sind, negativ geladene Strukturen ausbilden. Diese Lipide befinden sich nur im extrazellulär orientierten Lipidmonolayer und sind oft für das Auftreten einer unkontrollierten Immunantwort im Menschen nach bakterieller Infektion verantwortlich [Medzhitov & Janeway, 1997].
- Der größte Teil der natürlich vorkommenden Lipide gehört zur Gruppe der Phospholipide (4). Diese bilden den periplasmatischen Monolayer der Membrandoppelschicht und damit die Begrenzung des periplasmatischen Raumes.
- Integrale Membranproteine wie z.B. Porin OmpF aus *Escherichia coli* (2) zeigen eine leicht konkave Form, deren breitere Öffnung in den extraplasmatischen Raum weist [Rosenbusch, 1990]. Die laterale Stabilisierung der Proteine in der AM gewährleisten

Wechselwirkungen, die sich zwischen ihrer hydrophoben Außenseite und dem hydrophoben Kern der Membran ausbilden (*hydrophobic effect* und Aromatengürtel). Hinzu kommen Ionen-vermittelte Interaktionen zwischen Porinen wie OmpF und LPS die Ca-vermittelt über Aspartate und Glutamate oder, wie für den integralen Eisenrezeptor FhuA aus *E. coli* gezeigt, auch direkt über einzelne Lysinseitenketten aufgebaut werden [Ferguson *et al.*, 2000].

- Periphere Membranproteine wie das Brown'sche Lipoprotein sind periplasmatisch über ein kovalent gebundenes Lipid in der äußeren Membran verankert (3) und können diese über eine Bindungsdomäne mit dem Peptidoglykan (4) verknüpfen. Ähnliche Bindungsmotive existieren auch in einigen integralen Membranproteinen wie z.B. dem Porin P100 aus *Thermus thermophilus* oder Omp $\alpha$  aus *Thermotoga maritima* [Engel *et al.*, 1992; Olabarria *et al.*, 1996].



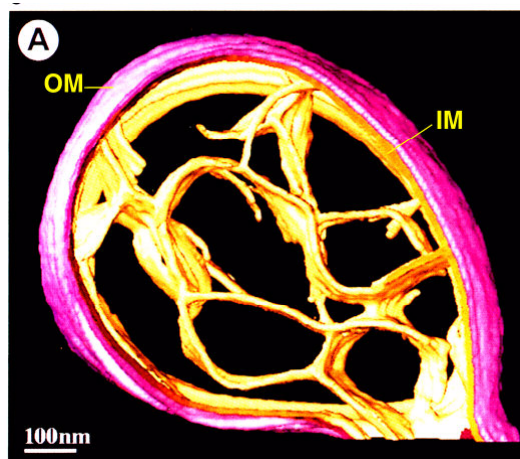
**Abb. 2:** Vereinfachte Darstellung der äußeren Membran von *E. coli*. (1) Lipopolysaccharide, (2) Porin OmpF, (3) Brown'sches Lipoprotein, (4) Phospholipide und (5) Peptidoglykan bilden die 'Bausteine' der Membran. (\*) weist mögliche Bindungsstellen für zweiwertige Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  aus [Hancock *et al.*, 1994].

Auf Grund der evolutionären Verwandtschaft von Gram-negativen Bakterien und den Mitochondrien bzw. Chloroplasten höherer Zellen, findet man auch in diesen Organellen die Struktur der zwei Membranen wieder. Da der Stoffwechsel in eukaryonten Zellen von der Energieproduktion in ihren Mitochondrien abhängt, und darin strukturell die innere (IMM) und äußere (AMM) Membran involviert sind, kommt

es zur Ausprägung einer neuen Membranomorphologie mit stark vergrößerter Oberfläche [Manella, 1998; Nicastro *et al.*, 1999]. Diese ermöglicht dann eine hohe Konzentration des  $F_0F_1$ -ATPase Komplexes und damit eine effiziente ATP-Produktion.

Die äußere Mitochondrienmembran zeigt eine geringere Vielfalt an integralen Proteinen als die verwandte Bakterienmembran. Ein den bakteriellen Porinen entsprechender dominanter Anionen-selektiver Kanal ist VDAC (*voltage-dependent anion channel* oder mitochondriales Porin), der neben dem Austausch von ATP und ADP sowie anderen Metaboliten, durch Interaktionen mit den Proteinen des Cytoplasmas und der inneren Membran, die Zelle energetisch an das Mitochondrium koppelt [Benz, 1994].

Die 3D-Struktur eines Mitochondriums aus *N. crassa* zeigt die Rekonstruktion elektronenmikroskopischer Daten der in Eis eingebetteten Organelle in Abb. 3.



**Abb. 3:** 3D-Rekonstruktion des Mitochondrium aus *Neurospora crassa* [Nicastro *et al.*, 2000]. Die inneren Membranen sind in gelb hervorgehoben. Die äußere Membran und damit die Organellengrenze ist in violett unterlegt.

## Proteine der äußeren Membran

- **Strukturprinzipien**

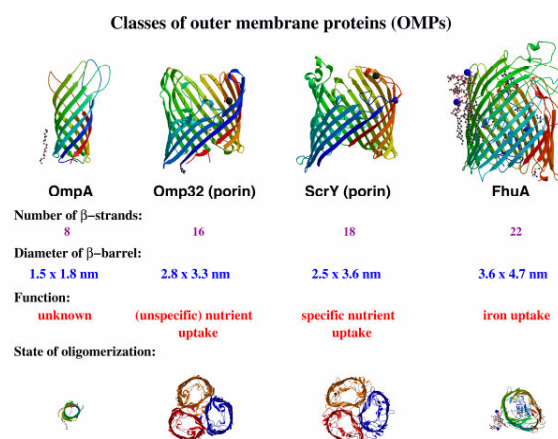
Alle strukturell bekannten Proteine der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und Mitochondrien weisen ein gemeinsames Strukturmotiv auf: das Motiv des  $\beta$ -Barrels, das aus einer geraden Anzahl antiparalleler  $\beta$ -Stränge von amphipathischer Natur gebildet wird. Die  $\beta$ -Stränge zeigen darin eine Nächsteneighbor-Architektur mit einer - innerhalb der Proteinklasse - starken Konservierung der integralen

Membrandomäne und einer hohen Variabilität der extrazellulären Domänen. Für die bakteriellen Porine ist dieses Strukturprinzip in einer homotrimeren  $\beta$ -Barrel Architektur verwirklicht und nicht zuletzt durch zehn Röntgenstrukturen bestätigt worden [Weiss *et al.*, 1991; Cowan *et al.*, 1992; Kreuzsch *et al.*, 1994; Schirmer *et al.*, 1995; Breed *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1997; Forst *et al.*, 1998; Pautsch *et al.*, 1998; Schirmer *et al.*, 1999; Zeth *et al.*, 2000]. Im Gegensatz zu dieser Architektur weisen die Proteine der inneren oder cytoplasmatischen Membran einen Aufbau ausschließlich durch  $\alpha$ -Helices auf.

Strukturen mitochondrialer Proteine der AM liegen bislang nicht bei hoher Auflösung vor. Trotzdem deuten alle experimentelle Befunde der FTIR- und CD-Spektroskopie an mitochondrialen Porinen und TOM40, der integralen Membrandomäne des Proteinimportsystems, auf eine Struktur gebildet aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern hin [Shao *et al.*, 1996; Hillet *et al.*, 1998; Engelhardt, persönliche Mitteilung].

#### • Strukturklassen der äußeren Membran

Die bakteriellen Proteine der äußeren Membran lassen sich entsprechend ihrer molekularen Architektur in fünf Klassen einteilen: die Klasse der 8-, 12-, 16-, 18- und 22-strängigen  $\beta$ -Barrel. Unten aufgeführtes Schema zeigt eine Zusammenstellung vier dieser Klassen samt der Struktur jeweils eines Vertreters.



**Abb. 4:** Vier Klassen von Proteinen der äußeren Bakterienmembran können an Hand der Zahl ihrer  $\beta$ -Stränge unterschieden werden. Ein Vertreter jeder Klasse ist aufgeführt. Die Anzahl der  $\beta$ -Stränge, der Durchmesser des  $\beta$ -Barrel, die Funktion der Proteinklasse und deren Oligomerisationsgrad ist angegeben. Der angegebene Durchmesser des  $\beta$ -Barrels entspricht der  $C_{\alpha}$  -  $C_{\alpha}$  Distanz zweier gegenüber liegender  $C_{\alpha}$ -Atome. Die Strukturen sind, beginnend an ihrem N-Terminus, von blau nach rot koloriert.



- Zur Familie der kleinsten integralen Membranproteine der AM, den 8-strängigen Barrelproteinen, [Voigt & Schulz, 1999; Pautsch & Schulz, 2000] werden entsprechend ihrer Homologie eine Vielzahl von Proteinen unterschiedlichster Bakterien gezählt [Baldermann *et al.*, 1999]. Der Innendurchmesser des kleinen  $\beta$ -Barrels ist jedoch sehr eng, sodass eine in der Literatur beschriebene Transportfunktion von Ionen und hydrophoben Substraten als sehr unwahrscheinlich erscheinen muss [Sugawara & Nikaido, 1992; Pautsch & Schulz, 1998]. Die generelle Funktion dieser Subklasse von Proteinen ist unter anderem auch deshalb noch nicht bekannt, einigen Vertretern wird jedoch eine Funktion in der Zelladhäsion von Bakterien zugeschrieben [Bhat *et al.*, 1991; van der Ley, 1993].
- Ein integrales Membranprotein mit enzymatischer Aktivität ist die 12-strängige Phospholipase OMPLA aus *E. coli* [Snijder *et al.*, 1999]. OMPLA zeigt eine oligomerisations-abhängige Aktivierung seiner enzymatischen Aktivität nach Dimerisierung. Auch TolC aus *E. coli* kann entsprechend seiner aus 12  $\beta$ -Strängen gebildeten integralen Membrandomäne zu dieser Klasse gezählt werden. Das Barrel mit einer inneren 120°-Symmetrie wird hier jedoch aus den Domänen dreier identischer Proteine gebildet. TolC ist in der *E. coli*-Zelle für den Export von kleineren Molekülen und Proteinen verantwortlich [Koronakis *et al.*, 2000].
- Als strukturell und funktionell am besten charakterisierte Proteingruppe gilt die der 16-strängigen unspezifischen Porine. Das Porin aus *Rhodobacter capsulatus* war das erste Porin seiner Klasse und der äußeren Membranproteine überhaupt, dessen Struktur bei atomarer Auflösung bestimmt werden konnte [Weiss *et al.*, 1991].
- Die Klasse der 18-strängigen spezifischen Porine ist von ihren funktionellen Aspekten her sicherlich die interessantere, da hier eine Beziehung zwischen Struktur und Funktion deutlicher hervortritt. So konnten beispielsweise in mittlerweile zwei Porinstrukturen definierte Substrat-Bindungsstellen nachgewiesen werden [Schirmer *et al.*, 1995; Meyer & Schulz, 1997; Forst *et al.*, 1998].
- Die Strukturen der Eisen-spezifischen monomeren Rezeptoren FepA und FhuA aus *E. coli* gehören zur Klasse der 22-strängigen Proteine. Die Strukturen im Komplex mit ihren Substraten vermitteln einen Eindruck von der Geometrie eines Proteins, dessen Anforderungen an seine Funktionalität sehr strikt sind. Im Gegensatz zu den Porinen zeigen diese Rezeptoren keinerlei Leitfähigkeit in planaren Membranen, eine Tatsache, die erst anhand der Röntgenstruktur schlüssig erklärt werden konnte. Die Architektur des Barrels ist den Porinen zwar sehr ähnlich,

jedoch wird die große Pore durch eine nach innen faltende Domäne - einem molekularen Korke gleich – völlig verschlossen [Ferguson *et al.*, 1998, Locher *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 1999].

In der Zellwand aller Gram-negativen Bakterien dominiert die Proteinklasse der unspezifischen Porine [Nikaido *et al.*, 1976] und eine Vielzahl von strukturellen und funktionellen Arbeiten zu deren Charakterisierung existieren in der Literatur. Im Folgenden soll deshalb, in das Thema dieser Arbeit einführend, ein Überblick über den aktuellen Stand der Forschung auf dem Gebiet gegeben werden.

## **1.2 Spezielle Einführung**

### **1.2.1 Porine der AM Gram-negativer Bakterien**

Die Definition der *Porin* tritt 1976 zum ersten Mal in der Literatur auf und wurde zur Charakterisierung von oligomeren, mit Wasser gefüllten, integralen Proteinkomplexen der äußeren Membran verwendet [Nikaido *et al.*, 1976]. Dadurch wurde in der Literatur erstmals ein Kanal mit einem Durchmesser beschrieben, der die Permeabilitätsbarriere der AM aufzuheben vermochte. Porine stellen in *E. coli* mit einer Anzahl von  $10^5$  Kopien pro Zelle und mehr zahlenmäßig den Hauptteil der Proteine in dieser Membran [Rosenbusch, 1974]. Das Molekulargewicht eines monomeren Porins schwankt, liegt jedoch für unspezifische Porine bei 30 - 40 kD, für spezifische zwischen 30 und 50 kD [Welte *et al.*, 1995].

Strukturell lassen sich Porine in die Klassen der 16- und 18-strängigen, funktionell in unspezifische und spezifische Kanäle einteilen. Die beiden Klassen zu Grunde liegende Architektur unterscheidet sich strukturell weitgehend nur in der Anzahl ihrer  $\beta$ -Stränge. Funktionell liegen die Unterschiede vor allem in einer definierten Substrataffinität der spezifischen Porine. Beiden Klassen gemeinsam ist ihr homotrimerer Aufbau, ihre hohe Stabilität gegenüber aggressiven Detergentien wie SDS und hohen Temperaturen [Nakae *et al.*, 1979; Kreusch *et al.*, 1991].

## Unspezifische Porine

Der Aufbau der unspezifischen Porine weist auf mehrere konservierte Bauprinzipien hin. Die Struktur basiert auf einer Barreleanordnung mit einer zur Membran gekehrten hohen hydrophoben Barrelwand und niedrigen Dimer- bzw. Trimerkontaktflächen. N- und C-Terminus liegen - mit Ausnahme von OmpF und PhoE - zugänglich auf der periplasmatischen Seite. Die 16  $\beta$ -Faltblätter werden durch acht Loops unterschiedlicher Länge und sieben Turns (im Fall von OmpF und PhoE acht) mit den benachbarten Monomeren verbunden. Der Anteil von  $\beta$ -Faltblatt an der Sekundärstruktur beträgt in bakteriellen Porinen etwa 65%, der  $\alpha$ -helicale Anteil liegt bei 5 - 10% [Gerbl-Rieger *et al.*, 1992]. Funktionell stellen die acht extrazellulären Loops in einigen Porinen Bindungsstellen für Bakteriophagen und Colicin dar [Dover *et al.*, 2000]. Die Loopstrukturen mehrerer Porine aus human-pathogenen Bakterien wie z. B. aus *N. meningitidis* spielen in der Epitoperkennung durch Antikörper bei verschiedenen Immunerkrankungen eine wichtige Rolle [Cartwright, 1995]. Der längste Loop L3 faltet in allen Porinen vom Barrel kommend auf halber Wandhöhe in die Pore und zurück und trägt dadurch maßgeblich zu der Porenverengung bei. Der daraus resultierende minimale Porendurchmesser beträgt in manchen Porinen weniger als 1 nm und limitiert so die Diffusion von Molekülen durch die Pore [Nikaido, 1992; Zeth *et al.*, 2000].

## Spezifische Porine

Spezifische Porine sind Teil eines komplexen zellulären Apparates zur gezielten Aufnahme von Nährstoffen aus dem umgebenden Medium. Sie ermöglichen dabei den ersten Schritt der Aufnahme durch passive Diffusion. Beispiele für derartige Aufnahmeapparate stellen das PTS-System für Glukose [Schmid *et al.*, 1991] oder das Maltoseaufnahmesystem dar [Ehrmann *et al.*, 1998]. Die Substratazeptanz der Porine ist meist weniger strikt und reicht z.B. für LamB von Mono-, Di- und Oligosacchariden (z.B. in LamB, ScrY) über Nukleotide bis hin zu kleinen Anionen [Poole *et al.*, 1987].

Die 3D-Strukturen der Maltoporine aus *E. coli* und *S. typhimurium* sind bekannt. Beide zeigen eine Substratpräferenz für Maltoside (Mono - Tetrasaccharid), während ScrY, das spezifische Porin aus *S. typhimurium*, Sucrose bevorzugt, jedoch auch

weitere Disaccharide bindet und transloziert [Schirmer *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1997; Forst *et al.*, 1998]. Spezifische Porine unterscheiden sich in ihrer Funktion von unspezifischen vor allem durch ihre Substratbindungsstellen mit Bindungskonstanten von  $\sim 100 \mu\text{M}$ . Die Substratbindung und Translokation erfolgt vermutlich in der Porenengstelle durch eine so genannte `Substratrutsche`, die im Porin strukturell durch die vertikale Anordnung (dem Porendurchgang entlang) mehrerer aromatischer Säureseitenketten verwirklicht wird.

Außer den homotrimeren spezifischen Porinen existiert mit CymA aus *Klebsiella oxytoca* auch ein monomeres Vertreter dieser Klasse mit noch unbekannter Struktur, dessen Gen in einem Operon identifiziert wurde, das den Transport von Cyclodextrinen über die AM ermöglicht [Pajatsch *et al.*, 1999].

### 1.2.2 Porine in pathogenen Bakterien

Unspezifische Porine erlangen in letzter Zeit eine wichtige Bedeutung durch experimentelle Hinweise auf ihre Mitwirkung in bakterieller Pathogenität. Diese wurde für die Porine der *Neisserien* beschrieben. Dabei wird zum Beispiel die Induktion von Apoptose in T-Lymphozyten durch das Porin aus *Neisseria gonorrhoe* diskutiert [Müller *et al.*, 1999]. Für PorB aus *N. meningitidis* wurde die Auslösung von Gehirnhautentzündung nach einer unkontrollierten Immunantwort durch Antikörperbildung gegen Epitope des Porins beschrieben [Cartwright, 1995]. Daneben wurde aber auch eine Wechselwirkung des Porins mit dem mitochondrialen Porin VDAC nachgewiesen, die wiederum anti-apoptotische Wirkung hat und dadurch die B-Zellaktivierung verstärkt [Massari *et al.*, 2000].

### 1.2.3 Porine in Mitochondrien

Ähnlich der AM Gram-negativer Bakterien ist auch die AM von Mitochondrien (AMM) für kleine Substanzen frei permeabel [Benz, 1994]. Die Diffusion wird hier von dem mitochondrialen Porin oder auch spannungs-abhängigen Anionenkanal (VDAC) vermittelt, ein hinsichtlich seiner strukturellen und funktionellen Eigenschaften den bakteriellen Porinen sehr ähnlicher Vertreter. Das mitochondriale Porin ist - in Analogie zu den bakteriellen Porinen - mit ca. 20% des Gesamtproteingewichtes das dominante Protein in der AM [Mannella, 1998].

VDAC zeigt im Gegensatz zu den bakteriellen Porinen strukturell ein komplexes Geflecht aus Wechselwirkungen mit Proteinen des Cytoplasmas, des mitochondrialen Intermembranraums und der inneren Mitochondrienmembran (IMM) [Adams *et al.*, 1991; Bühler *et al.*, 1998]. VDAC bildet stabile Komplexe mit dem *adenine nucleotide translocator* (ANT) der IMM und formt zusammen mit diesem einen isolierbaren stabilen Kanal [McEnery, 1992]. Weitere Komplexe von VDAC und ANT mit Kreatinkinase des Intermembranraums sowie cytoplasmatischer Hexokinase und Glycerinkinase konnten ebenso isoliert und funktionell charakterisiert werden [Adams *et al.*, 1991; Beutner *et al.*, 1997]. Die Aktivierung der cytoplasmatischen Kinasen unter Bindung an VDAC *in vivo* weist auf eine sehr geschickte zelluläre Nutzung des mitochondrial produzierten ATPs hin.

Neben seiner Rolle als ATP/ADP-Austauschkanal wird VDAC in letzter Zeit auch eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Apoptosevorgängen zugeschrieben [Shimizu *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2000]. In der Regulation des Zelltodes ausgehend von Mitochondrien übernehmen dabei die pro- und anti-apoptotischen Regulatoren Bax und Bcl-2 durch ihre Regulation von VDAC und ANT eine zentrale Rolle [Van der Heiden & Thompson, 1999; Crompton, 1999].

Das Auftreten von VDAC in der cytoplasmatischen Membran von B-Lymphozyten und Skelettmuskelzellen des Rindes [Kayser *et al.*, 1989; Reyman *et al.*, 1995] sowie in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums [Kawano *et al.*, 1999] deutet auf eine multi-topologische Expression und Funktion des Proteins hin.

#### **1.2.4 Porine in Chloroplasten**

Entsprechend der evolutionären Nähe von Chloroplasten und Mitochondrien war die Existenz der mit Wasser gefüllten Poren auch in der äußeren Chloroplastenmembran vorhergesagt worden. Mit OEP24 isoliert aus den Chloroplasten der Erbse, wurde das VDAC-Analogon erstmals als Kationen-selektiver Kanal mit einem durch Leitfähigkeitsmessungen bestimmten Durchmesser von etwa 2,5 nm identifiziert [Rohl *et al.*, 1999; Pohlmeier *et al.*, 1998]. Dieser Kanal zeigt neben einer starken Sequenzähnlichkeit zu der humanen Isoform HVDAC1 auch strukturell (z. B. Durchmesser und Hydropathieplots) und funktionell (Schließereignisse etc.) signifikante Ähnlichkeiten zu der Klasse der mitochondrialen Porine.

### 1.2.5 Funktionelle Charakterisierung von Porinen

Die Permeation von Substraten durch Porine und über die äußere Membran hinweg sowie die Wirkung von Antibiotika auf Zellen oder der Einfluss von Mutationen auf die Funktion von Porinen kann *in vivo* mit Hilfe von folgenden Methoden untersucht werden:

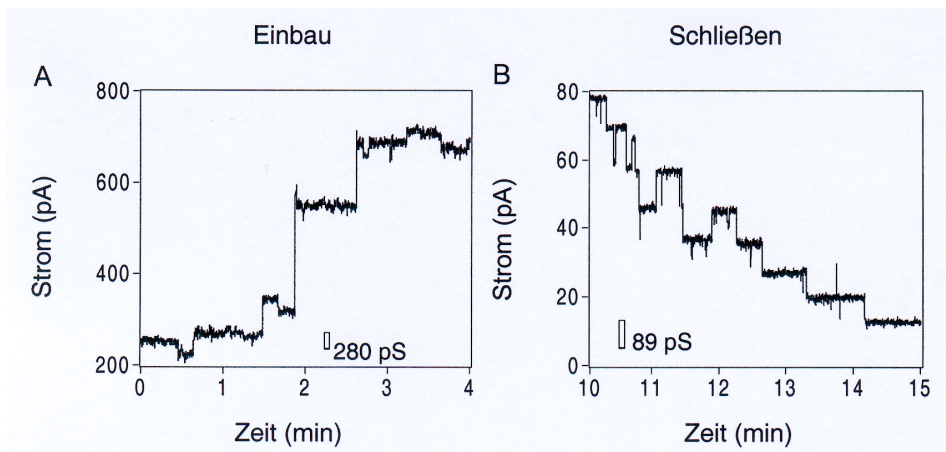
- Aufnahmetest radioaktiv markierter Substanzen [Szmelcman & Hofnung, 1975]
- $\beta$ -Laktamasetest [Sawai *et al.*, 1977]
- Untersuchungen des Zellwachstums von Mutanten

*In vitro* werden Porine durch ihre Leitfähigkeit in planaren oder in sogenannten Liposomen-Schwellungsassays nach Rekonstitution in Lipiden untersucht [Benz, 1994].

#### Leitfähigkeitsmessungen

Durch Leitfähigkeitsmessungen wird nach Bildung einer Membrandoppelschicht zwischen zwei Elektrolytlösungen ein minimaler Stromfluss (Leckfluss) gemessen, dessen Wert sich nach Zugabe von kleinen Mengen an Porin in eine oder beide Elektrolytkammern durch das langsame und stufenweise Ansteigen der Leitfähigkeit dokumentiert. Derartige Einbauereignisse sind in der unten aufgeführten Abb. 5A für Omp32 aus *C. acidovorans* dargestellt. In Abb. 5B ist das stufenförmige Schließen der in die Membran inserierten Porine nach Anlegen einer höheren Spannung gezeigt. Dieses Phänomen tritt, abhängig von den untersuchten Porinen, meist erst bei Spannungen zwischen 100 - 200 mV auf und ist auf molekularer Ebene noch nicht verstanden.

Wie aus den unterschiedlichen Stufenhöhen in Abb. 5A hervorgeht, können die aufgezeichneten Einsprungereignisse einem einzelnen Porintrimer oder auch einem Porincluster entsprechen. Da die Messungen unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden können, kann darüber die Leitfähigkeit in Abhängigkeit bestimmter Parameter wie Ionenstärke und pH ermittelt werden. Über den gemessenen Stromfluss und die Stufenhöhe kann prinzipiell sogar der Durchmesser des untersuchten Porins abgeschätzt werden [Benz, 1994].

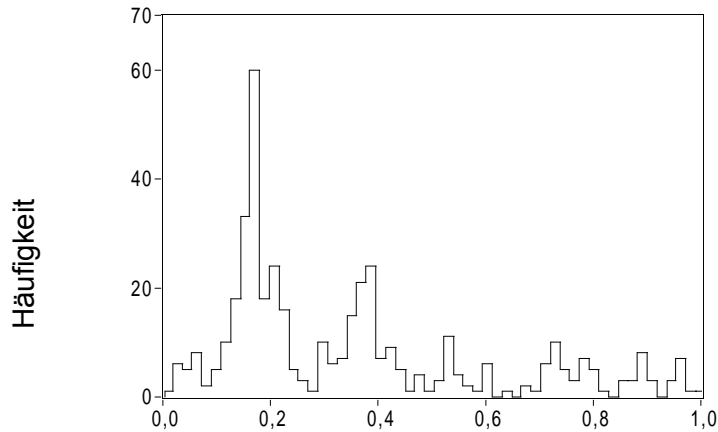


**Abb. 5:** Typische Einbauereignisse von Omp32 bei einer Elektrodenspannung von 100 mV. Der vertikale Balken entspricht der Leitfähigkeit eines einzelnen Trimers. (A) Einbaustufen von Clustern aus einem und mehreren Porinen sowie einige Öffnungs- und Schließereignisse, bei 300 mM KCl. Aufgrund der Gesamthöhe der Leitfähigkeit lassen sich etwa 40 Porine in der Membran ausmachen. (B) Bei höheren Spannungen von etwa 100 mV zeigen Porine überwiegend Schließereignisse. Diese wurden bei 30 mM KCl für 8 s in der Membran befindenden Porine aufgezeichnet.

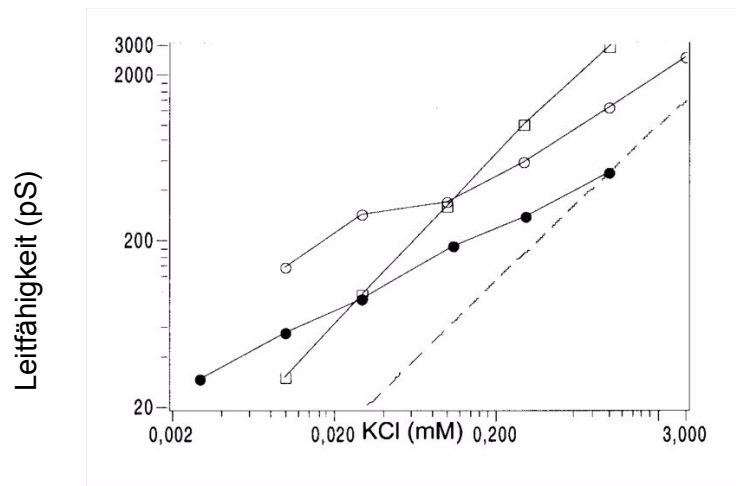
Durch die Variation von An- und Kationen, deren Ladung sowie Konzentration in Lösung können Wechselwirkungen mit der geladenen Oberfläche der Pore verändert werden. Insbesondere durch die Erhöhung der Salzkonzentration kann die Leitfähigkeit in manchen Porinen aus einem nicht-linearen in einen linearen Leitfähigkeitsbereich verschoben werden. Für spezifische Porine kann zusätzlich der Einfluss von Substraten wie Zuckern nach deren Zugabe in Lösung getestet werden und im Idealfall über Titrationsexperimente die Bindungskonstante des Porins für ein Substrat bestimmt werden [Benz *et al.*, 1986].

Neben den oben erwähnten Parametern kann über Gradientenexperimente die Selektivität eines Porins bestimmt werden [Mathes & Engelhardt, 1998].

Trägt man die Leitfähigkeit eines Porins in einem doppelt logarithmischen Schaubild gegen die Salzkonzentration auf und vergleicht diese mit der Leitfähigkeit einer idealen Pore, so ergeben sich Geraden, deren Steigung voneinander abweicht. Die Stärke der Abweichung, wie z.B. für Omp32 und Omp34 aus *Acidovorax delafieldi* zu beobachten, gibt einen Anhaltspunkt zur Bestimmung der Wechselwirkung der Ionen in Lösung und der Porenoberfläche [Mathes & Engelhardt, 1998]. Im Vergleich zu diesen zeigt das Porin aus *R. capsulatus* einen geringen Einfluss der Konzentration der Ionen in Lösung und die Leitfähigkeit verhält sich ähnlich der einer idealen Pore [Mathes & Engelhardt, 1998].



**Abb. 6:** Leitfähigkeitsverteilung von Omp32 bei 100 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3. Die größte Häufigkeit eines mehrmals gemessenen Leitfähigkeitsereignisses liegt bei  $0,18 \pm 0,03$  nS und entspricht der Leitfähigkeit eines Porintrimers. Die weiteren Stufen entsprechen dem Einbau von Clustern aus zwei und mehr Porinen.



**Abb. 7:** Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Salzkonzentration für die Porine Omp32 (●), Omp34 [Brunen et al., 1991; Brunen, 1992] (○) und dem Porin von *R. capsulatus* [Przybylski et al., 1996] (□), sowie (unterbrochene Linie) einer berechneten Pore mit drei Kanälen mit je 3,4 Å Durchmesser und 6 nm Länge und Leitfähigkeitseigenschaften einer KCl-Lösung.

## Der Liposomen-Schwellungsassay

Der Liposomenassay (LSA) basiert auf der Bildung von Protein-Lipidvesikeln, in die ein nicht diffusibles Polymer eingeschlossen wird, das nach Zugabe einer permeablen Substanz von außen einen osmotischen Druck vermittelt und dadurch die Liposomen zur Schwellung bringt [Benz, 1994]. Über die Bestimmung der optischen Dichte der Lösung kann die Schwellung und damit der Transport über die Vesikelmembran direkt nachgewiesen werden. Mittels des LSA lassen sich so zusätzlich zu der Aufnahmegeschwindigkeit von Substraten z.B. auch die Ausschlussgröße eines Porins durch Variation der Substrate bestimmen.



## **Ziel der Arbeit und Motivation**

1. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die aus Leitfähigkeitsmessungen vorhandenen Funktionsdaten von Omp32 aus *C. acidovorans* mit Strukturdaten hoher Auflösung zu verknüpfen, um dadurch einen Beitrag zum besseren Verständnis bakterieller Porine zu leisten.

2. Da alle strukturell bekannten Porine auf einem sehr ähnlichen Architekturprinzip beruhen, wurden zwei weitere Systeme Poren-bildender Proteine gewählt und neue Fragen bezüglich deren Struktur motive adressiert. Porin P100 aus *T. thermophilus* und der spannungs-abhängige Anionenkanal (VDAC) aus Mitochondrien wurden gewählt und mittels FTIR, Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie untersucht, um zu neuen Strukturdetails dieser sich insgesamt sehr heterogenen darstellenden Proteingruppe und funktionell noch wenig verstandenen Proteinklasse zu gelangen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und Methoden zu Omp32 und dem 54-AS-Peptid

#### 2.1.1 Isolierung und Reinigung des Porin-Peptid-Komplex

Omp32 aus *C. acidovorans* ließ sich in großen Mengen direkt aus der *S-layer* defizienten Mutante JL-0 gewinnen. Der Stamm wurde hierzu im 50 l-Fermenter bei 30°C in Komplexmedium (1% Bacto Tryptone, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 0,1% Glukose, pH 7) angezogen. Nach dem Erreichen der stationären Phase, wurden die Zellen via Durchflusszentrifuge geerntet und in Zellaufschlusspuffer OZ1 resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer *Frech press* aufgeschlossen. Die dadurch erhaltene Suspension wurde für 30 min bei 4°C und 48000 x *g* abzentrifugiert und der klare Überstand verworfen. Das Membranpellet, bestehend aus ca. 3 g Rohmasse, wurde in 50 ml Waschpuffer OW1 aufgenommen und durch intensives Pottern homogenisiert. Ein zweiter Zentrifugationsschritt für 30 min bei 4°C und 48000 x *g* schloss sich an. Das Pellet wurde dann noch zwei weitere Male in Puffer OW1 aufgenommen, homogenisiert und wie oben beschrieben zentrifugiert.

Der Extraktions- bzw. Solubilisierungsschritt schloss direkt an obige Prozedur an. Das Membranpellet wurde dazu in 100 ml Puffer OE1 aufgenommen und durch Pottern wie beschrieben homogenisiert. Die Lösung wurde danach für 60 min bei 30°C unter Rühren oder Schütteln inkubiert und dann bei 100000 x *g* für 30 min zentrifugiert. Der größte Teil der Proteine der AM befand sich danach im Überstand, dessen Konzentration über den Absorptionskoeffizienten OD<sub>280</sub> bestimmt wurde. Zur Vorbereitung für die beiden nachfolgenden Chromatografieschritte wurde die Lösung zweimal für 24 h bei 10°C gegen das 100-fache Puffervolumen von OE2 dialysiert.

Beide Chromatografieschritte wurden bei RT an einem Gradifrac-System (Pharmacia) mit *fast flow*-Gelmaterialien durchgeführt. Der erste Reinigungsschritt bestand in einer Gelfiltration über Sephadex-300-Material (Pharmacia), das vor der Probenauftragung (mit ca. 1/100 des Säulenvolumens) mit dem 5-fachen Säulenvolumen des Puffers OE2 äquiliert wurde. Für die Probenauftragung und die Chromatografie wurde eine Flussrate von 0,5 - 1 ml/min gewählt. Die Elution des Proteins wurde bei OD<sub>280</sub> verfolgt und die Reinheit der einzelnen Fraktionen über

SDS-PAGE geprüft. 5 - 10 µg des Proteins wurden dafür nach der Methode von Wessel und Flügge gefällt [Wessel & Flügge, 1984], in SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 100°C für 10 min erhitzt. Die Proben wurden über SDS-PAGE auf 10%-Gelen (entsprechend der Methode von Schägger) ihrer Masse nach getrennt [Schägger *et al.*, 1994]. Fraktionen mit mehr als 80% Omp32 am Gesamtprotein wurden vereinigt und direkt für den nächsten Chromatografieschritt verwendet.

Der zweite Chromatografieschritt wurde bei RT über eine Q-Sepharose Säule (Pharmacia, HiLoad™16/10) ausgeführt. Die Säule wurde mit dem dreifachen Säulenvolumen von Puffer OA1 äquiliert und das Protein dann bei einer Flussrate von 1 - 2 ml/min aufgetragen. Unspezifisch gebundenes Protein wurde mit 50 mM NaCl in OA1 von der Säule entfernt. Nach Anlegen eines Gradienten von 50 - 500 mM NaCl in Puffer OA1 konnte das gebundene Protein eluiert werden. Die Reinheit wurde, wie oben beschrieben, über SDS-PAGE ermittelt. Fraktionen in denen Omp32 dominant (> ~ 95%) enthalten war, wurden vereinigt und über Ultrafiltration (Membranen der Ausschlussgrenze 30 kD) auf eine Konzentration von 10 - 20 mg/ml eingeeengt, bevor eine Dialyse gegen Puffer OD1 angeschlossen wurde.

### **2.1.2 Reinigung und Sequenzierung des 54-AS Peptids**

Die Reinigung des 54-AS-Peptides wurde an dem HPLC-System SMART (Pharmacia, SMART™) durchgeführt. Eine C18-Säule (Pharmacia, µRPC C2/C18, SC2,1/10) wurde mit dem 5-fachen Säulenvolumen von Puffer PC1 äquiliert. 200 µl des gereinigten Protein-Peptid-Komplexes (siehe Abschnitt 2.1.1) mit einer Konzentration von 5 - 10 mg/ml in Puffer OD1 wurden mit einer Flussrate von 100 µl/min auf die Säule aufgetragen. Unspezifisch gebundenes Protein wurde danach mit Puffer 10% Acetonitril in PC1 von der Säule gewaschen. Protein und Peptid konnten über einen Gradienten von 10 - 100% Acetonitril in Puffer PC1 eluiert und fraktioniert werden. Die Peptidproben in Puffer PC1 wurden direkt für die Edman-Sequenzierung und Massenanalyse über MALDI-MS verwendet.

Die Sequenz des Peptids wurde durch eine Kombination aus Aminosäuresequenzierung und MALDI-MS bestimmt. Der N-terminale Bereich des Peptides wurde nach enzymatischer Deblockierung durch Pyroglutamat-Aminopeptidase über Edman-Abbau ermittelt. Weitere Abschnitte der Sequenz

wurden nach proteolytischem Abbau des 54-AS-Peptids durch Trypsin und Chymotrypsin vervollständigt. Die nach Peptidspaltung erhaltenen Fragmente wurden über eine, für die analytische Auftrennung von kleinen Peptidenmengen gegossene, C18-Säule durch einen 0 - 100% Gradienten von Essigsäure getrennt und dann sequenziert. Durch überlappende Sequenzabschnitte der tryptischen und chymotryptischen Peptide sowie durch Datenbankvergleiche der Peptidsequenzen, konnte letztlich die gesamte Sequenz auf Aminosäurebasis zusammengesetzt werden. Das MW aller sequenzierten Peptide wurde durch MALDI-MS verifiziert.

### **2.1.3 Chemische Modifikation von Omp32 durch Succinylierung**

Die Succinylierung von Omp32 wurde in Analogie zu einem Experiment von Schnaible *et al.* durchgeführt [Przybylski *et al.*, 1996]. Die Proteinlösung mit einer Ausgangskonzentration von etwa 10 mg/ml in Puffer OD1 wurde dafür mit der 10-fachen Menge von Puffer OS1 verdünnt. Die Succinylierung wurde bei RT in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß im Mikromaßstab unter Rühren nach Durchmischen der Proteinlösung mit Succinanhydrid (SA) in trockenem DMSO (100 mg/ml) gestartet. Das molare Verhältnis von Lysin-Gruppe des Proteins zu SA wurde wie folgt variiert: 2:1 (Probenname: S05), 1:1 (S1), 1:2 (S2) 1:10 (S10), 1:50 (S50) und 1:100 (S100). Im Fall der Reaktandenverhältnisse von 1:10 bis 1:100 wurde SA im zeitlichen Abstand von etwa 2 min in drei äquivalenten Mengen zugegeben. Mit Hilfe eines pH-Stat wurde durch Zugabe von kleinen Mengen an 0,1 M NaOH oder 0,1 M HCl der pH-Wert von 6,5 konstant gehalten. Nach ca. 30 min wurde die Reaktion durch Dialyse der Lösung für 12 h bei 4°C gegen Puffer OD1 gestoppt und die Proben für FTIR-Spektroskopie und dynamische Lichtstreuung (DLS) eingesetzt.

Für 3D-Kristallisationsversuche der succinylierten Proteinprobe wurde deren Konzentration über kleine Ultrafiltrationszellen (Amicon, 30 kD Membranen) auf eine etwa 10 mg/ml eingestellt und für 24 h bei RT gegen Puffer OK1 dialysiert.

### **2.1.4 Bromcyan- und Trypsinabbau**

Für die chemische Proteinspaltung nach Methioninen durch Bromcyan wurden jeweils 25 µg von Omp32 und den succinylierten Derivaten (S05, S1, S2, S10, S50 und S100) in Puffer OD1 mit jeweils 5,7 mg Guanidiniumhydrochlorid und 1,3 µl TFA

versetzt und gut durchmischt. Zu dieser Lösung wurden 100 nl 5 M BrCN in Acetonitril gegeben, entsprechend einem molaren Überschuss von 350 an BrCN zu Methioningruppe. Die Spaltung wurde für 24 h bei RT unter Lichtausschluss durchgeführt und die Massen über MALDI-MS bestimmt.

Die enzymatische Spaltung von Omp32 und allen Succinylderivaten (S05 - S100) erfolgte durch Trypsin. Für die Spaltung wurden 50 µl der Proben mit einer Proteinkonzentration von 1 - 2 µg/µl in Puffer OT1 mit 12 mg Harnstoff versetzt (Endkonzentration: 4 M) und für 5 min bei 100 Grad erhitzt. Nach dem Erkalten der Lösung wurden 50 µl einer 100 mM Ammoniumcarbonatlösung zugegeben und die Probe gut durchmischt. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 2,5 µl einer frisch präparierten Trypsinlösung (1 µg/µl) gestartet und die Lösung bei 37°C inkubiert. Nach vier Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl TFA gestoppt und alle Proben bei -20°C eingefroren. 1 µl des Abbaugemisches wurde für die Messung von MALDI-Gemischspektren verwendet, während die restliche Lösung zur Auftrennung und Reinigung der Peptide über RP-HPLC (C18-Säule) eingesetzt wurde.

### 2.1.5 FTIR-Spektroskopie

200 µg von Omp32 und S100 wurden für 24 h bei RT gegen Puffer OF1 dialysiert und dann für 30 min in einer Airfuge (Beckman, Airfuge) bei 160000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen Ge-Kristall aufgebracht, dessen Oberfläche vorher dafür durch Glimmentladung unter reduziertem Druck ( $10^{-3}$  bar) benetzbar gemacht wurde. Das Lösungsmittel wurde langsam im Stickstoffstrom verdampft und der Kristall dann im Lichtweg des Spektrometers justiert. Die gesamte Messzelle wurde vor Aufnahme der Probenspektren so lange mit wasserfreien N<sub>2</sub> gespült, bis die Absorptionsbanden von CO<sub>2</sub> (bei 2350 cm<sup>-1</sup>) und Wasser (bei 1650 cm<sup>-1</sup>) im Spektrum nicht mehr nachzuweisen waren. 512 oder 1024 Einzelspektren des Ge-Kristalls vor Probenauftragung wurden aufgenommen, gemittelt und als Referenzsignal abgespeichert. Das eigentliche Probensignal wurde dann nach Sammlung der gleichen Zahl von Spektren und deren Mittelung nach Subtraktion des Referenzsignals bestimmt. Zur späteren Abschätzung der relativen Sekundärstrukturanteile, wurde die mit Protein beladene Ge-Kristalloberfläche einem Strom von N<sub>2</sub>-Gas ausgesetzt, der mit D<sub>2</sub>O-Dampf gesättigt war. Der dadurch bedingte H-D-Austausch bewirkte eine Verschiebung der Absorption im Amid-I-

Spektralbereich, die einfach ausgewertet werden kann [Arrondo *et al.*, 1993]. Die qualitative Auswertung von Sekundärstrukturanteilen wurde durch Bandenformanalyse der Amid-I-Bande vorgenommen.

### 2.1.6 Analyse der Proben über MALDI-MS

Die Präparation der Proben für MALDI-MS erfolgte, indem im ersten Schritt die aus  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure (1  $\mu$ l HCCA-Lösung in 2:1 Acetonitril/0,1% TFA) bestehenden Matrix auf der Targetoberfläche aufgebracht und an Luft kristallisiert wurde. Im zweiten Schritt wurde eine wässrige Mischung aus Matrix und Protein im Verhältnis 1:1 (Proteinkonzentration ca. 5 mg/ml) hinzugefügt und an Luft co-kristallisiert (*dried droplet*-Methode). Bis zu 26 Proben konnten so auf der Targetoberfläche präpariert werden. Proteinproben mit einer hohen Detergengkonzentration wurden nach Mischung der Proben- mit Matrixlösung für 5 - 10 min im Ultraschallbad inkubiert und erst dann auf der Targetoberfläche präpariert. Alternativ dazu konnten die Proben aber auch wie oben beschrieben präpariert und das Target noch vor der Co-Kristallisation in das Ultraschallbad überführt und bis zur vollständigen Kristallisation der Protein-Matrixlösung darin inkubiert werden (nach etwa 15 min). Danach wurde das Target über eine Scout-Quelle (Bruker-Franzen) in die Probenkammer des Massenspektrometers eingeführt und die Probenkammer evakuiert ( $10^{-5}$  bar).

Die Bestimmung der Massen von nativem Porin und seinen chemisch modifizierten Derivaten (S05 - S100) wurde an einem Flugzeit-Massenspektrometer des Typs *Biflex Linear TOF* (*time of flight*, Firma Bruker-Franzen, Bremen) durchgeführt. Desorption und Ionisation der Probe erfolgte über einen energiereichen Laserpuls der Wellenlänge 337 nm und einer Pulslänge von 3 ns. Dieser Puls löste elektronisch über eine Diode das Zeitsignal ( $t_0$ ) für die Bestimmung der Flugzeit aus. Niedermolekulare Massen wurden durch Anlegen einer Spannung von 2 kV (0,5  $\mu$ s nach  $t_0$ , für 1 - 8  $\mu$ s Länge) senkrecht zur Beschleunigungsrichtung aus dem Molekularstrahl gefiltert (Ausblendpuls), wodurch eine frühzeitige Sättigung des Detektors mit niedermolekularen Ionen (z.B. Matrixionen) vermieden wurde. Protein und Peptidionen treffen nach einer feldfreien Strecke von 100 cm auf den Detektor (Micro-Channel-Plate, 1,7 - 2 kV Betriebsspannung). Das Stoppsignal für die *TOF* Messung wurde über die Software gesteuert und je nach gewähltem Massenbereich

ausgelöst. Abhängig von der Signalintensität des Molekularstrahls wurden 100 - 500 Einzelspektren einer Probe aufgezeichnet, zu einem Massenspektrum aufsummiert und gemittelt.

Die Kalibrierung der Molekulargewichte und damit der Flugzeit erfolgte intern durch Zugabe eines Molekülstandards wie Insulin ( $m/z$  für  $I^+ = 5734$  D), Lysozym ( $m/z$  für  $L^+ = 14306$ ) oder Trypsin ( $m/z$  für  $T^+ = 23354$ ) in die Probenlösung. War eine interne Kalibrierung nicht möglich, so wurde mit den Eichproteinen eine Kalibrierkonstante für das verwendete Target ermittelt und diese dann auf die Massen der untersuchten Proben übertragen.

### **2.1.7 Analyse der Proteinproben über ESI-MS**

Die ESI-MS-Spektren von Omp32 und S1 wurden an einem Vestec 201 Single-Quadrupol-Massenspektrometer (Vestec Corp., Houston USA) mit einem Massenbereich ( $m/z$ ) von 2000 aufgenommen. Da der Aufbau des Spektrometers und dessen Funktion in der Fachliteratur diskutiert wurde, sollen hier keine weiteren Details erwähnt werden. Zur Probenvorbereitung für ESI-MS wurden die Proben gegen eine Lösung aus 0,1% DDM in 10 mM  $NH_4OAc$  dialysiert. Die Proteinlösung wurde dann im Verhältnis 1/10 bzw. 1/30 mit dem Lösungsmittelsystem 2% Essigsäure in Trifluorethanol (TFE,  $v/v = 9/1$ ) verdünnt und Massenserien der ESI-Spektren wurden im Bereich  $m/z$  von 1200 - 2000 aufgezeichnet.

### **2.1.8 3D-Kristallisation von Omp32 und S100**

Die Vorbereitung der Porinlösung zur Kristallisation erfolgte durch Dialyse der Proteinlösung mit einer Konzentration von 10 - 20 mg/ml für 24 h bei  $10^\circ C$  gegen Pufferlösung OK1 plus eines der folgenden Detergentien: 2%  $\beta$ -OG, 1,2% C8E4, 0,2% LDAO und 0,1% DDM. Die Proteinkonzentration wurde nach der Dialyse über den Bicinsäuretest ermittelt und für die weiteren Kristallisationsversuche konstant gehalten [Sapan *et al.*, 1999]. Vor der Kristallisation wurde die Lösung für 10 min bei  $160000 \times g$  zentrifugiert. Initiale Kristallisationsbedingungen des Porins wurden durch Ansetzen der Proteinlösung mit der Jancarik-Matrix gefunden [Jancarik & Kim, 1991]. Die Matrix wurde wie in der Literatur zitiert präpariert. Kristallisationsansätze wurden durch Mischen von 2  $\mu$ l Proteinlösung mit 2  $\mu$ l Fällungsmittel auf einem silikonisierten

Glasplättchen angesetzt und als hängender Tropfen über einem Reservoirvolumen von 800  $\mu\text{l}$  bei 17°C inkubiert. Zur Kristallisation wurden VDX-Platten (Hampton Research, Laguna Niguel) verwendet. Zwei aus der Jancarik-Matrix hervorgegangene Bedingungen wurden durch Variation der Fällungsmittelkonzentration und Vorsättigung im Tropfen weiter verfeinert und ergaben die ersten röntgentauglichen Kristalle.

Kristallisationsform 1 (KF1) wurde durch Mischen äquimolarer Mengen an Proteinlösung und Fällungsmittel 1,3 - 1,4 M  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 100 mM HEPES pH 7,5 erhalten. Kristallisationsform 2 (KF2) wurde durch Mischen der Probe mit 1,8 - 2 M Ammoniumsulfat in 100 mM Tris, pH 8,6 (5  $\mu\text{l}$  + 5  $\mu\text{l}$ ) erhalten.

### 2.1.9 Kristallmontage und Datenauswertung

Kristalle von KF1 und KF2 wurden vom Deckplättchen in eine große Kapillare (Innendurchmesser 1 - 1,5 mm) aufgenommen und in 200  $\mu\text{l}$  des Reservoirpuffers überführt. Von dort wurden sie durch Ansaugen über ein durch einen Schlauch verbundenes Mundstück, in eine Quarzkapillare (Müller, Berlin) geeigneter Größe (ungefährer Kristalldurchmesser) eingesogen. Aus dieser Kapillare wurde der Kristall und wenige  $\mu\text{l}$  Fällungsmittel in eine neue Kapillare überführt, deren Ende mit Wachs (Harvard Wax) luftdicht versiegelt war. Um die Austrocknung des Kristalls in der Kapillare zu verhindern, wurden zusätzlich noch wenige  $\mu\text{l}$  der Reservoirpuffers eingeschlossen. Der Kristall wurde in dieser Kapillare unter dem Mikroskop mit schmalen Filterpapierstreifen oder kommerziell erhältlichen *paper wicks* (Hampton Research) trocken gelegt und die Kapillare dann auch am anderen Ende mit wenigen  $\mu\text{l}$  Reservoirlösung und Wachs verschlossen. Zur Röntgenmessung wurde die Kapillare auf einem Goniometerkopf fixiert und der Kristall auf die Achse des Röntgenstrahls zentriert.

Datensätze der Kristalle wurden bei RT und  $\text{Cu-K}_{\alpha}$ -Strahlung an einer Röntgenanlage (Fa. Schneider, Offenburg; Drehanode mit 40 kV, 100 mA) gemessen. Die Diffraktion der Kristalle im Strahl wurden auf einer Image plate (IP; Firma Stoe, Darmstadt) aufgezeichnet und über einen Laser ausgelesen. Die Belichtungszeiten lagen, abhängig von der Größe und der Qualität der Kristalle, zwischen 10 und 30 min.



Das Prinzip einer Imageplate besteht darin, dass auf diese treffende Röntgenquanten mit einer Energie von  $> 6$  KeV metastabile angeregte elektronische Zustände induzieren, die auch als Farbzentren bezeichnet werden. Diese angeregten Zustände können über induzierte Emission unter Verwendung eines He-Ne-Lasers und Abstrahlung von blauem Licht (Luminiszenz) in deren Grundzustand überführt werden. Die Intensität der emittierten Strahlung ist dabei direkt proportional zur Anzahl der absorbierten Röntgenquanten. Die Luminiszenzstrahlung kann mit einem Photomultiplier gemessen und in ein elektronisches Signal umgewandelt werden. Die IP wurde über den Laser spiralförmig ausgelesen, wobei die Auslesezeit pro Pixel ( $150 \times 150 \mu\text{m}$ ) konstant blieb. Den sich über den Bereich der IP verändernden Intensitäten wurden die in das kartesische Koordinatensystem transformierten Koordinaten der Pixel zugeordnet und abgespeichert.

Datensätze von beiden Kristallformen wurden mit hoher Auflösung bei RT an den Beamlines BW6 (Wiggler-Beamline der Max-Planck-Gesellschaft am DESY) und BW7A (Beamline der EMBL-Außenstelle Hamburg) am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) aufgenommen. Die Wellenlänge der Messungen wurde vor der Messung auf das Energiemaximum der Beamline von etwa  $0,98 \text{ \AA}$  optimiert. Die Belichtungszeiten lagen entsprechend den unterschiedlichen Beamline-Intensitäten und der Kristallqualität bei 60 - 120 s. Die Kristalle wurden um jeweils ein  $0,5 - 1$  Grad pro Aufnahme gedreht. Von der KF1 wurden Daten über 90 Grad, für KF2 über einen Bereich von 65 Grad gesammelt. Die gestreute Strahlung wurde auf einer MAR Imageplate (MarResearch, Hamburg) detektiert.

Datensätze der nativen und der Derivatkristalle wurden immer an jeweils einem Kristall gesammelt. Die Bestimmung der Kristallorientierung und die Indizierung der Beugungsbilder wurden mit den Programmen DENZO [Otwinowski & Minor, 1997] und XDS [Kabsch, 1998] vorgenommen, ebenso die Integration der Reflexintensitäten. Die Datenreduktion wurde mit XDS und DENZO/Scalepack ausgeführt. Die Umwandlung von Intensitäten in Amplitudenwerte wurde mit dem Programm *truncate* aus dem CCP4 Programmpaket ausgeführt [CCP4, 1994].

#### **2.1.10 Derivatanalyse und Phasierung über SIRAS**

Alle zur Phasierung eingesetzten Schweratomsalze wurden in destilliertem Wasser oder wenn möglich direkt im Fällungsmittel in Konzentrationen von 10 - 100 mM

gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden kleinste Mengen ( $\sim 1 \mu\text{l}$ ) entnommen und den Proteinkristallen zugesetzt, sodass die Endkonzentration an Schweratomionen 0,1 - 10 mM des entsprechenden Salzes betrug. Die Inkubationszeit der Kristalle in den Schweratomlösungen wurde zwischen 12 und 48 h bei  $17^\circ\text{C}$  variiert.

Derivatisierte Kristalle wurden in Glaskapillaren montiert, an der Röntgenanode gemessen und mit XDS und DENZO unter Berücksichtigung der anomalen Intensitätsbeiträge ausgewertet. Die Interpretation und Identifizierung der Schweratom-Derivate erfolgte mit den Programmen Darefi [Diederichs, 1994] und SOLVE [Terwilliger & Berendzen, 1999]. Da der Schweratombeitrag in schwächeren Reflexen entsprechend der höherer Auflösung auf kleinere Differenzbeiträge abfallen kann, wurden Patterson-Analysen im Auflösungsbereich von 20 - 6 Å, 20 - 4,5 Å und 20 - 3,5 Å gerechnet. Nachdem eine Bindungsstelle durch Differenz-Patterson gefunden und in Darefi verfeinert worden war, konnten weitere Bindungsstellen über Differenzfourieranalyse mit den Phasen der ersten Bindungsstelle identifiziert werden. Die Verfeinerung der Bindungsstellen mit den Parametern Besetzungszahl, Koordinaten, Temperaturfaktor und Isotropie wurde ebenso in Darefi durchgeführt. Die Daten der Verfeinerung aus Darefi wurden mit den in SOLVE automatisch ermittelten Bindungsstellen und deren verfeinerten Parametern verglichen. Bindungsstellen mit einer Besetzungszahl von  $> 0,1$  wurden in SHARP [De la Fortelle & Bricogne, 1997] verfeinert und erste Elektronendichtekarten nach Solvenskorrektur durch SOLOMON [CCP4, 1994] in dem Programm O [Jones *et al.*, 1991] auf Qualität und Interpretierbarkeit hin geprüft.

### **2.1.11 Strukturlösung über den molekularen Ersatz**

Die besten Daten von KF1 wurden zur Strukturbestimmung mittels *molecular replacement* (MR, molekularer Ersatz) verwendet. Als Suchmodelle standen zum damaligen Zeitpunkt die Koordinaten von 2OMF, 2POR und 1PRN (entsprechend der PDB-Datenbank Nomenklatur 2OMF für OmpF aus *E. coli*, 2POR für das Porin aus *R. capsulatus* und 1PRN für das Porin aus *R. blastica*) zur Verfügung. Da die Sequenzähnlichkeit zwischen OmpF und Omp32 am höchsten war, wurden die meisten Suchroutinen ausgehend von diesem oder einem davon abgeleiteten Koordinatensatz durchgeführt. Die Rotationssuche wurde mit dem Programm X-PLOR durchgeführt [Brünger, 1992], indem die Koordinaten des Porins um die

kristallografische Z-Richtung von 0 - 120 Grad in 3-Grad-Inkrementen gedreht wurden und daran eine *rigid-body*(RB)-Verfeinerung des Moleküls angeschlossen wurde. Da in R3 die Lage des Monomers bzw. Trimers relativ zur kristallografischen Z-Orientierung noch um 180 Grad frei ist, wurde oben beschriebene Rotationssuche nochmals nach 180 Grad Drehung des Modells um die X- oder Y-Achse durchgeführt. Als Maximierungskriterium für die Übereinstimmung zwischen den aus dem Modell berechneten Struktur Faktoren nach Rotation und RB-Verfeinerung sowie den gemessenen Struktur Faktoren wurde der Korrelationsfaktor E2E2 verwendet. Das ursprüngliche OmpF-Modell wurde nach den ersten erfolglosen Versuchen wie folgt modifiziert:

- ursprüngliches Modell 2OMF
- alle Seitenketten wurden auf ihre C<sub>α</sub>- und C<sub>β</sub>-Positionen (entsprechend Alanin) reduziert
- alle voluminösen Seitenketten wie Tryptophane, Phenylalanine etc. wurden in Leuzine umgewandelt, alle kleinen Seitenketten wie Glycine, Serine etc. in Alanine
- Loopbereiche ohne gemeinsame Ähnlichkeiten wurden aus dem Modell genommen und die β-Stränge durch kurze Turnstrukturen verbunden

Die Rotationssuche wurde in verschiedenen Auflösungsbereichen mit den Daten von 20 - 3,5 und 20 - 6 Å durchgeführt.

### **2.1.12 Molekülbau und Verfeinerung der Koordinaten**

Die aus Phasen des *single isomorphous replacement* (SIR) bis 2,9 Å gerechnete Elektronendichte war relativ gut interpretierbar. Die Dichtekarte wurde in das Programm O geladen und das Modell von 2OMF manuell in die Dichte eingepasst. Die Aminosäurereste entsprechend der SIR-Dichte und der Omp32-Sequenz ausgetauscht und die Geometrie in O über *real space refinement* entsprechend idealer Bindungsgeometrie optimiert. Nachdem so die Geometrie von etwa 300 Seitenketten optimiert worden war, wurde der erste Verfeinerungszyklus (100 Zyklen *positional, slowcooling* bei 3000 K, 100 Zyklen *positional*, B-Faktor Verfeinerung) des Modells über X-PLOR gerechnet. Die von Engh und Huber beschrieben [Engh & Huber, 1991] und in X-PLOR implementierten Parameter für Geometrie und

Bindungsenergie wurden verwendet und um die Parameter von N-terminalem Pyroglutamat ergänzt. Das verfeinerte Modell wurde der Phasierung von Modelldichtekarten zu Grunde gelegt, die mit der SIR-Dichte zusammen zum weiteren Modellbau verwendet wurde. Nachdem das komplette Porinmodell in Modell-gewichtete  $2F_O-F_C$ -Karten modelliert worden war, wurden die acht AS des 54-AS-Peptids in Modell-phasierete  $F_O-F_C$ -Differenzkarten eingepasst und der gesamte Protein-Peptid-Komplex wie oben beschrieben verfeinert.

Die Analyse des Modells wurde über Differenzfourierdichten am Bildschirm und über Geometriefehleranalyse entsprechend dem Programm Whatcheck [<http://www.cmbi.kun.nl/whatif/whatcheck/>] durchgeführt. Die Sekundärstruktur wurde entsprechend den in Promotif festgelegten Kriterien definiert und für die grafische Darstellung verwendet [Hutchinson & Thornton, 1996].

Die Molekülabbildungen wurden mit den Programmen Molscript [Kraulis, 1991] und DINO [<http://www.bioz.unibas.ch/~xray/dino/>] sowie Raster3D [Merrit & Murphy, 1994] erstellt. Oberflächendarstellungen von Molekülen wurden für die Bearbeitung in DINO mit dem Programm MSMS vorbereitet [[http://www.scripps.edu/pub/olson-web/people/sanner/html/msms\\_home.html](http://www.scripps.edu/pub/olson-web/people/sanner/html/msms_home.html)]. Potentialoberflächen wurden in GRASP [Nicholls *et al.*, 1991] mit den Standardparametern für Ladungen berechnet.

## **2.2 Material und Methoden zu HVDAC1 und HVDAC2**

### **2.2.1 Expression, Reinigung und Rückfaltung**

Die für die humanen Isoformen von VDAC (HVDAC1 und HVDAC2) kodierenden Gene wurden über PCR in ein Plasmid mit BamH1-Schnittstelle und dem flankierenden Vektor PDS56/RBII-6xHis kloniert und in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert. Zellen wurden auf Ampicillin/Kanamycin-Platten selektioniert und eine Einzelkolonie zum Animpfen einer 100 ml Vorkultur LB-Medium verwendet. Diese wurde zum weiteren Animpfen von 5 l Hauptkultur eingesetzt. Die Zellen wuchsen bei 37°C bis zu einer  $OD_{600}$  von 1, bevor die Überexpression von VDAC mit 1 mM IPTG induziert wurde. Eine  $OD_{600}$  von 2 - 2,5 wurde nach einer weiteren Wachstumsphase von 5 - 6 h oder über Nacht erreicht. Die Zellen wurden über Zentrifugation bei 4000 x *g* geerntet und in Aufschlusspuffer VA1 mittels dreimaligem Durchlauf in einer *French press* aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile der Zellsuspension wurden bei 48000 x *g* von den löslichen getrennt. Das Pellet aus Membranen und *inclusion*

*bodies* wurde durch zweimaliges sorgfältiges Pottern in Puffer VH1 homogenisiert, für 30 min bei RT inkubiert und anschließend bei 48000 x g abzentrifugiert. Ein weiterer Solubilisierungsschritt der Membranen mit Puffer VH2 wurde in analoger Weise zu den vorhergehenden Schritten durchgeführt.

Die gereinigten *inclusion bodies* wurden in 6 M Guanidiniumhydrochlorid in Puffer VA1 gelöst und die Konzentration des Proteins auf ca. 20 mg/ml eingestellt. Die Rückfaltung wurde durch langsames Eintropfen der Proteinlösung in die Detergenzlösung VR1 bei 4°C induziert. Die Rückfaltungsausbeute und Stabilität des Proteins wurde über seine Absorption bei OD<sub>280</sub> über einen Zeitraum von einer Woche verfolgt. Die Proben wurden für diese Messungen jeweils 5 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und die reine Proteinabsorption nach Abzug des Pufferbeitrags ermittelt.

Für die Reinigung des Proteins wurde eine mit NiNTA-Agarose gepackte Säule verwendet. Vor der Auftragung auf die Säule wurden die Proteinproben für 30 min bei 4°C und 48000 x g zentrifugiert und dann mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit dem 5 - 10 fachen Säulenvolumen von VS1 gewaschen. Unspezifisch an die Matrix adsorbierte Proteine wurden mit 40 mM Imidazol in VS1 entfernt, bevor HVDAC1 und HVDAC2 mit 250 mM Imidazol in Puffer VS1 von der Säule eluiert wurde. Die Proteinlösungen wurden, abhängig von ihrem Volumen, mittels Ultrafiltrationszellen (Amicon-Membran mit Ausschlussgrenze 30 kD) oder über Centricons (30 kD) eingeeengt. Die Konzentration des Proteins wurde über den Bicinsäuretest und über die Absorption OD<sub>280</sub> bestimmt. Für die Bestimmung der Reinheit wurden Proteinproben nach Zellzucht, Isolierung und Reinigung genommen und mittels denaturierender SDS-PAGE geprüft.

Die Reinigung und Rückfaltung von HVDAC2 wurde analog zu der für HVDAC1 beschriebenen durchgeführt.

### **2.2.2 Bindung von HVDAC1 an ATP-Agarose**

Die Bindung von HVDAC1 an unterschiedliche ATP-Agarose-Matrices wurde untersucht. Dazu wurde eine Minisäule mit ca. 100 µl ATP-Agarosematrix (Sigma) gefüllt und mit dem 10-fachen Volumen an Puffer VA1 äquilibriert. 100 µl der Proteinlösung mit einer Proteinmenge entsprechend der abgeschätzten Bindungskapazität der Säule wurden aufgetragen und für 30 min inkubiert. Die Säule

wurde danach viermal mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  von Puffer VA2 gewaschen und das gebundene Protein schließlich in Puffer VA3 eluiert. Alle Durchläufe (Auftragung, Waschschrirte, Elution) der Säule wurden aufgefangen und über SDS-PAGE analysiert.

Die Bindung an ATP-Agarose wurde nur mit HVDAC1 untersucht.

### **2.2.3 Dynamische Lichtstreuung an HVDAC1**

Für dynamische oder quasi-elastische Lichtstreuung wurden HVDAC1-Proben durch Dialyse bei 4°C in 0,2% DDM oder 0,5% C8E4 in Puffer VD1 überführt. Die Lösungen wurden dann für 30 min bei RT und 200000 x *g* zentrifugiert und jeweils 200  $\mu\text{l}$  einer Lösung von 5 mg/ml Protein durch einen Filter der Ausschlussgröße 20 nm direkt in die Messküvette injiziert. Alle Messungen wurden bei 18°C an einem kommerziellen Gerät (Firma DynaPro) vorgenommen. Das monochromatische Licht eines Lasers bei 590 nm wurde dazu in die Messzelle gekoppelt. Von Partikeln in Lösung gestreutes und das Licht wurde während der Messung in einem 90 Grad Winkel mittels einer Photodiode aufgezeichnet. Aus den Intensitätsfluktuationen der Messung lässt sich die Partikelbewegung abschätzen. Die daraus abgeleiteten Größen wie Streu- und Diffusionskoeffizient dienen zur Ableitung der eigentlich interessanten Größen wie Molekulargewicht, Partikelradius und Partikelgrößenverteilung.

### **2.2.4 FTIR-ATR an rückgefalteten VDAC-Proben**

Die Messungen an den beiden Isoformen wurden wie in Kapitel 2.1.5 für Omp32 beschrieben durchgeführt.

### **2.2.5 Elektronenmikroskopie**

Die Herstellung der 2D-Kristalle von HVDAC1 und die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden von Dr. Max Dolder am Institut für Zellbiologie der ETH in Zürich durchgeführt. Da diese Arbeiten zu einer ultrastrukturellen Charakterisierung des Proteins führten, sollen sie der Vollständigkeit halber hier Erwähnung finden. Alle

elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit Proben des HVDAC1 durchgeführt.

Zur Einzelpartikelanalyse von HVDAC1 wurden 3  $\mu\text{l}$  der Porinlösung in Form von Protein-Detergens-Micellen in Puffer VE1 direkt auf das Kohle-bedampfte Cu-Grid aufgebracht, mit Uranylacetat kontrastiert und direkt im Elektronenmikroskop bei einer 36000-fachen Vergrößerung untersucht [Dolder *et al.*, 1999].

2D-Kristalle von HVDAC1 wurden durch Dialyse einer 1 mg/ml-Proteinlösung gegen Puffer VK1 (1% o-POE, 0,1 - 0,25% DMPC) gewonnen. Das Verhältnis Lipid zu Protein betrug bei den Ansätzen 0,2 - 0,5. Die Dialyse wurde für 48 h bei RT durchgeführt. 2D-Kristalle wurden mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung inkubiert und im Elektronenmikroskop analysiert.

Für die Einbettung der Kristalle in Eis wurde ein Topfen von 5  $\mu\text{l}$  der Suspension von 2D-Kristallen in Puffer auf ein mit Kohle bedampftes Kupfernetz gegeben. Nicht adsorbiertes Protein wurde nach einer Minute mit destilliertem Wasser von der Oberfläche gewaschen und das Grid dann in flüssigem Ethan gefroren. Die Probe wurde bei - 175 Grad das Cryo-TEM (Philipps, CM12) überführt und EM-Bilder unter *low dose*-Bedingungen ( $< 5 \text{ e}/\text{\AA}^2$ ) bei 100 kV aufgenommen. Die Vergrößerung wurde auf 96000-fach erhöht (entsprechend 2,5  $\text{\AA}$  pro pixel) und Daten auf einer CCD-Kamera (Gatan) aufgezeichnet.

Für die Schrägbeschattung der Kristalle mit einer Tantal/Wolfram-Mischung wurden diese wie oben beschrieben präpariert. Die Probe wurde nach der Bedampfung in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Gefriertrocknung bei - 80<sup>o</sup>C im Hochvakuum durchgeführt. Alle Proben wurden unidirektionell mittels eines Elektronenstrahl-Evaporators beschattet. Die Bildung und Dicke der Metallschicht wurde über einen Schwingquarz verfolgt. Die bedampfte Probe wurde dann auf einen Cryohalter übertragen und Daten bei 77000-facher Vergrößerung (entsprechend 3,1  $\text{\AA}$ /pixel) im EM gesammelt.

### **2.2.6 3D-Kristallisation**

Der Detergensaustausch von 2% LDAO in o-POE wurde auf der Ni-NTA Säule durchgeführt. 10 - 20 mg des Porins in Puffer VR1 wurden an die Säule gebunden und mit dem 10-fachen Säulenvolumen an VS1 gespült bevor das Protein mit 250 mM Imidazol in VD1 von der Säule eluiert und auf eine Konzentration von ca. 8 -10

mg/ml eingeeengt wurde. Die Probe wurde dann für 48 h in Dialyseknöpfen gegen folgende Detergentien in Puffer VX1 dialysiert: 0,1% DDM, 0,2% DEM, 1% C8E5, 1,2% C8E4, 0,2% C12E8, 2%  $\beta$ -OG und 0,2% LDAO. Während der Dialyse ausgefallenes Protein wurde in der Airfuge bei 160000 x *g* präzipitiert. Die Proteinkonzentration wurde vor der Kristallisation über den Bicinsäuretest bestimmt. Zur Kristallisation wurde die kommerziell erhältlichen *crystal screens* 1 und 2 sowie der für Membranproteine konzipierte *screen membfac* verwendet (Hampton research, Laguna Niguel). Proteintropfen wurden durch Mischen von 2  $\mu$ l Proteinlösung mit 2  $\mu$ l Fällungsmittel in der *sitting drop*-Methode bei 17°C angesetzt.

## **2.3 Material und Methoden zu P100**

### **2.3.1 Isolierung und Reinigung von P100**

Aus 100 ml einer Übernachtskultur des Stammes *Thermus thermophilus* wurde ein 80 l-Fermenter angeimpft und bei 70 Grad in bis zur stationären Phase gezogen. Die Zellen wurden über eine Durchflusszentrifuge geerntet, in Aufschlusspuffer TA1 resuspendiert und über eine *Frech press* aufgeschlossen. Die Lösung wurde für 30 min bei 48000 x *g* zentrifugiert, der lösliche Überstand verworfen und das Pellet mit Puffer TR1 mittels eines Potters homogenisiert und nochmals für 30 min bei 48000 x *g* zentrifugiert. Diese Prozedur wurde zweimal hintereinander durchgeführt und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit Puffer TR1 und einer Spatelspitze Lysozym homogenisiert und für eine Stunde unter Rühren bei RT inkubiert. Die Lösung wurde wie oben beschrieben abzentrifugiert und der Überstand in der Kälte gelagert, während das Pellet erneut in Puffer TR1 homogenisiert und, wie oben beschrieben, abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit dem des vorherigen vereinigt und für die Reinigungsschritte eingesetzt.

Die Lösung von P100 wurde auf eine Proteinkonzentration von 3 - 5 mg/ml eingeeengt (Membranen der Ausschlussgrenze 100 kD) und so für den ersten Reinigungsschritt über Gelpermeation präpariert. Die Proteinlösung wurde im Volumenverhältnis 1:60 auf eine vorgepackte und mit Puffer TG1 äquilibrierte Gelpermeationssäule (Superose-200, HiLoad™) geladen, die mit einer Flussrate von 0,5 ml/min betrieben wurde. Die Elution des Proteins wurde über die Absorption OD<sub>280</sub> verfolgt. Die P100 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Dialyse gegen Puffer TD1 für den zweiten Chromatographieschritt vorbereitet.



Protein P100 wurde mit einer Flussrate von 1,5 ml/min auf den Anionenaustauscher (Q-Sepharose von Pharmacia oder Q-beads von Biorad) aufgetragen. Nach der Auftragung wurde die Säule so lange mit 100 mM NaCl in Puffer TA2 gespült, bis die Absorption bei OD<sub>280</sub> konstant war. Danach wurde ein Gradient von 0 - 1 M NaCl in Puffer TA2 über 10 Säulenvolumen angelegt und das eluierte Protein fraktionell gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden über SDS-PAGE auf ihre Reinheit geprüft und P100 enthaltende Fraktionen vereinigt. Die Lösung wurde dann in einer Rührzelle (Porenausschlussgröße 100 kD) für die weiteren Experimente auf eine Endkonzentration von etwa 10 mg/ml eingengt und gegen Puffer TD2 dialysiert.

### **2.3.2 FTIR-Spektroskopie an P100**

Die Messungen an den beiden Isoformen wurden, wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben, durchgeführt.

### **2.3.3 2D-Kristallisation von P100**

DMPC-Vesikel wurden für die 2D-Kristallisation wie folgt präpariert. Aus einer Stammlösung von DMPC in CHCl<sub>3</sub> wurde eine für die 2D-Kristallisation erforderliche Menge an DMPC entnommen und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verdampft, bis ein DMPC-Film zurückblieb. Dieser wurde in einer 2%-igen Lösung von o-POE in 20 mM Hepes, pH 7,5 resuspendiert und im entsprechenden Verhältnis mit der Proteinlösung gemischt. Das Gesamtvolumen betrug nach Mischen 200 µl.

2D-Kristalle von P100 wurden mittels der Dialysetechnik in einer temperierbaren, und mit einer optischen Messzelle zur Detektion von Streulicht versehenen Apparatur hergestellt [Paul *et al.*, 1992]. Sowohl der Dialysepuffer als auch die Durchflusszelle der Apparatur wurden dabei auf ca. 35<sup>o</sup>C temperiert. Folgende molare Verhältnisse von Lipid zu Protein wurden gewählt: L/P = 2, 10, 25, 50, 100 und 500. Die Dialyse wurde für 48 h gegen Puffer TD3 durchgeführt. Die Bildung von Vesikeln wurde optisch bei OD<sub>280</sub> über die Streulichtdetektion von der an Vesikeln gestreuten Strahlung verfolgt.

### **2.3.4 Elektronenmikroskopie**

Die 2D-Kristalle wurden im TEM (Philipps, EM420) untersucht. Mit Kohlefilm überzogenen Kupfergrids wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung in einer Glimmentladungslampe hydrophilisiert. 5  $\mu\text{l}$  eine Suspension von 2D-Kristallen in Puffer wurden mit derselben Lösung an Wasser gemischt und für 1 min im Ultraschallbad behandelt. Davon wurden 3  $\mu\text{l}$  auf einen Kohlefilm gebracht, inkubiert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die adsorbierten Kristalle mit einer 2%-igen Uranylacetat Lösung kontrastiert. Negative der Proben wurden bei einer Vergrößerung von 36000-fach aufgenommen und digitalisiert. Die Bildverarbeitung mit SEMPER 6.4 wurde auf einer Silicon Graphics Workstation (SGI, Indigo 5000) durchgeführt [Saxton, 1996]. Die Bilder der 2D-Kristalle wurden korreliert und gemittelt und die Auflösungsgrenze durch Fourier-Rücktransformation bestimmt.

### **2.3.5 AFM-Untersuchungen an P100**

5  $\mu\text{l}$  der Stammlösung der sechs 2D-Kristallansätze wurden mit Puffer TA1 im Verhältnis 1:10 gemischt und für 30 sec Im Ultraschallbad behandelt. 20  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden auf Glimmer gebracht und für 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden nicht adsorbierte Proteinkristalle durch mehrmaliges Waschen der Glimmeroberfläche mit Puffer TA1 entfernt. Die Probe wurde dann direkt auf dem Z-Piezo montiert und in Puffer bei RT unter Puffer TA1 abgebildet.

## 2.4 Puffer

<b>OZ1</b>	150 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM Phosphat, pH 7	<b>VA1</b>	1 mM EDTA 5 mM Mercaptoethanol 100 mM Tris, pH 8
<b>OW1</b>	150 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 3% o-POE 50 mM Phosphat, pH 7	<b>VR1</b>	2% LDAO 1 mM Mercaptoethanol 100 mM Tris, pH 8
<b>OE1</b>	150 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 3% o-POE 50 mM Phosphat, pH 7 100 µg/ml Lysozym	<b>VS1</b>	100 mM NaCl, 1 mM Mercaptoethanol 100 mM Tris, pH 8 1% o-POE
<b>OE2</b>	100 mM NaCl 1% o-POE 50 mM Phosphat, pH 7	<b>VX1</b>	100 mM NaCl 1 mM Mercaptoethanol 10 mM Tris, pH 8
<b>OA1</b>	20 mM Phosphat, pH 7 0,5% o-POE	<b>TA1</b>	150 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM Phosphat, pH 7
<b>OD1</b>	20 mM Hepes, pH 7,5 0,5% o-POE	<b>TA2</b>	0,5% o-POE 5 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM Phosphat, pH 7
<b>OS1</b>	100 mM Phosphat, pH 6,5 0,5% o-POE		
<b>OT1</b>	100 mM NaCl 20 mM Phosphat, pH 8 0,5% o-POE	<b>TR1</b>	150 mM NaCl 3% o-POE 5 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM Phosphat, pH 7
<b>PC1</b>	10% Acetonitril 0,1% TFA	<b>TG1</b>	150 mM NaCl 0,5% o-POE 5 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM Phosphat, pH 7
<b>VH1</b>	100 mM NaCl, 3% o-POE 100 mg/ml Lysozyme 50 mM Tris, pH 8		
<b>VH2</b>	100 mM NaCl 50 mM Tris, pH 8		

## 2.5 Abkürzungen

<b>AFM</b>	<i>Atomic force microscopy</i>
<b>AM</b>	Äußere Membran
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>AMM</b>	Äußere Mitochondrienmembran
<b>β-OG</b>	β-Octylglucosid
<b>BrCN</b>	Bromcyan
<b>C8E4</b>	Octyl-Tetraoxyethylen
<b>C8E5</b>	Octyl-Pentaoxyethylen
<b>C12E8</b>	Dodecyl-Octaoxyethylen
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Chbroform
<b>DEM</b>	Decylmaltosid
<b>DDM</b>	Dodecylmaltosid
<b>DMPC</b>	Dimyristoyl-L-α-Phosphatidylcholin
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EDTA</b>	Ethylendiamin tetraacetat
<b>EM</b>	Elektronenmikroskopie
<b>ESI-MS</b>	<i>Electrospray ionization mass spectrometry</i>
<b>FTIR</b>	<i>fourier transform infrared</i>
<b>GuaHCl</b>	Guanidinium hydrochlorid
<b>HEPES</b>	N-2-Hydroxyethylpiperazin-n`-2-Ethansulfonsäure
<b>IMM</b>	Innere Mitochondrienmembran
<b>IPTG</b>	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<b>LDAO</b>	N,N-dimethy-dodecylamin-N-oxid
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>LSA</b>	Liposomen-Schwellungsassay
<b>LZP</b>	Lipid-zu-Protein
<b>MALDI-MS</b>	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry</i>
<b>o-POE</b>	Octyl-Polyoxyethylen
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>SDS</b>	Natrium dodecylsulfat
<b>SLH</b>	<i>S-layer homology</i>
<b>TFA</b>	<i>Trifluor acetic acid</i>
<b>TFE</b>	Trifluorethanol
<b>VDAC</b>	<i>voltage-dependent anion channel</i>

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Allgemeines

#### 3.1a Allgemeines zu *Comamonas acidovorans*

Das Bakterium *C. acidovorans* ist eines der drei Spezies des Genus *Comamonas* und gehört in die  $\beta$ -Untergruppe der Proteobakterien [Tamaoka *et al.*, 1987]. Der Stamm wurde ursprünglich aus verschiedenen Böden und aus Seewasser isoliert, konnte in den letzten Jahren jedoch auch in klinischen Isolaten nachgewiesen werden [Bofill *et al.*, 1996; Castagnola *et al.*, 1997].

Ein weitergehendes industrielles Interesse an *C. acidovorans* rührt aus seiner Fähigkeit, aromatische Säuren wie Nitrobenzoesäure und Phtalsäure [Marvinsikkema *et al.*, 1994; Pieper *et al.*, 1996] sowie verschiedene chlorierte Kohlenwasserstoffe zu verwerten und dadurch Böden und Gewässer zu entgiften [Allen *et al.*, 1999]. Neben diesen Schadstoffen kann *C. acidovorans* auch aliphatische Mono- und Dicarbonsäuren wie z.B. Bernstein- und Fumarsäure aber auch Glutamat aufnehmen und für seinen Kohlenstoffwechsel nutzen [Engelhardt, persönliche Mitteilung].

Die Zellwand des Bakteriums zeichnet sich durch einen relativ einfachen Aufbau aus. Die oberste, die Zelle nach außen abgrenzende Schicht, wird in der Wildtypzelle durch einen *S-layer* mit bekannter Struktur gebildet [Engelhardt *et al.*, 1991]. In der Mutante JL-0, auf der die hier vorgestellten Arbeiten basieren, ist dieser *S-layer* nach Spontanmutation nicht mehr vorhanden. Die darunter liegende AM enthält neben dem Hauptprotein Omp32 nur noch wenige weitere Proteine wie Omp37 und Omp21, ein Protein aus der Klasse der 8-strängigen Membranproteine [Baldermann *et al.*, 1998].

Bei der Nährstoffaufnahme in die Zelle müssen Substrate beide Membranbarrieren überwinden. Die äußere Membran ist dabei für die Aufnahme durch passive Diffusion verantwortlich und besitzt hierfür ein Sortiment von spezifischen und unspezifischen Porinen (z.B. Omp32). In der inneren Membran finden sich ABC-Transporter, die zu der Energie-abhängigen Translokation bestimmter Substrate beitragen.

Auf Grund der Eigenschaft von *C. acidovorans*, verschiedene Mono- und Dicarbonsäuren für seinen Kohlenstoffwechsel nutzen zu können, liegt es nahe, ein Porin mit der Spezifität für die Bindung und gerichtete Aufnahme dieser Substrate in

der AM zu vermuten. Zu dieser Hypothese führen einige der nachfolgend diskutierten strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Omp32, die eine Beteiligung des Porinkanals in den passiven Transport anionischer Substrate aus dem Medium in die Zelle nahelegen.

### 3.1b Allgemeines zur Funktion von Omp32

Aus Leitfähigkeitsmessungen an planaren Membranen geht hervor, dass der Einbau von Omp32 überwiegend gerichtet - also unidirektionell - erfolgt [Mathes & Engelhardt, 1998]. Verfolgt man den sukzessiven Einbau der Porine mit der Zeit, so erkennt man neben dem Einbau einzelner Porintrimere anhand der unterschiedlichen Stufenhöhen der Leitfähigkeitssprünge auch den Einbau oligomerer Porincluster (siehe dazu Abschnitt 1.2.5). Die Leitfähigkeit eines offenen Porintrimers ist spannungsabhängig und nicht-linear und beträgt für 100 mM Kaliumchlorid 0,18 nS. Dieser nichtlineare Effekt tritt im Bereich niedriger Salzkonzentrationen (3 - 100 mM KCl) besonders deutlich zu Tage, da hier das Potenzial der Proteinoberfläche auf die diffundierenden Ionen einen sehr viel stärkeren Einfluss gewinnt. Der Effekt fällt dann durch die erhöhte Abschirmung der Proteinoberfläche für mittlere und hohe Salzkonzentrationen (0,1 - 1 M KCl) kleiner aus oder geht gegen null. Aus der Analyse der Leitfähigkeit nach dem Anlegen von Salzgradienten über die planare Membran hinweg ergibt sich, dass Omp32 ein stark Anionen-selektives Porin mit einem Leitfähigkeitsverhalten ähnlich dem von Omp34 aus *Acidovorax delafieldii* ist [Brunen & Engelhardt, 1991]. Der Selektivitätsfaktor bezüglich der passierenden Anionen  $P_{An}/P_{Kat}$  liegt zwischen 15 und 20 für kleine Ionenstärken und ist von der Einbaurichtung des Kanals in die planare Membran unabhängig [Mathes & Engelhardt, 1998].

Legt man an die planare Membran eine Spannung von ca. 50 mV an, so beginnt Omp32 schon die ersten Schließereignisse zu zeigen. Erhöht man die Spannung auf 100 mV und mehr, so sind nach wenigen Minuten nahezu alle Porine geschlossen. Dieser Vorgang verläuft jedoch reversibel, sobald man die Spannung wieder auf Werte um 20 mV erniedrigt. Versucht man den Zeitverlauf des Schließens mathematisch zu erfassen, so ergibt sich die Notwendigkeit, dafür mehr als eine Exponentialfunktion verwenden zu müssen, was auf kooperative Effekte zwischen den Porinkomplexen in der Membran hindeutet [Mathes & Engelhardt, 1998].

Die in den folgenden Abschnitten beschriebene Struktur von Omp32 kann durch ihre besonderen elektrostatischen Eigenschaften und ihre ungewöhnliche Topologie, in Verbindung mit den funktionellen Daten aus Leitfähigkeitsmessungen etc., den Ausgangspunkt zur Interpretation einer Struktur-determinierten Funktionen bilden.

### 3.1.1a Sequenzvergleich zur Porin-Überfamilie

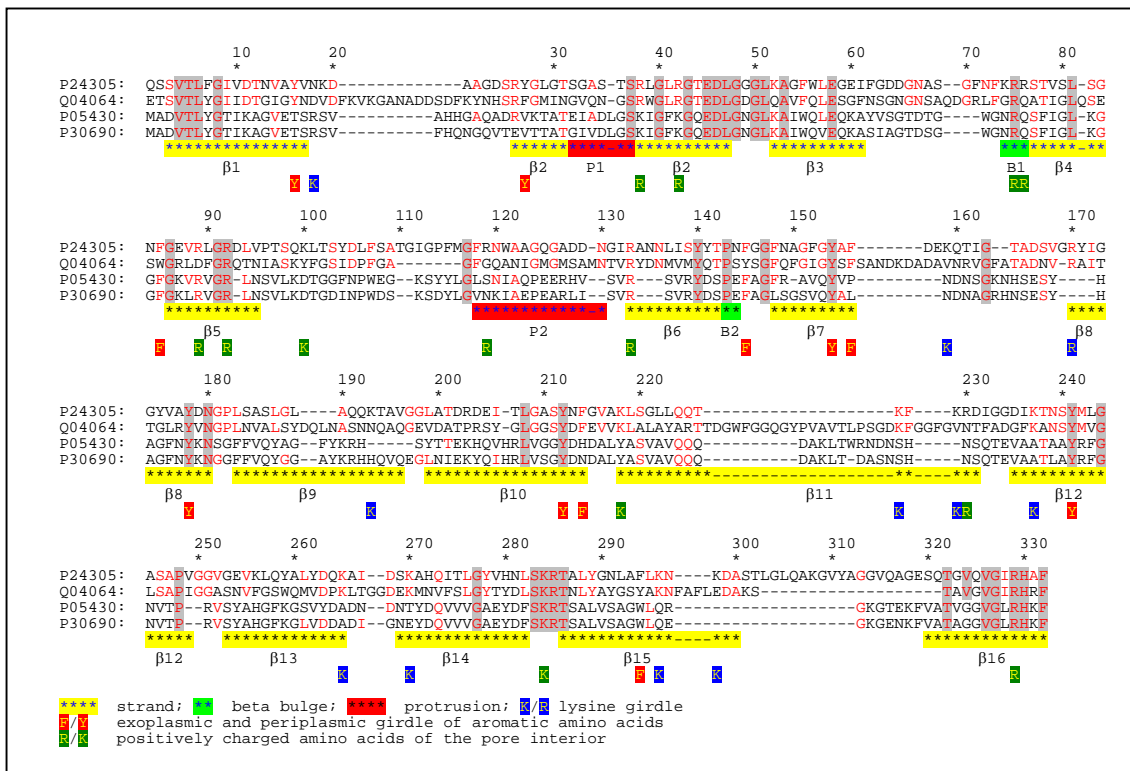
Zu der  $\beta$ -Unterabteilung der Proteobakterien gehören neben *C. acidovorans* einige der human-pathogenen Bakterien wie die Genera *Bordetella* und *Neisseria*. Die Sequenzalignierung des Porins (SP: P24305) läßt deshalb auch eine hohe Identität (I) bzw. Ähnlichkeit (A) mit diesen verwandten Spezies erkennen.

Die höchste Identität bzw. Ähnlichkeit (I/A) findet sich mit 34%/63% zu dem Porin aus *B. pertussis* (SP: Q04064). Ebenfalls hoch ist diese mit 27%/64% zu Porinen aus der Gruppe der *Neisserien* wie zum Beispiel zu PorA aus *N. gonorrhoea* (SP: P05430) und Omp4 aus *N. meningitidis* (SP: P30690).

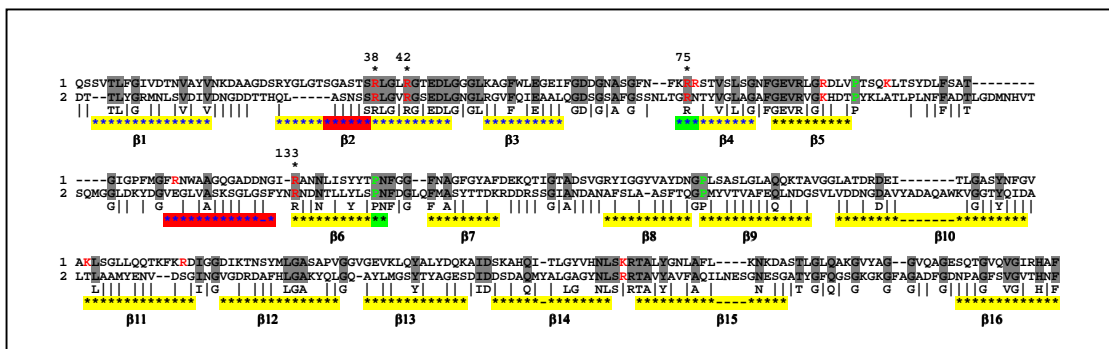
Die Ähnlichkeit zu den strukturell bekannten unspezifischen Porinen ist entsprechend ihrer phylogenetischen Distanz geringer, aber dennoch signifikant. Die (I/A) unter diesen ist mit 22%/57% zwischen Omp32 und OmpF aus *E. coli* (SP: P02931) am höchsten, liegt jedoch auch für die übrigen Porine (SP: P31243; P39767; Q48473) in diesem Bereich. Selbst zu dem mitochondrialen Porin aus *Saccharomyces cerevisiae* (SP: P04840) beträgt sie noch 19%/64%.

Ein multiples Sequenzalignment von Omp32 mit ausgewählten Vertretern der  $\beta$ -Untergruppe ist in Abb. 8a gezeigt [<http://cartan.gmd.de/RDP.html>]. Die großen konservierten Regionen lassen sich, wie erwartet, dem integralen Membranbereich der 16  $\beta$ -Stränge und 7 Turns zuordnen. Die stärksten Abweichungen liegen im Bereich der acht langen Loops.

Konservierte Sequenzcluster liegen vor allem an den N- und C-terminalen Enden des Proteins ( $\beta$ 1 und  $\beta$ 16), strukturell also in dem Bereich, der die Interaktionen zwischen je zwei Porinmonomeren vermittelt und der für den Einbau in die Membran sowie die Assemblierung wichtig ist. Das C-terminale Phenylalanin ist, wie in allen sequenzierten Porinen, auch in Omp32 konserviert [de Cock *et al.*, 1997].



**Abb. 8a:** Multiples Sequenzalignment von Omp32 (P24305) mit Porinsequenzen aus *B. pertussis* (Q04064), *N. gonorrhoeae* (P05430) und *N. meningitidis* (P30690). Sekundärstrukturbereiche von Omp32 sind durch gelb unterlegte Bereiche gekennzeichnet und weisen auf  $\beta$ -Stränge hin. Rot unterlegte Bereiche zeigen die Einstülpung P1 und P2 an. Konservierte Positionen sind in rot unterlegt.



**Abb. 8b:** Sequenzalignment von Omp32 (1) und dem Porin aus *Rhodospseudospira vacuolata* (2). Die Legende entspricht dabei der in Abb. 8a. Die vier in der Pore lokalisierten und konservierten Arginine Arg38, Arg42, Arg75 und Arg133 sind mit einem Stern gekennzeichnet.

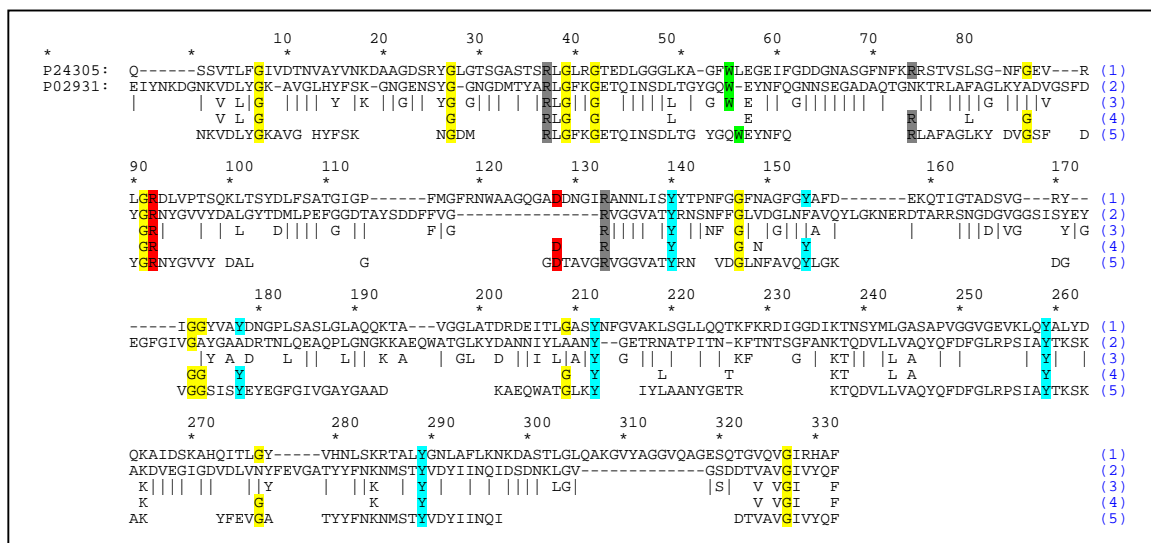
In  $\beta 1$  sind die konservierten AS Val4 und Leu6 hervorzuheben, welche die Bindung eines Porinmonomers zu dem periplasmatisch gebundenen Peptid vermitteln. Zwei weitere AS-Cluster mit hoher Ähnlichkeit befinden sich an dem periplasmatischen Bereich des Porins. Diese für die Monomer-Monomer-Interaktionen verantwortlichen Cluster liegen zwischen Gly40 und Ala54 sowie Ser283 und Thr286. Sie bilden die Kontakte mit 2,55 Å zwischen Glu45 und Ser283` sowie 2,68 Å Länge zwischen



Glu45 zu Thr286` und sind die einzigen polaren und gleichzeitig kürzesten Wechselwirkungen im Kontaktbereich der Porine.

Die Konservierung einzelner AS zeigt, dass Reste innerhalb des Aromatengürtels und Glycine in Turnregionen wichtig zu sein scheinen und nicht ausgetauscht werden können. Einige AS im Bereich des Poreninneren, wie z.B. die Reste der aus R38, R75 und R133 gebildete Argininleiter, sind streng konserviert. Dieses Arginintripel stellt ein, sogar in evolutionär weit entfernten Porinen wie OmpF aus *E. coli* und OmpK36 aus *K. pneumoniae*, wiederzufindendes Struktur- bzw. Funktionsmotiv dar [Dutzler *et al.*, 1999].

Vergleicht man die (I/A) der Sequenz und die strukturelle Abweichung (*rms*) von Omp32 mit anderen Porinen, so betragen diese Werte für OmpF aus *E. coli* (22%/58%, *rms* 1,35 Å) und für die Porine aus *R. capsulatus* (19%/58%, *rms* 1,72 Å), *R. blasticus* (20%/57%, *rms* 1,93 Å) und *K. pneumoniae* (22%/57%, *rms* 1,38 Å). Die Ähnlichkeit zu dem, mit dem mitochondrialen Porin VDAC evolutionär am nächsten verwandten, Protein aus *Paracoccus denitrificans* liegt in dem selben Bereich und beträgt 23%/66% (*rms* 1,53 Å).



**Abb. 9:** Vergleich zwischen Sequenz und Strukturalignierung von Omp32 (P24305) und OmpF (P02931). (1) Omp32-Sequenz, (2) alignierte OmpF-Sequenz, (3) ähnliche (I) und identische Aminosäuren, (4) identische Positionen gemäß dem Strukturalignment, (5) Strukturalignment entsprechend der CA-Positionen.

Ein Analyse von Sequenz- und Strukturalignierung zwischen Omp32 und OmpF, dem auch strukturell ähnlichsten Porin, zeigt signifikante Abweichungen (siehe dazu Abb. 9). Als Beispiel soll hier nur die Sequenzalignierung von Trp56 in  $\beta 3$  von Omp32 mit Trp61 in OmpF erwähnt werden. Trp56 ragt im Strukturalignment mit der Seitenkette in die Pore hinein, wohingegen Trp61 aus OmpF in die Trimerkontaktregion zeigt,

was schon aus einer einfachen Verschiebung der Sequenz um eine Position resultiert.

### 3.1.1b Isolierung und Sequenzierung 54-AS-Peptids

Aus MALDI-MS-Untersuchungen und SDS-Gelen von gereinigten Porinproben sowie auch aus den Röntgenstrukturdaten ging hervor, dass ein Peptid der Größe von 5,8 kD in einem stöchiometrischen Komplex an das Porin gebunden sein musste. Das Peptid ließ sich über hydrophobe Chromatografie durch Bindung an C18-Material aus dem Porin-Peptid-Komplex lösen und isolieren.

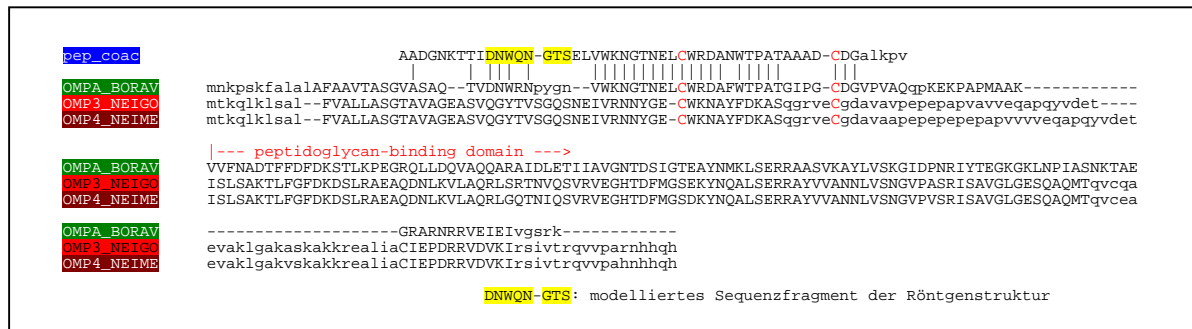
Die Sequenzierung des N-Terminus über Edman-Abbau führte anfangs zu Mischsequenzen. Nach der Spaltung des Peptids mit Trypsin und Chymotrypsin und nach Reinigung der Peptide über RP-HPLC konnten Fragmente den Positionen 4 bis 54 der AS-Sequenz durch partielle Überlappung der tryptischen mit den chymotryptischen Peptide und unterstützt durch Datenbankanalyse zugeordnet werden. Die Masse aller sequenzierten Peptidfragmente wurde parallel immer noch über MALDI-MS geprüft. Die drei noch fehlenden Aminosäuren konnten erst nach Spaltung des N-terminalen Pyroglutamats durch Pyroglutamat-Aminopeptidase und anschließendem Edman-Abbau des Gesamtpeptids bestimmt werden. Die, unter Berücksichtigung des N-terminalen Pyroglutamats, aus der Sequenz berechnete Masse, entsprach am Ende dann genau der durch MALDI-MS ermittelten Masse des Peptids von 5812 D.

Die Sequenz des Peptids in Abb. 10 (pep\_coac) weist eine bemerkenswerte Zusammensetzung seiner AS auf. So finden sich in den 54 AS z.B. vier Tryptophane (8%) sowie zwei Cysteine (4%). Dies führt für eine 1 mg/ml konzentrierte Lösung des in GuaHCl gelösten Peptides bei  $OD_{280}$  zu dem ungewöhnlich hohen theoretischen Extinktionskoeffizienten von 4. Der berechnete pI des Peptids ist 4,33 und damit im Vergleich zu dem für das Porin berechneten von 8,8 deutlich saurer.

Die Alignierung der Peptidsequenz mit Sequenzen der Datenbank führt zu einer Klasse von 20-kD-Proteinen der *Bordetella*- und *Neisseria*-Gruppe. Das 5,8 kD-Peptid lässt sich jedoch nur mit einem kleinen Teilbereich der Proteine alignieren. Im C-terminalen Bereich der 20-kD-Proteine findet sich eine Domäne, auf Grund derer für diese Proteine eine Peptidoglykan-Bindungsfunktion vorhergesagt wird. Ob eine solche Domäne auch im Falle von des Peptides eine Rolle spielt und das dafür

kodierende Genprodukt post-translational oder proteolytisch (während der Reinigung) prozessiert wird, bleibt noch auf DNA-Ebene zu klären.

Die Strukturkontakte zwischen Peptid und Porin werden durch Trp13 ausgebildet, das nur in *B. pertussis* konserviert ist, in den *Neisserien* Proteinen jedoch durch Tyrosine ersetzt wird. Asn12 und Trp13 sind für die Kontakte zwischen den Peptiden verantwortlich und ebenso nur in OmpA aus *B. pertussis* konserviert.



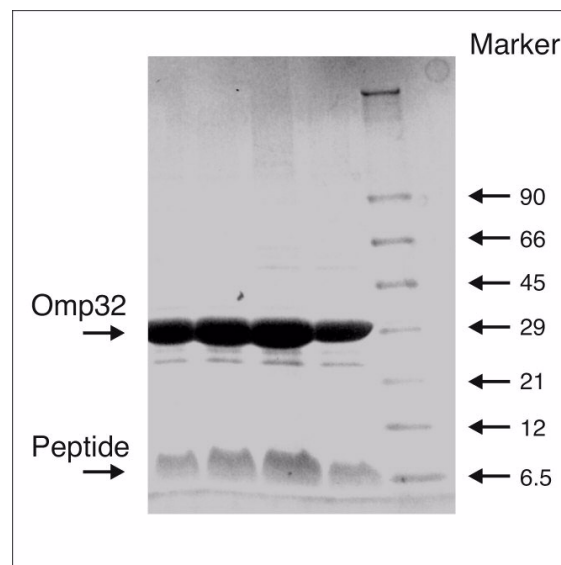
**Abb. 10:** Sequenzalignment zwischen dem 54 AS Peptid (pep\_coac) und Datenbanksequenzen der Proteine Ompa aus *B. pertussis* (SP: Q05146), Omp3 aus *N. gonorrhoea* (SP: P07050) und Omp4 aus *N. Meningitidis* (SP: P38367). Die Alignment weist einen N-terminal überlappenden Bereich zwischen dem Peptid und den alignierten Proteinen aus.

### 3.1.2 Reinigung von Omp32 aus *C. acidovorans*

Omp32 ist ein konstitutives Porins der äußeren Membran von *C. acidovorans*. Die Zellen der Spontanmutante JL-0 konnten deshalb ohne vorherige Induktion für die Proteinproduktion verwendet werden. Nach dem Zellaufschluss wurden die löslichen Proteine über zwei Zentrifugationsschritte von den Membranen abgetrennt, die innere Membran daraufhin durch Zugabe von o-POE solubilisiert und so in Lösung gebracht, während die AM unter diesen Bedingungen durch ihre Bindung an Peptidoglykan intakt bleibt. Nach Zugabe von Lysozym, Inkubation und Degradation des Peptidoglykans bei RT wird Omp32 im letzten Schritt durch Zugabe von o-POE in Lösung gebracht und durch Zentrifugation von unlöslichen Partikeln abgetrennt. Im Überstand nach Zentrifugation befanden sich neben dem Porin in nennenswerten Mengen nur noch das Hitze-modifizierbare Protein Omp21 sowie wenige weitere Proteine im Bereich 70 - 100 kD. Eine Bande bei 6 kD ist neben dem Porin die zweite dominante Bande, bei der es sich um das in 3.1b beschriebene Peptid handelt.

Die Reinigung des Porins wurde in zwei Schritten durch Gelfiltration und Anionenaustausch-Chromatografie durchgeführt. Omp32 kann von letzterem durch Anlegen eines Gradienten bei einer Ionenstärke von 200 - 250 mM NaCl eluiert

werden. Die Reinheit des Proteins, bestimmt über SDS-PAGE unter denaturierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen zeigte auch für Omp32 die typische Eigenschaft aller Porine, erst bei 90 - 100 Grad und Zugabe von SDS, in die Monomere zu zerfallen. Das in Abb. 11 aufgeführte SDS-Gel zeigt das gereinigte Protein nach Anionenaustausch-Chromatografie. Die Molekulargewichte (MW) mit ca. 32 kD für das monomere Porin und etwa 6 kD für das Peptid, beide bestimmt über SDS-PAGE, stimmen mit den berechneten Massen von 34,8 kD bzw. 5,8 kD gut überein.



**Abb. 11:** SDS-PAGE von Porinproben nach Q-Sepharosereinigung. Alle Proben wurden vor der Auftragung in SDS-Puffer erhitzt. Das Gel zeigt nach Coomassie-Färbung Omp32 der monomeren Masse von ca. 32 kD und das Peptid bei ca. 6 kD.

Der Austausch von Detergentien wurde über Dialyse durchgeführt. Im Fall schlecht dialysierbarer Detergentien mit kleiner *cmc* (*critical micellar concentration*) durch Bindung des Proteins an Q-Sepharose und Austausch der Detergentien über intensives Waschen in den entsprechenden Detergentien.

Für die chemischen Modifikationen durch Succinylierung wurde o-POE Porin gegen C8E4 oder DDM in Konzentrationen geringfügig über deren *cmc* ausgetauscht, da sich so präparierte Proben für MALDI-MS und ESI-MS als ideal erweisen [Schnaible *et al.*, 1998]. Zudem konnte das Protein in diesen Detergentien direkt für die Untersuchung der Sekundärstrukturanteile mittels FTIR eingesetzt werden.

Für die ersten 3D-Kristallisationsversuche wurde o-POE gegen C8E4,  $\beta$ -OG, DDM, DEM und LDAO ausgetauscht.

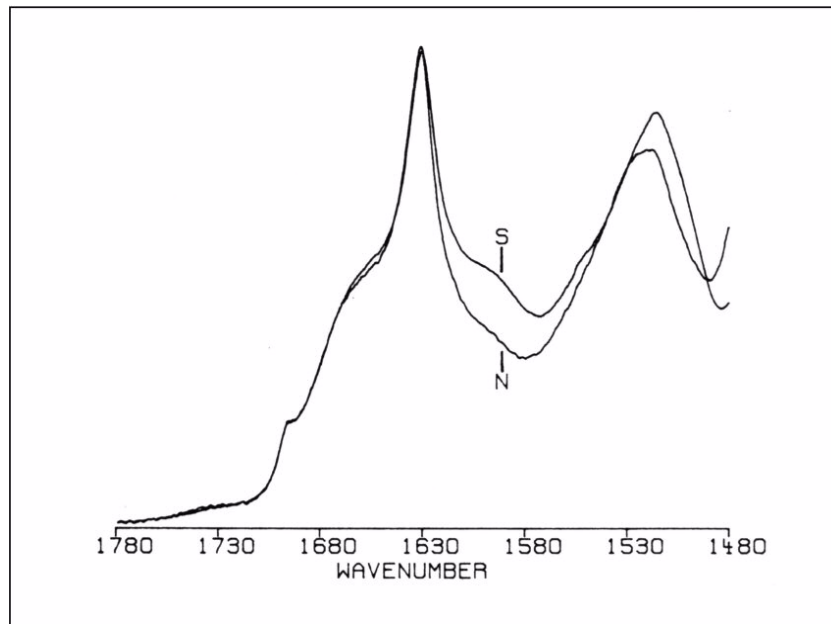
### 3.1.3 Chemische Modifikation und deren Analyse

Chemische Modifikationen stellen eine einfache und schnelle, aber zumeist auch unselektive Methode der Funktionalisierung bzw. topologischen und elektrostatischen Veränderung von Proteinen dar. Für die chemisch induzierte Ladungsveränderung des Porinkanals (bei etwa gleich bleibendem Porendurchmesser) sollte sich eine solche erwartungsgemäß in einer Änderung von Selektivität und Asymmetrie ausdrücken.

Die Umsetzung des Proteins mit Succinanhidrid führt zu einer Umpolung des positiv geladenen Lysinrestes (oder der N-terminalen Aminogruppe) in eine negativ geladene Carboxylatgruppe unter Zunahme der sterischen Ausdehnung der so modifizierten Seitenkette. Der Vorteil dieser Reaktion besteht vor allem darin, dass sie sehr einfach und vor allem unter physiologischen Bedingungen (pH 6,5, Phosphatpuffer) durchzuführen ist. Allerdings führt die Umsetzung, je nach gewählter Versuchsbedingung (Überschuss an Succinanhidrid, Temperatur oder Reaktionsdauer), zu einer heterogenen Mischung unterschiedlich stark modifizierter Proteine.

Neben einer funktionellen Veränderung des Proteins können, nach Lokalisation der chemisch modifizierter Gruppen über MALDI-MS und ESI-MS, auch Aussagen über die Oberflächenzugänglichkeit und damit verbunden die Reaktivität der Lysine getroffen werden. Eine sorgfältige Analyse aus einer Kombination von massenspektrometrischen und enzymatischen Methoden sowie chemischen Modifikationen kann am Ende sogar zu einer begrenzten Aussage über die Tertiärstruktur des Proteins ohne vorherige Kenntnis der Topologie führen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass mit der Modifikation auch immer eine leichte strukturelle Veränderung einhergeht und deshalb die Strukturhaltung und damit die relativen Anteile der Sekundärstrukturen nochmals überprüft werden müssen.

Eine Veränderung der Sekundärstrukturen kann durch die Aufnahme von FTIR-Spektren der unmodifizierten (Omp32) und modifizierten Proteinproben (S100) untersucht werden. Für die Succinylierung wurden Verhältnisse von Succinanhidrid zu Lysinogruppe von 1:2 (S05) bis 100:1 (S100) eingesetzt und das am höchsten modifizierte Derivat, welches naturgemäß die größte strukturelle Veränderung erfahren sollte, über FTIR-Spektroskopie untersucht.

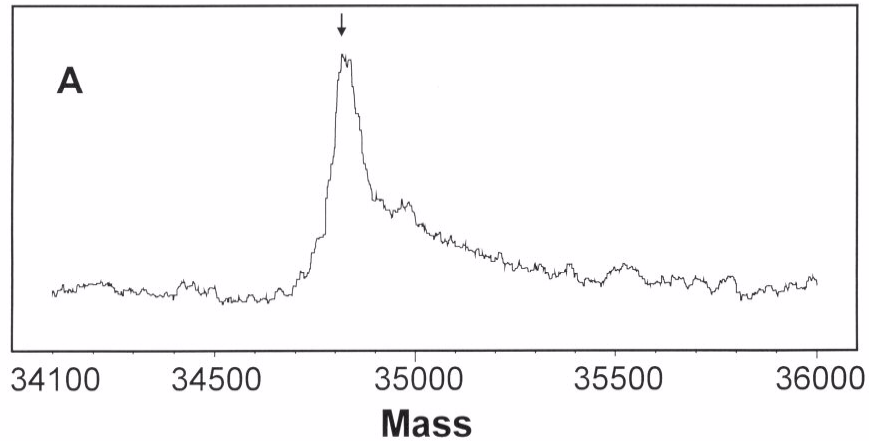


**Abb. 12:** FTIR-Spektren von Omp32N (N) und S100 (S) im Bereich von 1480 - 1780  $\text{cm}^{-1}$ .

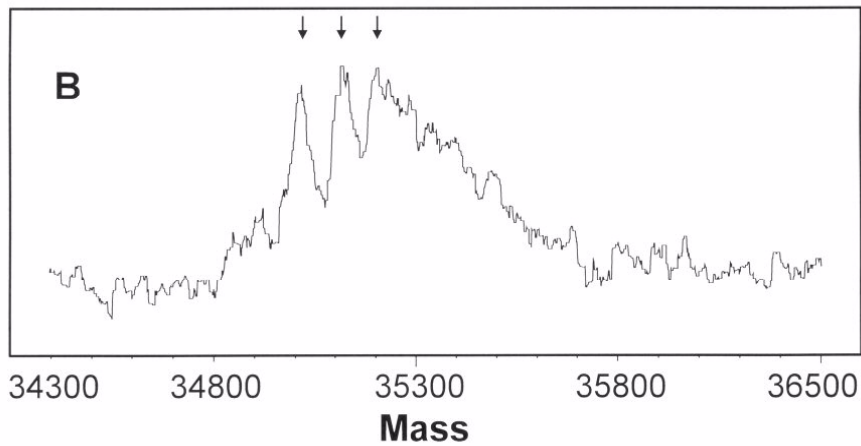
Die überlagerten FTIR-Spektren von Omp32N und S100 im Bereich der Amid (I)- und (II)-Bande sind in Abb. 12 gezeigt. Aus diesen geht hervor, dass eine spektrale Veränderung in den Bereichen um 1510 und 1590  $\text{cm}^{-1}$  auftritt, die sich am besten durch die Carboxylatschwingungen der 15 - 17 zusätzlichen SA-Gruppen in S100 erklären lässt. Eine Veränderung in der Amid I Bande (1630  $\text{cm}^{-1}$ ), die den Anteil der  $\beta$ -Anteile widerspiegelt, ist keine Änderung zu erkennen.

Der Nachweis der Succinylierungsstellen kann über ESI-MS- und MALDI-MS-Daten durchgeführt werden. Die gesamte Proteinmasse, und für Proteingemische auch deren relative Verteilung, kann am genauesten mit ESI-MS oder hochaufgelösten MALDI-MS-Spektren ermittelt werden.

Die Gesamtmasse von 34820 D für das native Protein wurde über ESI-MS bestimmt und gibt die aus der AS-Sequenz errechnete Masse von 34796 sehr gut wieder (ESI-Spektrum in Abb. 13). Die Molekulargewichtsbestimmung eines Proteingemisches der modifizierten Probe S1 ergibt eine Massenverteilung mit den Massen 35020, 35120 und 35220 D entsprechend einer Mischung aus zwei-, drei- und vierfach succinylierten Porinen in annähernd äquivalenten molaren Anteilen (siehe Abb. 14).



**Abb. 13:** Massenbestimmung von nativem Omp32 über ESI-MS. Der Pfeil weist auf das Maximum des Massenpeaks bei 34820 hin.

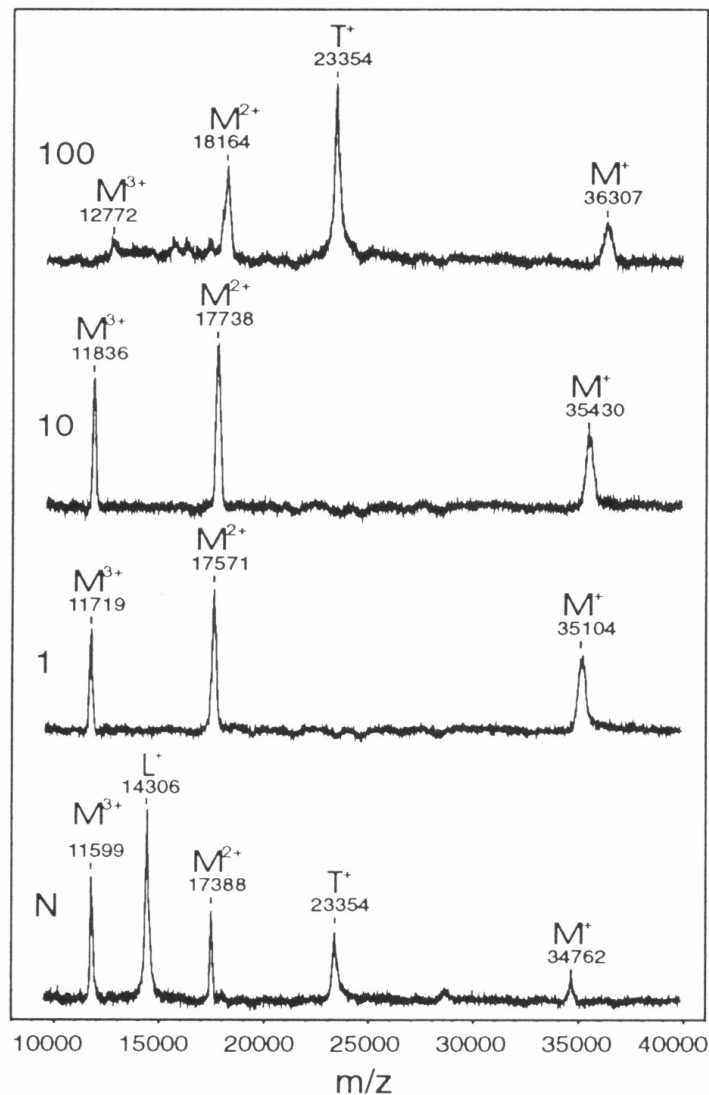


**Abb. 14:** Massenbestimmung von succinylierten Derivaten über ESI-MS. Die drei Pfeile weisen auf drei unterschiedliche molekulare Massen von 35020, 35120 und 35220 D mit den erwarteten Masseninkrementen hin.

Die für S1 durch MALDI-MS bestimmte durchschnittliche Masse von 35104 D und der korrespondierende Succinylierungsgrad von  $\sim 3$  stimmt mit dem aus ESI-MS-Daten hervor gehenden gut überein. Weiterhin wurden auch die durchschnittlichen Massen der Derivate S10 und S100 über MALDI-MS bestimmt, deren Massen und durchschnittlicher Succinylierungsgrad in Tabelle 1 aufgeführt ist.

	<b>S1</b>	<b>S10</b>	<b>S100</b>
<b>m/z</b>	<b>35104</b>	<b>35430</b>	<b>36307</b>
<b>SA</b>	<b>3,5</b>	<b>7</b>	<b>15,5</b>

**Tab. 1:** Massenbestimmung (m/z) der succinylierten Proben S1, S10 und S100 über MALDI-MS und deren durchschnittlicher Succinylierungsgrad (SA).



**Abb. 15:** MALDI-MS Spektren von nativem (N) und chemisch modifizierten Proben, in denen das Verhältnis von SA zu Lysin-Gruppe 1:1 (1), 10:1 (10) und 100:1 (100) gewählt wurde. Die Spektren wurden teilweise intern mit Trypsin (T<sup>+</sup>) und Lysozym (L<sup>+</sup>) kalibriert.

Die strukturelle Lokalisation der Modifikationen innerhalb des Proteins kann im einzelnen erst nach dem enzymatischen Verdau und der Massenbestimmung der Peptid-Fragmente über MALDI-MS ermittelt werden. Außer dem tryptischen Proteinabbau (oder anderen spezifischen Proteasen) bietet sich hierfür auch die chemische Spaltung nach Methioninen mit Bromcyan an, durch die drei (oder im Falle unvollständiger Spaltung vier) Partialfragmente erwartet werden können.

Das Porin und die Derivate S05 - S100 wurden nach Denaturierung in Harnstoff mit Trypsin proteolytisch gespalten und die Massen der Peptidgemische sowie die der über RP-HPLC gereinigten Peptidfragmente durch MALDI-MS bestimmt und den aus der Sequenz nach Trypsinspaltung abgeleiteten Massen zugeordnet.



Die Resultate der Bromcyanspaltung sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die maximale Zahl an succinylierten Lysinen pro Fragment beträgt dabei sieben. Für die Lokalisation der Modifikationen grenzt der Bromcyanabbau die Succinylierungen jedoch nur auf die Gesamtzahl pro Fragment ein, nicht aber auf ihre topologische Verteilung. Eine Succinylierung von Fragment 1 (F1) trat erst bei einem einhundertfachen Überschuss an Succinanhidrid auf. Die Anzahl der chemischen Modifikationen in F2 konnte für einige der Proben nicht bestimmt werden. Im Fall von S100 zeigt sich eine nahezu vollständige Succinylierung aller drei Fragmente.

	1,5 (S05)	3 (S1)	4 (S2)	6,5 (S10)	10 (S50)	14 (S100)	
F1 (1-116)	0	0	0, 1	0, 1, 2	2, 3	3, 4	19, 52, 74, 100
F2 (117-242)	-	-	1, 2	2	-	-	159, 193, 218, 227, 229, 237
F3 (243– 332)	0, 1	-	1, 2, 3	2, 3, 4	4, 5	5, 6, 7	256, 265, 270, 284, 296, 298, 308
F2+3 (117-332)	1, 2	2, 3	3	4, 5	-	11	Siehe oben

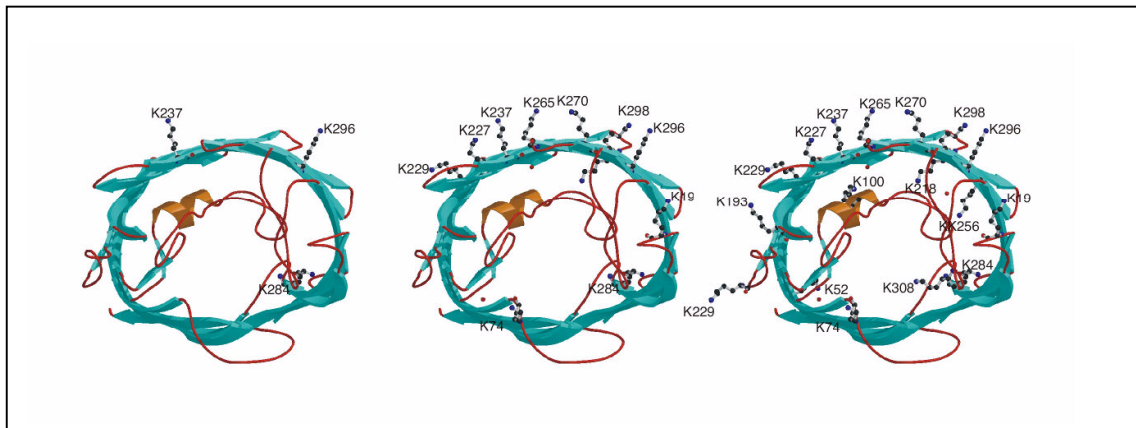
**Tab. 2:** Fragmente der succinylierten Proben (S05 - S100) nach Bromcyanspaltung. Drei Fragmente (F1 - F3) entstehen nach vollständiger Spaltung, vier bei unvollständiger. Die Anzahl der Modifikationsstellen und der innerhalb der Fragmente enthaltenen Lysinreste ist angegeben.

Um die Modifikationsstellen den im Protein enthaltenen Lysinresten zuzuweisen, wurden die Proben S05 - S100 auch mit Trypsin enzymatisch gespalten und die Gemischspektren sowie die über HPLC getrennten Peptide über MALDI-MS analysiert.

Reaktivität	Modifiziertes Lysin
<i>hoch</i>	K237, K284, K296
<i>mittel</i>	K19, K74, K218, K227, K229, K265, K270, K298
<i>gering</i>	K52, K100, K159, K193, K256, K308

**Tab. 3:** Analyse der modifizierten Lysine und Zuordnung in drei Gruppen unterschiedlich reaktiver Lysine.

Aus Trypsinspaltung und Bromcyanabbau ergibt sich für die 17 im Porin enthaltenden  $\epsilon$ -Aminogruppen folgende Einteilung in hoch, mäßig und gering reaktive Lysingruppen (siehe obige Tabelle und unten aufgeführte Abbildung):



**Abb. 16:** Topview von Omp32 in der extraplasmatischen Sicht. Die Abbildung zeigt die Abstufung der reaktivsten Lysine (linkes Bild), der weniger reaktiven (mittleres Bild) und der Lysine, die erst bei einem hohen Überschuss von SA modifiziert werden (rechtes Bild).

Ein Vergleich der Succinylierungsstellen mit der Röntgenstruktur des Porins führt zu einer Korrelation zwischen Topologie und Reaktivität. Die Erklärung für diese Korrelation basiert dabei hauptsächlich auf kinetischen Betrachtungen, da die Bindungsenergie und damit der thermodynamische Beitrag einer Succinylierung weitgehend unabhängig von deren Lage innerhalb des Proteins sein dürfte und deshalb bei jeder Addition dieselbe Energie freigesetzt werden sollte. Deshalb sollte die Oberflächenzugänglichkeit und partiell die elektrostatische Umgebung der Lysine der reaktions-bestimmende Schritt sein.

Nach McConolly lässt sich die Proteinoberfläche, bestimmt durch eine über die Oberfläche rollende Kugel variablen Radius (entsprechend dem Lösungsmittel; bei Wasser: Radius 1,4 Å) aus der *contact area* (direkt zugänglich) und der *reentrant area* (mehrere radiale Wechselwirkungen mit der Oberfläche) zusammensetzen. Ein Vergleich dieser Conolly-Oberflächen von Omp32 mit den aus MALDI-Daten erhaltenen Reaktivitäten zeigt, dass genau jene Lysine mit einer hohen Zugänglichkeit (große *contact area*) auch die höchste Reaktivität zeigen, während die in der Pore sterisch abgeschirmten Lysine eine viel geringere Reaktivität aufweisen. Zwei der reaktivsten Lysine, Lys237 und Lys296 bilden, wie in Abb. 16 gezeigt, einen Teil des in Abschnitt 3.1.10 diskutierten Lysingürtel. Das dritte Lysin dieser Gruppe ist Lys284. Es befindet sich in Turn7 und ist damit entsprechend obiger Festlegung ebenfalls sterisch gut zugänglich. Führt man die Succinylierung mit einem größeren Überschuss an SA durch, so werden bei einem 10-fachen Überschuss fast alle weiteren Lysine des Lysingürtels modifiziert. Die Ausnahme bilden Lysine, die sich in der Nähe des Trimerkontaktbereiches (Lys229) befinden oder durch L8 verdeckt sind. Sieht man sich das Reaktionsmuster in S100 - der Probe mit dem höchsten SA-

Überschuss an - so sind hier nahezu alle Lysine modifiziert. Unter diesen Bedingungen werden sogar Lysine mit sterisch schlecht zugänglichen Seitenketten bzw. Lysine im Poreninnern succinyliert.

Das 54-AS-Peptid besitzt, wie aus MALDI-Spektren nach Succinylierung und aus der Peptidsequenz hervorgeht, weder modifizierbare Lysine noch einen modifizierbaren N-Terminus und kann deshalb auch nicht succinyliert werden.

Die Untersuchung der chemisch modifizierten Porine auf deren veränderte Leitfähigkeitseigenschaften hin erbrachte keine Ergebnisse und somit auch keine neuen funktionellen Daten, die im Hinblick auf eine Veränderung im Selektivitäts- oder Schließverhalten ausgewertet werden könnten.

### 3.1.4 3D-Kristallisation und Röntgenkristallografie

Die Messung der dynamischen Lichtstreuung an Proteinlösungen und Vesikeln ermöglicht Aussagen über deren Homogenität auf molekularer Ebene. Da die Homogenität der Lösung einen für die 3D-Kristallisation sehr wichtigen Parameter darstellt, kann durch die Messung der Lichtstreuung der Erfolg des Kristallisationsexperiments abgeschätzt werden [Hitscherich *et al.*, 2000]. Prinzipiell lassen sich dabei durch DLS die Teilchendurchmesser und die Verteilung der Partikelradien in Abhängigkeit von den gewählten Pufferbedingungen ermitteln.

Omp32 wurde für diese Messungen in verschiedene Detergentien überführt. DLS-Messungen wiesen auf eine monodisperse Verteilung der Teilchen hin wie die in Tabelle 4 aufgeführten Werte beweisen. So liegen die Basislinie und Polydispersitätswerte bei Werten um 1 für Omp32 und S100. Dies bedeutet, dass nahezu ideale Ausgangswerte für Kristallisationsansätze vorliegen.

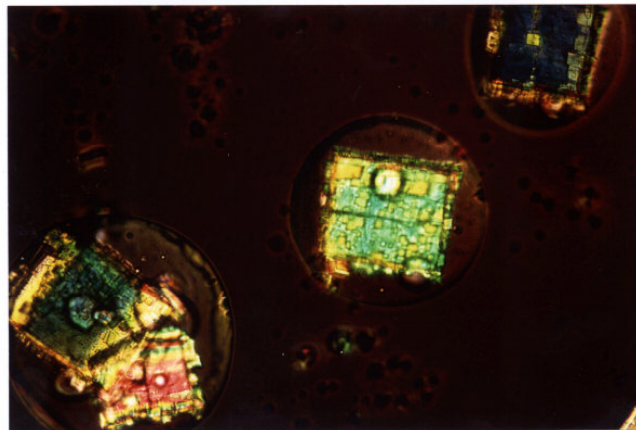
<b>Probe</b>	<b>Hydrodynamischer Radius</b>	<b>Polydispersität</b>	<b>Berechnetes Molekulargewicht</b>	<b>Baseline</b>
<b>Omp32</b>	<b>4,6</b>	<b>1,05</b>	<b>120</b>	<b>1.000</b>
<b>S100</b>	<b>4,7</b>	<b>1,14</b>	<b>122</b>	<b>1.001</b>

**Tab. 4:** Ergebnisse der DLS-Messungen an Omp32 und S100. Die ermittelten Parameter sind der hydrodynamische Radius, die Polydispersität, das daraus abgeleitete MW und ein Baseline Faktor.

Kristallisationsansätze unter Verwendung der Jankaric-Matrix ergaben 20 verschiedene Kristallisationsbedingungen, wenn das Protein in  $\beta$ -OG-Detergensmicellen vorlag. Keines der anderen getesteten Detergentien führte zu

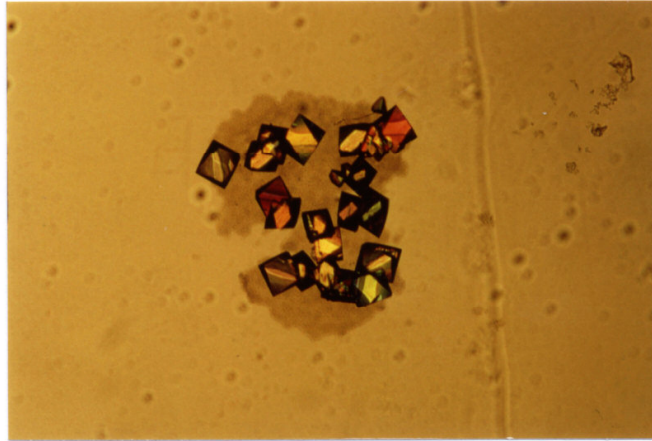
weiteren verwertbaren Kristallisationsbedingungen. Unter den für die Kristallisation eingesetzten Fällungsmitteln waren Salze wie  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  und  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aber auch PEG4K und PEG8K im pH-Bereich von 4,5 - 8,5. Aus einem Vergleich der Kristallisationsbedingungen und nach Abschätzung der Kristallgröße, wurde  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  und  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als Fällungsmittel zur weiteren Verfeinerung der Bedingungen ausgewählt. Schon 100  $\mu\text{m}$  große Kristalle der Matrix zeigten an einer Röntgenanode Reflexe bis 3 Å.

Die Raumgruppe und Zellkonstanten der Kristalle wurden durch Indizierung mit XDS und DENZO eindeutig bestimmt. Die Raumgruppenbestimmung der unter  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  gewachsenen Kristalle in KF1 ergab Zellkonstanten von  $a = b = 106,7 \text{ \AA}$  und  $c = 140,6 \text{ \AA}$ . Die Kristalle wuchsen, wie in Abbildung 17 gut erkennbar, in proteinreichen Phasen und zeigten im Lichtmikroskop eine starke Doppelbrechung. Auf der Oberfläche des Kristalls erkennt man kleine Mikrokristalle, die als Keime für das weitere Kristallwachstum verantwortlich sein können.



**Abb. 17:** Kristalle der Kristallform 1 von Omp32 gewachsen in proteinreichen Phasen. Die Kristalle in Polarisierung zeigen eine plättchenförmige Morphologie mit einer Kantenlänge von etwa  $250 \times 250 \times 200 \mu\text{m}$ . Man erkennt sehr schön, dass die durch den Proteinreichen Tropfen vorgegebene Grenze das Kristallwachstum beschränkt.

Unter den  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Bedingungen bildeten sich zwei verschiedene Kristallformen, von denen die eine in ihren Zellkonstanten KF1 entsprach. Kristalle der zweiten Form (KF2) wuchsen unreproduzierbar nur in wenigen Ansätzen nach 4 - 6 Monaten und bildeten sich aus präzipitiertem Protein. Kristalle dieser Form waren oft von ausgefallenem Protein (grauer Schleier im Hintergrund) umgeben und sind in Abb. 18 dargestellt. Die Auswertung von Raumgruppe und Zellkonstanten ergab die Werte für  $a = b = 87,13 \text{ \AA}$  und  $c = 135,28 \text{ \AA}$ .



**Abb. 18:** Doppelbrechende Kristalle der Kristallform II. Die Kristalle in Polarisation zeigen eine kubische oder oktaedrische Morphologie mit einer Kantenlänge von etwa 250 x 250 x 250  $\mu\text{m}$ . Die Kristalle wuchsen aus Proteinpräzipitat, das im Hintergrund der Kristalle als brauner Schleier zu sehen ist.

Daten beider Kristallformen (KF1 und KF2) wurden unter Ausnützung der intensiven kohärenten Synchrotronstrahlung bei RT an der Beamline BW6 (DESY) gesammelt und sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

	<b>KF1</b>	<b>KF2</b>	<b>K<sub>2</sub>Pt(Cl)<sub>4</sub>-DER</b>
<b>Raumgruppe</b>	R3	R3	R3
<b>Zellkonstanten (Å)</b>	a = 107,25 b = 107,25 c = 140,60	a = 87,1 b = 87,1 c = 135,28	a = 107,34 b = 107,34 c = 140,46
<b>Auflösung (Å):</b>	2,1	2,4	3,2
<b>Wellenlänge (Å):</b>	0,8	0,8	1,541
<b>Vollständigkeit:</b> <b>Overall (%)</b> <b>Äußerster Auflösungsbereich (%)</b>	89,1 91,6	96,2 94,3	99,8 100
<b>Rmerge:</b> <b>Overall (%)</b> <b>Äußerster Auflösungsbereich (%)</b>	11,2 45,9	8,9 37,6	12,5 38,1
<b>Kristallwasser in %:</b>	73	55	73

**Tab. 5:** Zusammenstellung der Kristallparameter von KF1 und KF2.

### 3.1.5 Molekularer Ersatz und Suche nach Schweratomderivaten

Die Strukturlösung über Molekularen Ersatz führte bei Omp32 zu keiner eindeutigen Lösung bei der Suche nach der Rotationsfunktion, weshalb alternativ dazu Schweratomderivate zur Phasenbestimmung mittels SIR bzw. MIR gesucht wurden. Neben den häufig verwendeten Platin- und Quecksilbersalzen wurden Kristalle auch mit Uran-, Lanthan- und Bleiverbindungen inkubiert und verschiedene Konzentrationen getestet. Die Kristalle wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten vermessen. Alle Schweratomlösungen wurden in Wasser, Puffer oder direkt im Fällungsmittel gelöst und mit den Proteinkristallen co-kristallisiert. Morphologisch unbeschädigte Kristalle wurden ohne vorheriges *backsoaking* direkt in Quarzglaskapillaren überführt und auf ihre Beugungseigenschaften getestet. Bei ausreichender Qualität wurden Datensätze aufgenommen. Auf diese Weise wurden 65 Derivat-Datensätze unterschiedlichster Datenqualität (Auflösung, Mosaizität) gesammelt und ausgewertet.

Unter allen gemessenen Derivaten wurden schwache Derivate mit gering besetzten Bindungsstellen oder Bindungsstellen mit hohen Temperaturfaktoren aus der weiteren Auswertung genommen. In die Phasenbestimmung floss letztlich nur der Beitrag eines einzigen  $K_2Pt(Cl)_4$ -Derivates ein (SIR-Lösung). Unter Berücksichtigung des starken anomalen Pt-Signals wurden drei Schweratombindungsstellen über Differenzpatterson- bzw. Differenzfourier-Methoden identifiziert und in den Programmen Darefi oder SOLVE verfeinert, was zu einer *figure of merit* (FOM) von 0,45 im Auflösungsbereich 20 - 3,5 Å führte. Weder die dadurch berechnete unkorrigierte noch die Solvens-korrigierte Elektronendichte waren jedoch von ausreichender Qualität für den Modellbau. Allerdings waren in diesen SIR-Dichten erstmals die molekularen Umriss des Proteins nach Solvenskorrektur zu erkennen. Die Verfeinerung aller Schweratomparamter mit dem Programm SHARP führte schließlich vor Solvenskorrektur zu einer FOM von 0,51 im Auflösungsbereich von 20 - 2,9 Å, und nach Korrektur des Lösungsmittels zu einer FOM von 0,72 und einer interpretierbaren Elektronendichtekarte.

### 3.1.6 Modellbau und Strukturverfeinerung

Ausgehend von dem in die Dichte plazierten OmpF-Modell wurden Omp32-Reste unter Verwendung der experimentellen Phasen in die SIR-Dichte gebaut. Ein Modell, in dem 300 der 332 Proteinreste enthalten waren, wurde erstmals über Molekulardynamik verfeinert. Unter Verwendung der geometrischen *restraints* wurden die Koordinaten gegen die Synchrotrondaten der Kristallform 1 bis 2,1 Å verfeinert. Das Gewicht der *constraints* wurde den Gradienten vor der Verfeinerung entnommen und während der Verfeinerung schrittweise erhöht. Nach den Verfeinerungszyklen wurde das Modell anhand der SIR- und  $3F_O-2F_C$ -Elektronendichten überbaut, bis alle 332 AS in die Dichte eingepasst waren. Sobald der kristallografische R-Faktor auf Werte unter 30% gesunken war, wurden unter Verwendung automatischer Routinen sukzessive Wassermoleküle in Differenzdichten mit Werten von größer als 3,5 Sigma entsprechend stereochemischen Vorgaben (Abstand etc.) eingebaut und zusammen mit dem Proteinmodell verfeinert. Positive Differenzdichte im Bereich des N-Terminus und am periplasmatischen Porenausgang wurde durch den Einbau von acht AS des 54-AS-Peptides modelliert. Weitere Differenzdichten im Poreninnern und im Bereich von Loop7 und 8 wurde entsprechend der Proteingeometrie durch Sulfat- und  $Ca^{2+}$ -Ionen erklärt und modelliert. Abschließend wurden die B-Faktoren aller Atome (Protein und Wasser) anisotrop verfeinert.

Im Laufe der Verfeinerung fiel der durch Fourier-Rücktransformation ermittelte R-Faktor zwischen  $F_O$  und  $F_C$  von 42,1 auf 19,6%, während der für 5% der aus der Verfeinerung genommenen Reflexe bestimmte freie R-Faktor von 48,1 auf 22,9% fiel. Die Verfeinerungsstatistik für die Modelle KF1 und KF2 sind in Tab. 6 wiedergegeben. Bis auf die zwei Nicht-Glycin Aminosäuren Ser2 und Asp299 liegen alle AS des verfeinerten Modells in konformell erlaubten Regionen des Ramachandranplots.

Die Besetzungszahl des Sulfations wurde auf 0,5 gesetzt, wonach die resultierenden B-Faktoren nach der Verfeinerung bei 45 lagen und denen der molekularen Umgebung entsprachen. Die Besetzungszahl des  $Ca^{2+}$ -Ions wurde auf 1 belassen und der B-Faktor von 20 entspricht hier sehr gut der molekularen Umgebung. Der B-Faktor der in  $\beta$ -Strängen lokalisierten Reste sind kleiner als die der Loopbereiche. Tab. 6 zeigt die Verfeinerungsstatistik der zwei Porinmodelle:

	KF1	KF2
<b>Auflösungsbereich (A)</b>	20 - 2,1	20 - 2,3
<b>Anzahl der Reflexe</b>	31811	14928
<b>R-faktor (R-free)</b>	0,19 (0,23)	0,24 (0,28)
<b>Anzahl der Atome in Verfeinerung:</b>		
<b>Protein</b>	2480	2480
<b>Wasser</b>	98	34
<b>Peptid</b>	60	60
<b>Sulfat</b>	5	5
<b>Calcium</b>	1	1
<b>Durchschnittliche B-Faktoren</b>	33,6	38,7
<b>Rms Abweichung</b>		
<b>Bindungen</b>	0,0063	0,0097
<b>Bindungswinkel</b>	1,42	1,78

**Tab. 6:** Übersicht der Verfeinerungsparameter von Omp32 aus KF1 und KF2.

### 3.1.7 Kristallpackung und Strukturbeschreibung

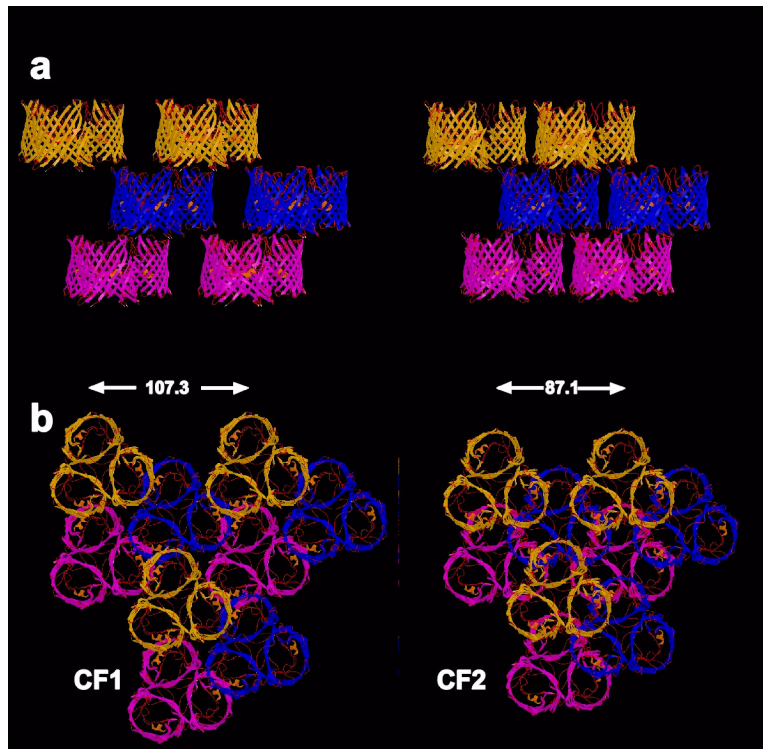
Der Protein (a)-peptid (b)-Komplex kristallisierte in zwei Kristallformen als (ab)-Komplex pro asymmetrische Einheit (AU). KF1 weist lange Zellkonstanten in der xy-Ebene von R3 auf, während KF2 bei nahezu identischen Dimensionen in z-Richtung um ca. 23 Å kürzere Zellkonstanten in xy-Richtung zeigt. Die Abfolge einzelner Proteinschichten in der rhomboedrischen Raumgruppe R3 ist:

**.... ABC ABC ABC ....**

Drei dieser Schichten - und damit die repetitive Einheit in Z - sind in Abbildung 19 für die beiden Kristallformen in der Seitenansicht und Aufsicht gezeigt.

Nach einem von Hartmut Michel entworfenen Konzept lässt sich die Packung in Membranproteinkristallen in zwei Klassen einteilen [Michel, 1992]. Kristalle, in denen der laterale Abstand zwischen den Proteinen sehr groß ist und deshalb keine Protein-Protein-Wechselwirkungen zulässt, werden als Typ2-Proteinkristalle bezeichnet. Die stabilisierende Wechselwirkung innerhalb des Kristalls wird in diesen Fällen durch vertikale Wechselwirkungen zwischen den Proteinschichten ausgebildet und den Beitrag hydrophober Wechselwirkungen zwischen den die Proteine umgebenden Detergensmicellen.





**Abb. 19:** Darstellung der Kristallpackung von KF1 (CF1) und KF2 (CF2). In a ist die Aufsicht, in b die Seitenansicht der beiden Kristalle gezeigt. Der Abstand zwischen zwei Symmetrie-verwandten Punkten beträgt in KF1 107,3 Å, in KF2 87,1 Å.

Der kleinste laterale Abstand innerhalb einer Proteinebene zwischen zwei Porintrimeren beträgt in KF1 23 Å. Kontakte innerhalb dieser Schicht können deshalb allenfalls durch Ausbildung eines torroidalen Detergensgürtels und hydrophober Kontakte zwischen diesen formiert werden. Im Fall von KF2 nähern sich die Porintrimere lateral einander so stark an, dass es zu Wechselwirkungen zwischen ihnen kommen kann. Diese Anordnung, in der sowohl vertikale als auch laterale Kontakte ausgebildet werden, entspricht eher den Typ1-Kristallen obiger Definition. Die laterale Assemblierung innerhalb einer Schicht in KF2 ähnelt dabei sehr stark denjenigen, die in vielen 2D-Kristallen von Membranproteinen und im speziellen von Porinen vorgefunden wird. Der kürzeste Abstand beträgt hier ca. 4 Å und wird maßgeblich durch das nach außen gerichtete positive Potential des Lysingürtel mitbestimmt.

Die vertikalen Kristallkontakte werden im Fall KF1 durch sehr schwache hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Resten aus Turn4 der Schicht A und Loop6 aus Schicht B ausgebildet sowie durch Wechselwirkungen von Resten aus Turn5 (A) und Loop5 (B). Da die Abstände zwischen zwei benachbarten Atomen der die Kontakte vermittelnden Reste größer als 3,5 Å sind, wird auch nach eingehender Analyse der Wechselwirkungen nicht deutlich, welche Faktoren letztlich zu der Stabilisierung der

Proteinschichten in KF1 beitragen. Da die Abstände zwischen den genannten Turns und Loops für einen großen Energiebeitrag zu lang sind, bleibt nur die Vermutung, dass die Detergensgürtel eine Rolle bei der Stabilisierung spielen.

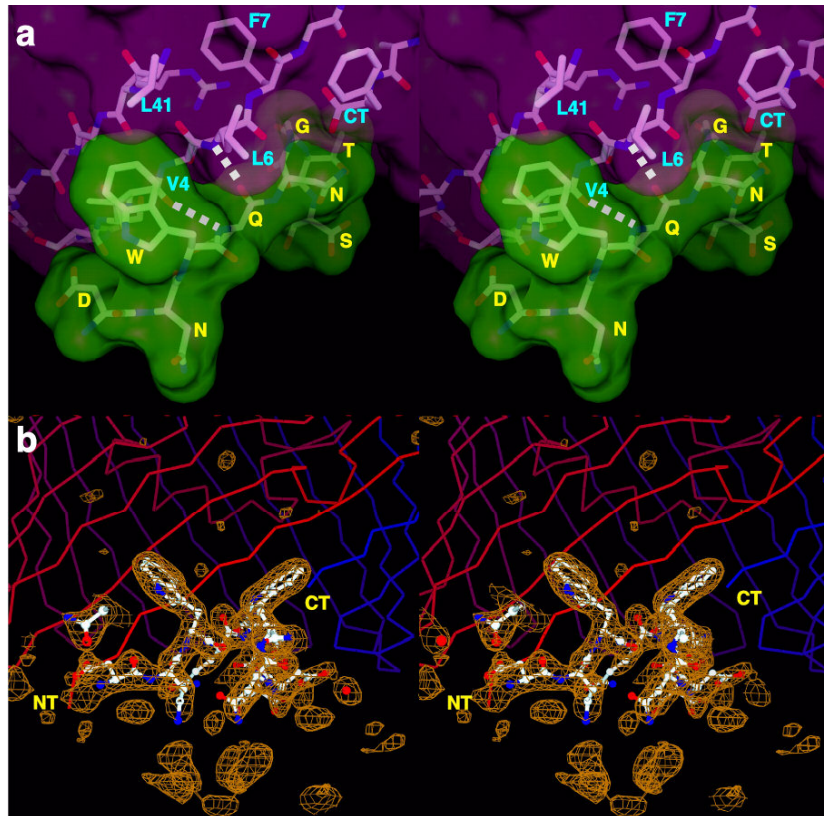
Anders in KF2, in der sich eine Vielzahl von Wechselwirkungen im Bereich von 3 - 4 Å finden, die hier jedoch nicht im Detail besprochen werden sollen, da sie sich unter anderem in einem der ungeordneten und deshalb nur schwer modellierbaren Loops befinden. Entsprechend den Zellkonstanten weist KF1 einen Solvensgehalt von 73% auf, während dieser im Falle von KF2 entsprechend der kürzeren Zellachsen bei etwa 55% liegt.

### 3.1.8 Strukturbeschreibung des Peptid-Komplexes

Alle 331 natürlichen AS und das N-terminale Pyroglutamat des Porins konnten entsprechend der SIR-phasierten Dichten modelliert wurden. Nach deren Verfeinerung verblieb im Bereich der Trimerachse in 3F<sub>O</sub>-2F<sub>C</sub> und F<sub>O</sub>-F<sub>C</sub>-Karten eine nicht mit der Porinsequenz interpretierbare Dichte, die letztlich mit einem Fragment des 54AS-Peptid modelliert werden konnte. Nach Analyse der Dichte wurde jedoch deutlich, dass diese nur partiell interpretierbar folgende AS des Peptids enthielt:

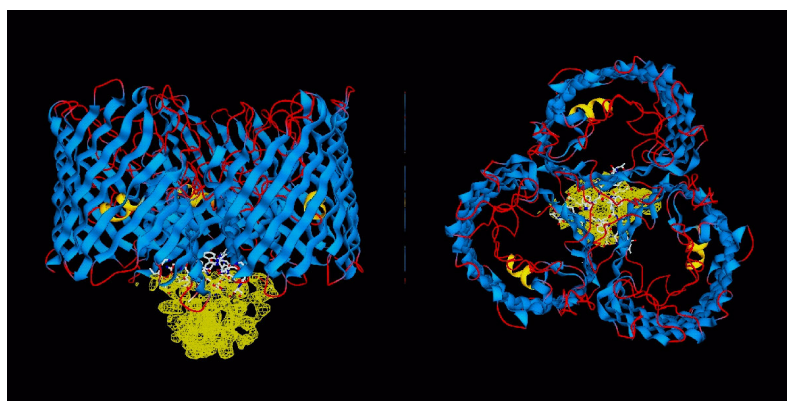


die entsprechend den Resten 11 - 18 in der Peptidsequenz modelliert wurden. Das Peptid zeigt keine eindeutigen Sekundärstrukturen. Die Verbindung zwischen Peptid und Porin wird durch Wasserstoffbrücken vermittelt. Diese werden zwischen den CO- bzw. NH-Gruppen des peptidischen Glutamins und Leu6-NH bzw. von Val4-CO des Porins ausgebildet. Auch zwischen den kristallografisch verwandten Peptiden existieren Wechselwirkungen über je zwei Wasserstoffbrücken zu den benachbarten Peptiden, die zu einer inneren Stabilisierung des Peptidtrimers beitragen. Zusätzlich finden sich hydrophobe Interaktionen zwischen der Tryptophanseitenkette und einer hydrophoben Tasche des Porins, die aus Val4, Leu6 und Leu41 geformt wird. Abb. 20 zeigt die Lokalisation des Peptids und seine Wechselwirkungen mit dem N-terminalen Bereich des Porins.



**Abb. 20:** (a) Stereobild der Oberflächendarstellung des Peptids (grün) und des Porins (violett). Die Peptidsequenz ist in gelben, die Porinsequenz in hellblauen Lettern angegeben. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptid und Porin sind in Form von gestrichelten Linien angedeutet. (b) Stereobild einer Differenzelektronendichte berechnet mit den Porinphasen. Das Peptid ist als *Ball-and-stick*-Gerüst modelliert.

Der größere Teil der  $F_O$ - $F_C$ -Dichte kann mit den acht modellierten AS nicht erklärt werden. Trotzdem lässt sich die Ausdehnung der trimeren Peptidomäne in Z-Richtung durch eine Darstellung der Differenzdichte bzw. der SIR-phasiierten Dichte mit einer Ausdehnung von ca. 15 Å abschätzen. In Abb. 21 ist das Porin-Peptidtrimer in der Seitenansicht und Aufsicht abgebildet. Die nicht interpretierte SIR-Elektronendichte ist darin in gelb dargestellt.



**Abb. 21:** Omp32 in der Seitenan- und Aufsicht. Das Peptid ist *in ball-and-stick*-Darstellung abgebildet. Der Teil der nicht interpretierbaren SIR-Dichte ist bei  $1\sigma$  dargestellt.

### 3.1.9 Die Porinstruktur

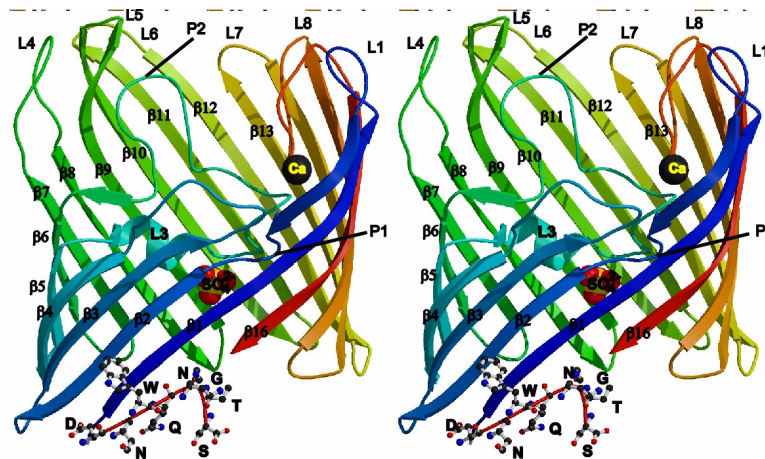
Die verfeinerte Porinstruktur enthält 331 AS und ein N-terminales Pyroglutmat als nicht natürliche AS, entsprechend 2480 verfeinerten Atomen. Alle AS besitzen gute Haupt- und Seitenkettendichte und wurden nach SIR-phasierten und  $3F_O-2F_C$ -Karten gebaut. Mit diesem Modell wurde über molekularen Ersatz die Struktur von KF2 gelöst. Da die KF2-Struktur in zwei Loopbereichen ungeordnet war und verschiedene Seitenketten keine Dichte oder multiple Konformationen zeigen, soll hier nur die vollständige KF1-Struktur diskutiert werden.

Das Porin wird durch ein antiparalleles  $\beta$ -Barrel aufgebaut, dessen 16 Stränge Wechselwirkungen zu den zwei jeweils benachbarten Strängen ausbilden. N- und C-Terminus liegen beide auf der periplasmatischen Seite. Die Länge der  $\beta$ -Stränge variiert zwischen 7 ( $\beta_4$ ) und 16 ( $\beta_2$ ,  $\beta_{10}$ ) AS. Die  $\beta$ -Stränge in Trimerzentrumnähe ( $\beta_3 - \beta_8$ ) sind kürzer und bauen die innere Trimerkontaktfläche auf, während die der Membran-zugewandten Seite länger sind, wodurch sich die zur Membran hin erhöhte Barrelwand ergibt. Die Neigung der Stränge relativ zur Trimerachse liegt zwischen 35 und 52 Grad. Von den 332 AS sind 202 AS in die Bildung von Betastrukturen involviert, was einem Sekundärstrukturanteil von 61% entspricht.

Die 16  $\beta$ -Stränge werden extrazellulär durch acht Loops von unterschiedlicher Länge verbunden. L3 verbindet  $\beta_5$  und  $\beta_6$  und ist mit 44 AS der längste Loop. Vom Barrel kommend faltet L3 auf etwa halber Proteinhöhe in die Pore, der Barrelinnenwand entlang und dann wieder zurück. Am Anfang und Ende des großen Loops befinden sich zwei kurze, fast senkrecht zur Barrelachse angeordnete, antiparallele  $\beta$ -Faltblätter (AS 94 - 95 und 131 - 132). L3 zeigt noch weitere Sekundärstrukturen: Eine  $3_{16}$ -Helix (AS 96 bis 101) und eine  $3_{10}$ -Helix (AS 102 bis 104). Verschiedene stark konservierte AA bilden elektrostatische Wechselwirkungen (z.B. eine Salzbrücke zwischen Asp128 und Arg92 von  $\beta_5$ ) und Wasserstoffbrücken, die von L3 in Richtung der Porenumgebung abgehen. Bedingt durch die Länge von  $\beta_9$  bis  $\beta_{14}$  sind die drei Loops L5, L6 und L7 sehr kurz und stellen eher extraplasmatische Turns als wirkliche Loops dar. L8 ist der zweitlängste Loop (AS 301 bis 319) und beeinflusst durch seine Faltung in Richtung der Pore deren Durchmesser. L8 wird durch eine H-Brücke zwischen der Carbonylgruppe von Lys308 und der NH-Gruppe von Thr31 stabilisiert. Daneben trägt Gly309-CO zu der Koordination eines  $Ca^{2+}$ -Ions bei. Weitere Reste in der Koordinationssphäre von Ca sind Leu29-CO, Asp64-CO und die

beiden Reste Asn136 und Glu158 des angrenzenden Monomers. Auf der periplasmatischen Seite befinden sich sieben zwischen einer und vier AS lange Turns, die vorwiegend aus Glycinen gebildet werden.

Die Struktur von Omp32 im Komplex mit dem Acht-AS-Peptid, dem Ca- und Sulfation ist in Abb. 22 dargestellt.



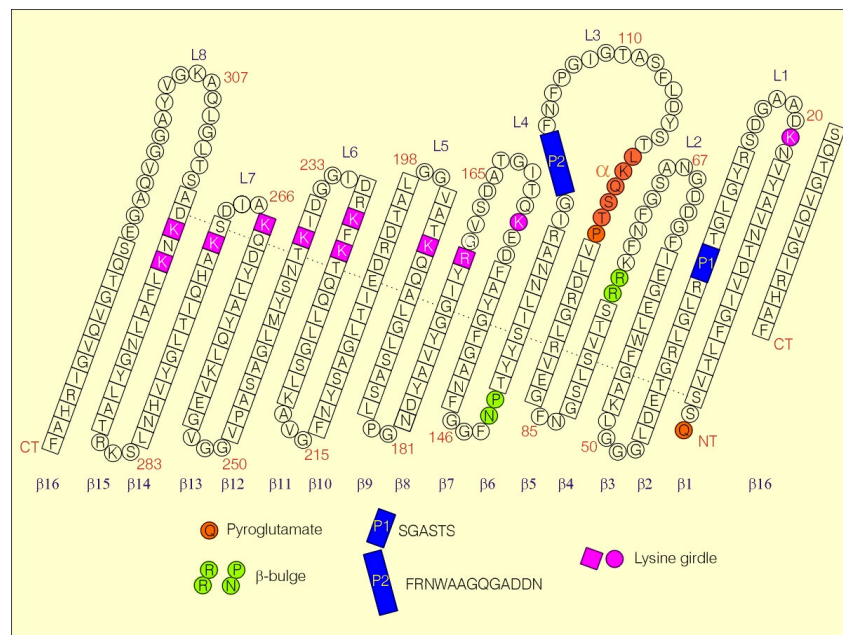
**Abb. 22:** Stereoabbildung von Omp32 in Komplex mit 8-AS-Peptid und dem Ca- bzw. Sulfation ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Der Farbverlauf von blau nach rot entspricht der Sequenz beginnend am N-Terminus. Die 16  $\beta$ -Stränge ( $\beta 1 - \beta 16$ ) und acht Loops (L1 –L8) sind gekennzeichnet.

Einige strukturelle Besonderheiten von Omp32, die das Porin von anderen unterscheidet, sind an Hand des obigen Modells (Abb. 22) zu erwähnen:

- In  $\beta 2$  befindet sich eine Einstülpung von 6 AS (32 - 37), die sich etwa auf der Höhe des großen Loops befindet und 11 Å (gemessen vom mittleren Barreldurchmesser aus) in das Innere der Pore eindringt und diese stark verengt. Auf dieser Einstülpung befinden sich keine geladenen AS, die auf das Leitfähigkeitsverhalten der Pore Einfluss haben könnten.
- In dem großen Loop3 findet sich eine zweite Ausstülpung von AS 118 - 130, die nach dem Umkehrpunkt des Loops, sobald dieser wieder in Richtung des Barrels faltet, abzweigt und Richtung des Extraplasmata ausstülpst und dann daher kommend wieder in L3 einmündet. Der durch die Ausstülpung eingenommene Platz bestimmt maßgeblich die Faltung der beiden Loops L4 und L6, die beide weniger Raum im Inneren des Barrels finden und deshalb nach außen falten müssen.

- Die Leitfähigkeit und die für den Substrattransport entscheidende Engstelle der Pore ist im Fall von Omp32 mit ca. 5 x 7 Å ungewöhnlich schmal und wird durch P1 und L3 stark beeinflusst.
- Die Gesamtzahl der positiv geladenen AS (14 Arg + 17 Lys) in Omp32 ist größer als die der negativ geladenen (8 Glu + 20 Asp). Die Nettoladung des Proteins erhöht sich durch das Ca<sup>2+</sup>-Ion um 2 auf +5.

Unter Berücksichtigung aller beschriebenen Strukturen lässt sich das folgende schematische Faltungsmodell von Omp32 erstellen.

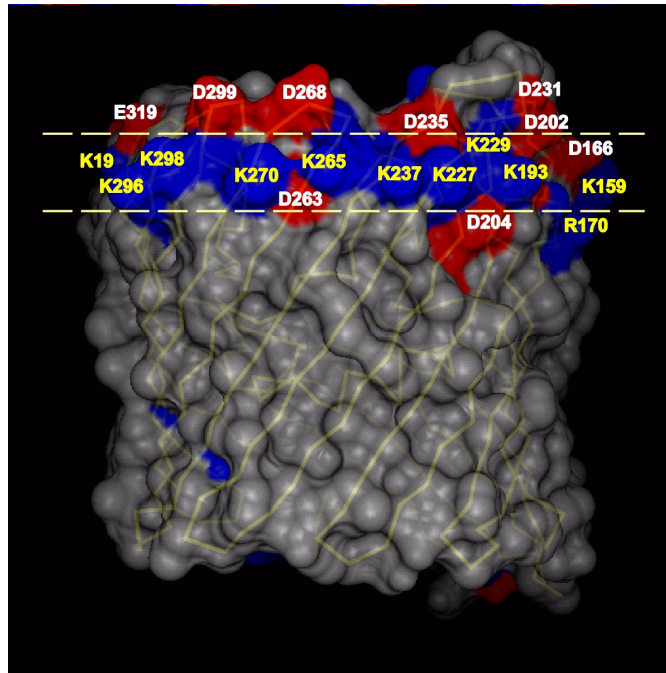


**Abb. 23:** Faltungsmodell von Omp32. Das Modell ist aus der Membransicht dargestellt und aufgeschnitten. Die Reste in  $\beta$ -Stränge sind mit Kästchen, Loop-, Turn- und  $\alpha$ -Helixstrukturen werden durch Kreise repräsentiert. P1 und P2 bezeichnen die Einstülpungen der Struktur.

### 3.1.10 Die Aromaten- und Lysingürtel

Die Membran-exponierte Oberfläche von Omp32 wird ausschließlich von hydrophoben AS gebildet. Dabei lassen sich ausgehend von der periplasmatischen Seite folgende Zonen unterscheiden:





**Abb. 24:** Oberflächendarstellung von Omp32 mit Blick auf die Membran-zugewandte Barreelseite. Der Lysingürtel (in blau) mit den diesen umgebenden negativ geladenen AS in rot ist dargestellt.

- Der Aromatengürtel der periplasmatischen Seite wird aus 3 Phe mit zur Membran orientierten Seitenketten und aus 3 Tyr gebildet, deren Hydroxygruppen in Richtung des polaren Membranendes zeigen.
- An den Aromatengürtel schließt ein unpolarer Gürtel von ca. 25 Å Höhe an, der bezüglich der Membran-zugewandten Seite ausschließlich aus Seitenketten wie Leu, Ile und Val gebildet wird.
- Auf Höhe des extraplasmatischen Membranendes findet sich ein zweiter Aromatengürtel mit fünf Tyrosinen, deren polare Hydroxygruppen aus dem hydrophoben Membranbereich zeigen, während die Seitenketten der zwei Phenylalanine in die hydrophobe Membran gerichtet sind.
- Den äußersten Gürtel bildet ein Ring aus zehn Lysin (K19, K159, K193, K227, K229, K237, K265, K270, K296 und K298) und einem Arginin (R170). Dieser Gürtel befindet sich in einem Abstand von 5 - 8 Å über dem Aromatengürtel und wird von zehn negativ geladenen AS umgeben und damit zumindest partiell elektrostatisch abgeschirmt. Auf Grund der Akkumulation von Lysin an dieser Position der Membran wird diese Anordnung in Analogie zu den Aromatengürteln hier als Lysingürtel eingeführt. Dieser Lysingürtel ist in Abb. 24 durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

- Ein Vergleich des in GRASP berechneten Oberflächenpotentials mit der Oberflächendarstellung der dafür verantwortlichen Aminosäuren zeigt, dass der Anteil der positiven Ladungsverteilung den der negativen weit überwiegt.

### 3.1.11 Elektrostatische Eigenschaften der Pore

Eine GRASP-Darstellung des Oberflächenpotentials der extra- und periplasmatischen Porenoberfläche ist in Abb. 25 dargestellt. Von der extraplasmatischen Seite blickend bilden fünf Arginine (R75, R92, R119, R133 und R230), die mit ihren Seitenketten in die Pore weisen, den Poreneingang. Die drei Arginine R75, R92 und R133 bilden im Porezentrum durch ihre vertikale Aneinanderreihung eine 'Argininleiter', die für ein potentiell Substrat ein sehr starkes positives Potential aufbauen sollte, da sich diese Leiter sehr nahe der Porenengstelle befindet. Betrachtet man die Oberfläche der Pore von der periplasmatischen Seite, so erkennt man, dass das positive Oberflächenpotential durch zwölf AS (R38, R42, K52, R75, R76, R89, K100, R133, K218, K256, K284 und R329) noch stärker positiv ausgeprägt ist und nur durch wenige negative Ladungen teilkompensiert wird. Da sich keine negativ geladenen AS im Bereich der Porenengstelle befinden, kommt das vor allem durch die Argininleiter aufgebaute positive Feld auf die passierenden Substrate zur Wirkung.

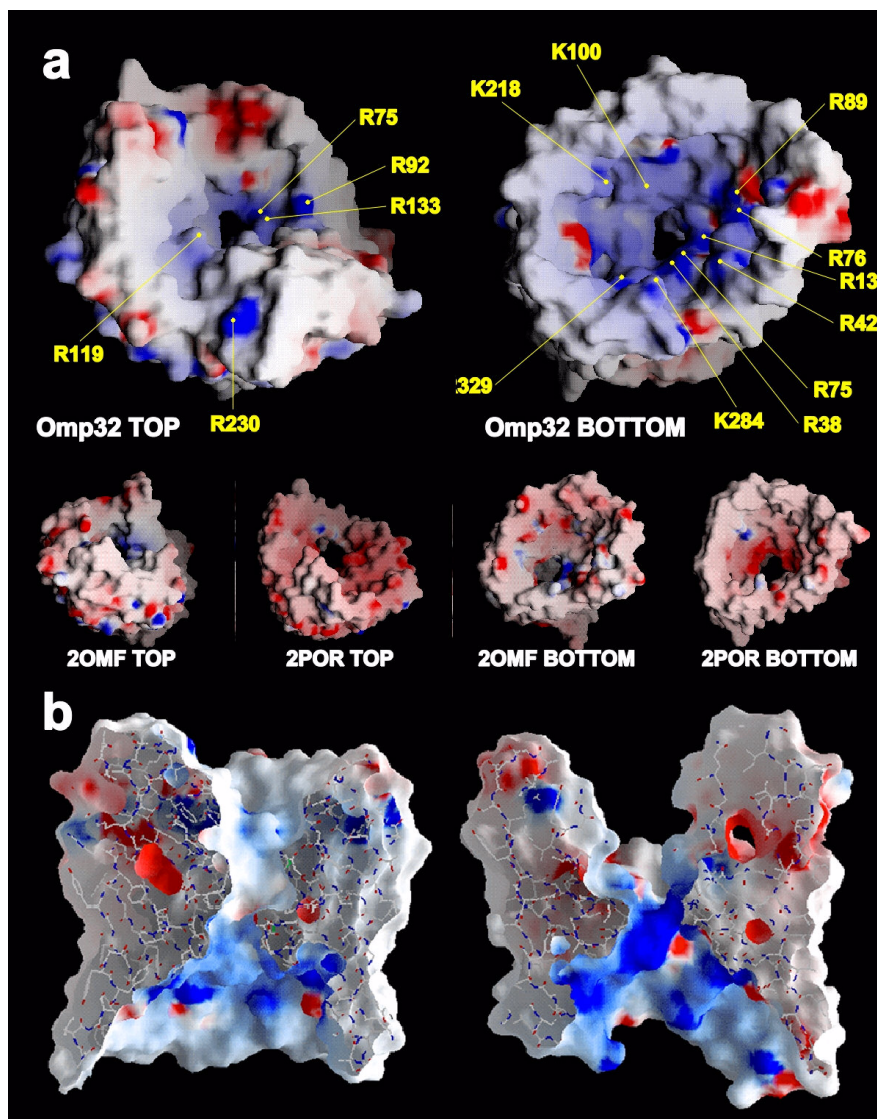
Ein Vergleich der Potentialoberflächen von Omp32, OmpF und dem Porin *aus R. capsulatus* zeigt, dass durch die Akkumulation von Argininen und Lysinen tatsächlich nur in Omp32 ein positiv geladenes Porenpotential aufgebaut wird.

### 3.1.12 Die Pore: Überlegungen zur Struktur und Funktion

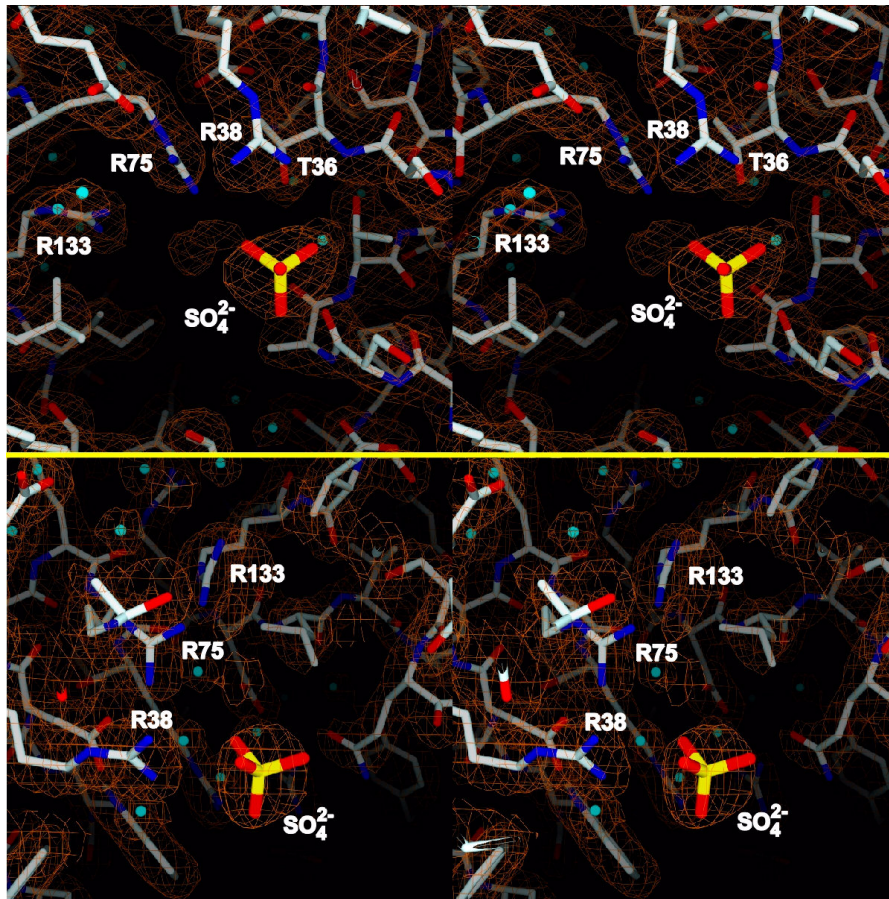
Neben einer Anzahl von 98 Wassern, die kristallografisch in der Porenregion identifiziert werden können, findet man in Differenzkarten eine sphärische Dichte, die durch ihre Geometrie und Größe nicht als Wassermolekül erklärt werden kann. Da die Bindung innerhalb der Porenengstelle an Arg38 erfolgt, liegt es nahe, ein Sulfatanion des Puffers als potentiellen Bindungspartner zu modellieren. Der Abstand zwischen den Sulfat-Sauerstoffen und den Arginin-Stickstoffen beträgt 2,95 Å. Die Bindung des Sulfations an Arg38 und die molekulare Umgebung in diesem Bereich ist in Abb. 26 gezeigt.



Die Akkumulation von positiven Ladungen in der Porenregion ist konsistent mit der Beobachtung einer starken Anionenselektivität. Anschaulich bedeutet diese Selektivität, dass unter den gewählten Bedingungen des Gradienten über die Membran, 94% aller diffundierenden Ionen Chloridionen sind. Die Bindung eines Anions in der Porengengstelle, der Durchmesser der Pore mit nur 5 x 7 Å und die Eigenschaft von *C. acidovorans* bevorzugt auf negativ geladenen Substraten zu wachsen, sowie die in Leitfähigkeitsmessungen bestimmte Anionenselektivität weist auf die potentielle Eigenschaft von Omp32 als Anionen-spezifischer Pore hin.



**Abb. 25:** (a) GRASP-Darstellung der Oberflächenpotentiale gesehen von der extra- (TOP) und periplasmatischen (BOTTOM) Seite von Omp32, OmpF (2OMF) und dem Porin aus *Rhodobacter capsulatus* (2POR). (b) Seitenansicht eines Schnittes durch Omp32.

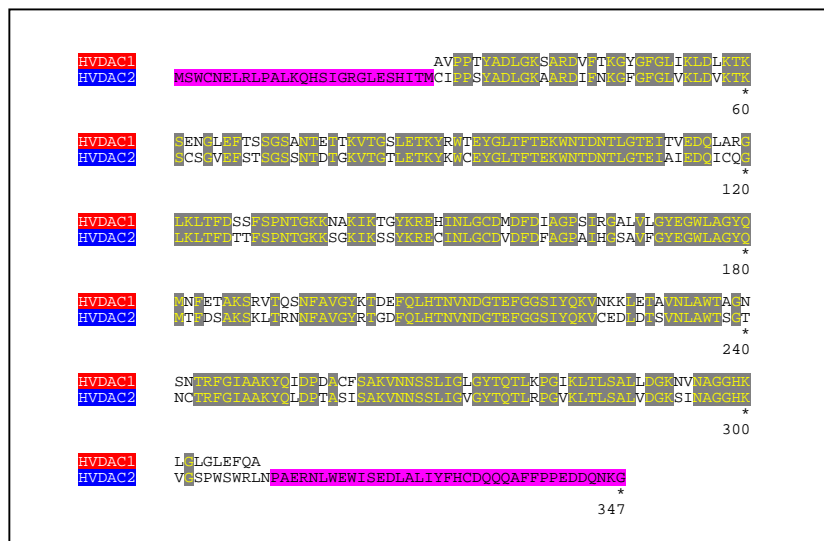


**Abb. 26:** Stereoabbildung der molekularen Umgebung des Sulfatbindungsstelle in der Aufsicht (oben) und der Seitenansicht (unten). Die Argininleiter mit Arg38, Arg75 und Arg133 ist markiert.

## 3.2 Ergebnisse zu VDAC

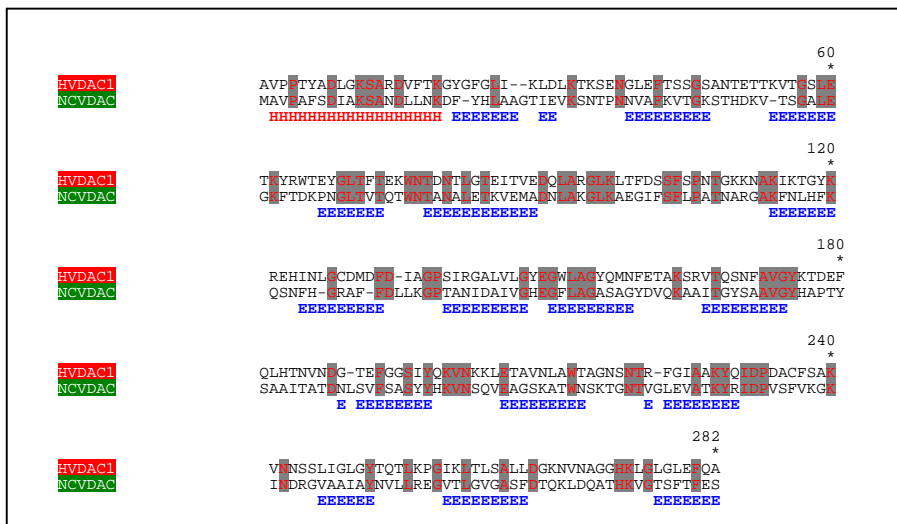
### 3.2.1 Sequenzanalyse

Die Gensequenz von HVDAC1, der humanen Isoform 1, kodiert für 282 AS, während das Gen der Isoform 2 (HVDAC2) für 347 AS kodiert. Wie das paarweise Sequenzalignment der beiden Isoformen in Abb. 27 zeigt, existiert ein stark konservierter Bereich mit einer (I/A) von 74/85% bezogen auf HVDAC2 für 275 überlappende AS, die nahezu die gesamte Sequenz von HVDAC1 einschließen und ungefähr der Länge ihrer gemeinsamen integralen Membrandomäne entsprechen. In HVDAC2 sind N- und C-Terminus noch um jeweils etwa 25 zusätzliche AS verlängert. Ein N-terminales, für die ATP-Bindung vorgeschlagenes Bindungsmotiv (GYGFG) in HVDAC1 ist in HVDAC2 als GFGFG-Motiv konserviert.



**Abb. 27:** Sequenzalignment zwischen HVDAC1 (SP: P21796) und HVDAC2 (SP: P45880). Die Numerierung ist entsprechend der HVDAC2-Sequenz gewählt. Identische AS-Positionen sind in grau unterlegt, die beiden zusätzlichen N-Termini in HVDAC2 in violett.

Das Sequenzalignment von HVDAC1 mit NCVDAC, dem Hefe-Analogen von HDVAC1 aus *N. crassa*, zeigt nur noch eine (I/A) von 30/71%. Die potentielle ATP-Bindungsstelle GYGFG ist in dem Hefe-Homologen nicht mehr enthalten. Konservierte Stellen der beiden Proteine liegen hauptsächlich in Turn- und  $\beta$ -Strangbereichen, sowie im Bereich der N-terminalen Helix. Die Länge der beiden Proteinsequenzen ist mit 282 AS für HVDAC1 und 281 AS für NCVDAC vergleichbar.



**Abb. 28:** Sequenzalignment zwischen HVDAC1 (SP: P21796) und NCVDAC aus *N. crassa* (SP: P07144). Identische AS-Positionen sind grau unterlegt.

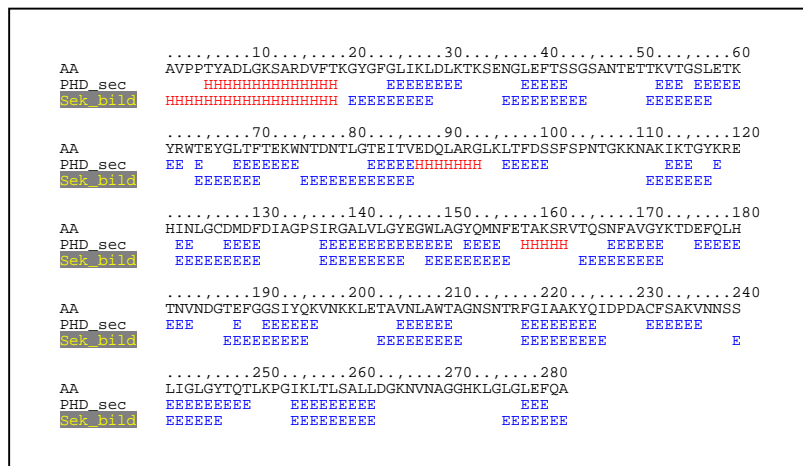
### 3.2.2 Sekundärstrukturvorhersage von HVDAC1 und HVDAC2

Die Vorhersage der Sekundärstrukturen in HVDAC1 (Abb. 29) und HVDAC2 (Abb. 30) ergibt nach dem PhD-Programm [Rost *et al.*, 1997]:

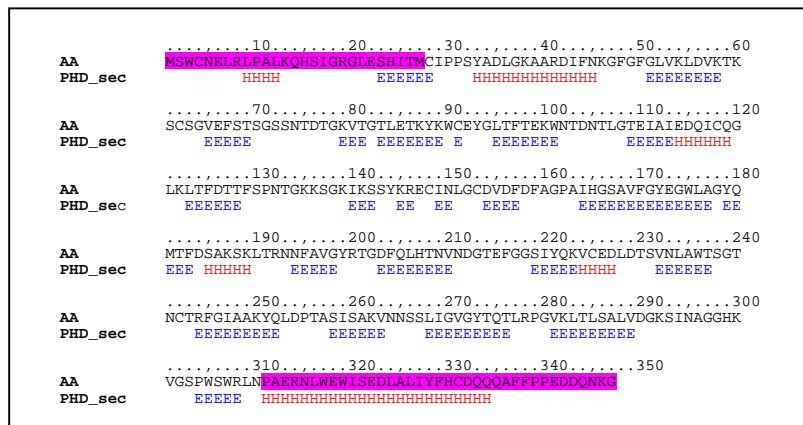
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Strang	Loops und Coils
<b>HVDAC1</b>	<b>9,2%</b>	<b>46,5%</b>	<b>44,3%</b>
<b>HVDAC2</b>	<b>16,1%</b>	<b>40,4%</b>	<b>43,5%</b>

**Tab. 7:** Anteile der Sekundärstrukturen in HVDAC1 und HVDAC2.

Der höhere Anteil an  $\alpha$ -helicalen Strukturen in HVDAC2 rührt aus oben erwähnter zusätzlichen Extension, für die eine 24 AS lange  $\alpha$ -Helix vorhergesagt wird. Abb. 29 zeigt auch den Vergleich zwischen Sekundärstrukturvorhersage und den experimentell durch MALDI-MS und *peptide mapping*-Analyse ermittelten Topologiedaten (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.6). Aus diesen Daten geht hervor, dass für 14 von 16  $\beta$ -Strängen eine sehr gute Übereinstimmung zwischen der Vorhersage und dem Modell besteht.



**Abb. 29:** Sekundärstrukturvorhersage von HVDAC1 (PHD\_sec) und der Vergleich mit den durch *peptide-mapping*-Analyse erhaltenen experimentellen Daten Topologiedaten (Sek\_bild).



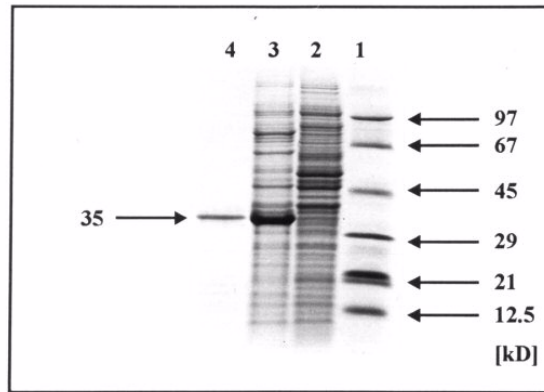
**Abb. 30:** Sekundärstrukturvorhersage von HVDAC2: H → Helix, E → β-Sheet..

### 3.2.3 Expression von HVDAC1 und HVDAC2

In den folgenden Abschnitten werden die beiden humanen Isoformen HVDAC1 und HVDAC2 auf Grund ihres ähnlichen Verhaltens gleich behandelt, soweit keine großen Unterschiede während der Expression, Reinigung und ihrer strukturellen Charakterisierung auftraten.

Die Isoformen des mitochondrialen Porins HVDAC1 (SP: P21796) und HVDAC2 (SP: P45880) wurden in einen Expressionsvektor mit Antibiotika-Resistenzen für Ampicillin und Kanamycin und einem C-terminalem Histag kloniert und in *E. coli* transformiert. Die Überexpression des Proteins wurde durch Zugabe von 1,5 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 1 eingeleitet. Nach der Induktion wuchsen die Zellen langsamer nur bis zu einer Dichte von OD<sub>600</sub> etwa 2 - 2,5.





**Abb. 31:** SDS-PAGE von HVDAC1-Proben: (1) Marker-Banden, (2) Rohzelleextrakt vor Induktion, (3) Zellextrakt nach Induktion mit IPTG, (4) gereinigtes Protein nach Rückfaltung und NiNTA-Säule.

Die Expression des Proteins nach IPTG-Zugabe kann im SDS-Gel durch das Auftreten einer intensiven Bande bei ca. 35 kD nachgewiesen werden (siehe Abb. 31, Spur 3). Da das Porin keine bakterielle Signal- bzw. Exportsequenz enthält, wird es nicht in das Periplasma bzw. in die äußere Membran transportiert, sondern verbleibt in Form fehlgefalteter *inclusion bodies* im Cytoplasma.

Der Vorteil von *inclusion bodies* besteht im allgemeinen darin, dass diese meist in sehr großen Mengen produziert werden und als unlösliches Präzipitat von den löslichen cytosolischen Proteinen abgetrennt werden können. Der Expressionslevel im Fall der beiden humanen VDAC-Konstrukte lag bei ca. 50 - 100 mg des ungefalteten Proteins pro Liter Zellkultur der OD<sub>600</sub> von 2. Das unlösliche Protein wurde mehrmals, wie schon im Material- und Methodenteil beschrieben, mit verschiedenen Puffern gewaschen und die Lösung dabei immer sehr sorgfältig durch Pottern homogenisiert. Membranproteine aus *E. coli* wurden durch Behandlung der Membranen mit Lysozym und nachfolgender Solubilisierung in 3% o-POE von der unlöslichen Proteinfraction abgetrennt. Schon nach diesen ersten Reinigungsschritten lag das Porin in einer Reinheit von mehr 95% vor und war damit für den nachfolgenden Rückfaltungsschritt direkt einsetzbar.

Das weiße Proteinpellet der *inclusion bodies* wurde bis zu einer maximalen Löslichkeit von 20 - 30 mg/ml in 6 molarer GuaHCl-Lösung aufgenommen. Die Rückfaltung wurde bei einem Temperaturoptimum von etwa 10°C durchgeführt. Die Rückfaltungslösung war nach der Proteinzugabe je nach verwendetem Detergens leicht bis stark getrübt, was auf einen Anteil von ungefaltetem und aggregiertem Protein hinweist. Um die Effizienz der Rückfaltung in Abhängigkeit verschiedener Detergentien zu untersuchen und zu optimieren, wurden vier nicht-ionische und ein

zwitterionisches Detergens (1% DDM, 1% DEM, 1% C8E4, 2%  $\beta$ -OG und 2% LDAO) gelöst und das solubilisierte Protein - wie oben erwähnt - langsam zugetropft. Die Effizienz und Ausbeute der Rückfaltung wurde über das in Lösung verbliebene Protein und dessen Absorption bei OD<sub>280</sub> bestimmt. Die Werte wurden nach einer Stunde, nach 24 Stunden und nach einer Woche genommen. Das Verhalten des rückgefalteten Proteins in den untersuchten Proben ist in Tabelle 8 dargestellt.

	2% LDAO	1% DDM	1% DEM	1% C8E4	2% $\beta$ -OG
<b>Nach 1 h</b>	90%	75%	70%	30%	15%
<b>Nach 24 h</b>	90%	70%	70%	30%	15%
<b>Nach 1 w</b>	90%	60%	55%	30%	10%

**Tab. 8:** Bestimmung der Rückfaltungsausbeute nach 1 Stunde (1 h), nach 24 h (24 h) und nach einer Woche (1 w) durch OD<sub>280</sub>.

Aus obiger Tabelle ergibt sich folgender Trend: Der höchste Prozentsatz von nach Rückfaltung stabil in Lösung verbliebenem Protein wurde mit den Detergentien LDAO und DDM erzielt. Mit DEM konnte zwar eine relativ gute, aber dennoch schlechtere Rückfaltungsausbeute erreicht werden. Mit den Detergentien C8E4 und  $\beta$ -OG konnten nur noch 10 - 30% des Proteins in eine lösliche Form überführt werden. Die Rückfaltung wurde wegen der einfachen Verfügbarkeit in allen weiteren Ansätzen mit 2% LDAO durchgeführt.

Der Anteil an gefaltetem Protein korreliert interessanterweise nicht mit der Stabilität des Proteins in den gewählten Detergentien. Beobachtungen an verschiedenen Lösungen der Porine in höheren Detergens-Konzentration (1 - 2%) zeigen, dass z.B. o-POE, C8E4 oder C8E5 zur Stabilisierung des Proteins auch in Konzentrationen von 10 - 20 mg/ml sehr gut geeignet ist, während das Protein in  $\beta$ -OG und LDAO sehr viel weniger stabil zu halten war.

Die Reinigung der Porine von kleineren Proteinkontaminationen wurde über NiNTA-Agarose durchgeführt. Unspezifisch an die Matrix bindende Proteine wurden mit 40 mM Imidazol von der Säule entfernt und die Porine dann schließlich mit 200 mM Imidazol eluiert. Das eluierte Protein war nach der NiNTA-Säule zu 99% rein (siehe Spur 4 im obigen Gel der Abb. 31) und konnte in dieser Reinheit für alle weiteren Untersuchungen verwendet werden.

Die Ausbeute an gefaltetem und gereinigtem Protein bezogen auf einen Liter Zellkultur beträgt für beide Isoformen ca. 30 - 40 mg.

### 3.2.4 ATP-Bindung, DLS und FTIR Spektroskopie

Da für rückgefaltete Proteine ohne enzymatische Aktivität ein Nachweis für deren korrekte Assemblierung und Ausbildung der nativen Sekundär- und Tertiärstruktur nicht über Funktionstests durchgeführt werden kann, können nur Bindungsstudien an andere Proteine sowie Methoden zur Sekundärstruktur-Aufklärung wie CD und FTIR indirekte Evidenzen über den funktionellen Zustand des Proteins liefern.

Die spezifische Expression von HVDAC1 lässt sich über Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Antikörpern gegen den N-terminalen Bereich des Proteins nachweisen. Die Analysen zeigen nach Dekoration mit Antikörpern und Färbung eine Bande im erwarteten Molekulargewichtsbereich (Daten sind hier nicht aufgeführt).

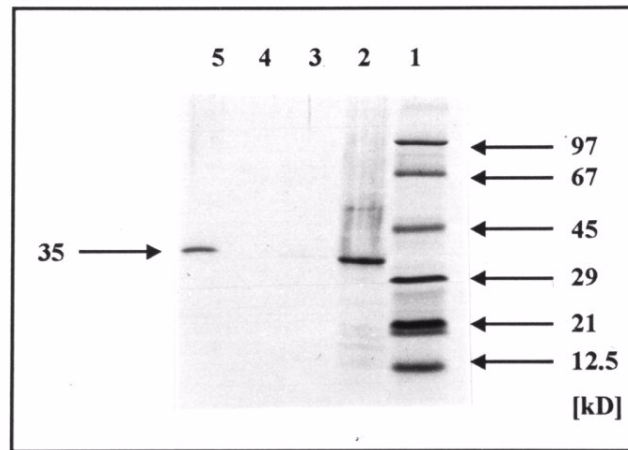
In der Literatur wurde die Bindung von humanen VDAC isoliert aus T-Lymphozyten an ATP-modifizierte Agarose beschrieben [Flörke *et al.*, 1994]. Um Evidenzen für dieses Bindungsverhalten zu prüfen, wurde das Experiment auch mit dem bakteriell exprimierten und rückgefalteten HVDAC1 durchgeführt. Dafür wurden zwei verschiedene ATP-Agarosematrizes verwendet, um zusätzlich zur Bindung auch den Einfluss der Topologie des Bindungsmaterials auf die Bindung zu studieren. Im ersten Fall war das ATP-Substrat über das C9-Atom der Adeningruppe kovalent mit der Trägermatrix verbunden, im zweiten Fall wurde ATP über eine Hydroxygruppe des Zuckers und einen Undecyl-spacer an Agarose gekoppelt. Mit beiden an die Trägermatrix verknüpften ATP-Derivaten konnte eine quantitative Bindung von HVDAC1 nachgewiesen werden. Die Bindung von ATP an HVDAC2 wurde daraufhin nicht weiter untersucht.

Neben ATP wurde auch die Komplexbildung des zellulären Reduktionsäquivalent NADH mit VDAC aus *N. crassa* beschrieben [Colombini *et al.*, 1997]. Eine Bindung über NADH-modifizierte Agarose konnte für keine der beiden humanen VDAC-Isoformen bestätigt werden.

Weitere Bindungsstudien zwischen HVDAC1 und ANT aus Ratte, die im Labor von Dieter Brdizka (Universität Konstanz) durchgeführt wurden, weisen durch die Bildung eines selbst in SDS-Gelen stabilen Heterodimers auf eine große Komplexbildungskonstante zwischen den Proteinen hin.



Bindungsstudien von HVDAC1 und den humanen mitochondrialen Kreatinkinasen (CK) und der Kreatinkinase aus Huhn zeigten hingegen kein eindeutiges Bindungsverhalten, deuten jedoch auf eine mögliche Komplexbildung zwischen humaner  $\alpha$ -CK sowie der CK aus Huhn hin (Daten werden hier nicht gezeigt).

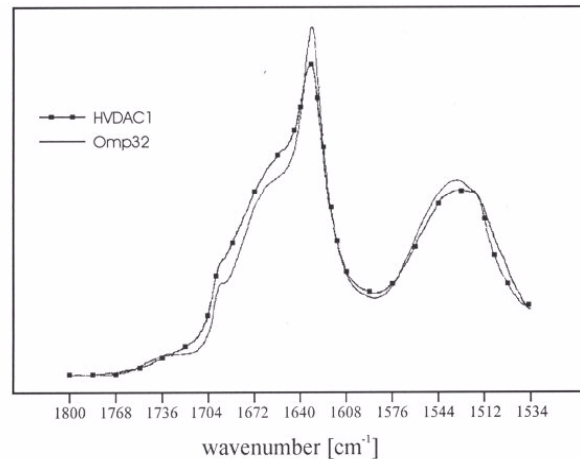


**Abb. 32:** SDS-Gel von HVDAC1. (1) Marker, (2) Protein vor ATP-Agarose, (3 und 4) Waschschriftfraktionen von ATP-Agarose, (5) Elution von ATP-Agarose.

Um die relativen Anteile der Sekundärstruktur von HVDAC1 und HVDAC2 zu bestimmen, wurden FTIR-Spektren der Proben in 0,5% C8E4 aufgenommen. Die Spektren werden in Abb. 33 mit dem Referenzspektrum von Omp32, einem Porin bekannter Tertiärstruktur verglichen. Aus der Bandenstrukturanalyse resultiert, dass der Anteil von  $\beta$ -Faltblatt abgeleitet anhand der  $1632\text{ cm}^{-1}$  Bande mit ca. 48% für HVDAC1 und 41% für HVDAC2 niedriger, aber noch vergleichbar hoch dem in bakteriellen Porinen (wie z.B. Omp32) ist. Im Fall von HVDAC1 findet man neben dem großen Anteil an  $\beta$ -Faltblatt noch einen kleineren Teil an  $\alpha$ -Helix, der aus dem Beitrag der Bande bei  $1656\text{ cm}^{-1}$  errechnet werden kann. Für HVDAC1 beträgt dieser Anteil 7%, während er für HVDAC2 im Bereich von 10% liegt und damit entsprechend der zusätzlichen C-terminalen Helix etwas höher ist.

Mittels dynamischer Lichtstreuung lassen sich die Molekulargewichte bzw. Radien von Proteinen mit relativ hoher Genauigkeit bestimmen und damit im Prinzip die Anzahl der in größeren Komplexen befindlichen Moleküle - ähnlich der nativen Gelelektrophorese - bestimmen. Die Methode zeigt für lösliche Proteine hinsichtlich des Molekulargewichts oft sehr gute Ergebnisse, lässt sich jedoch auf Membranproteine bzw. Proteine in Detergensmicellen nur sehr bedingt anwenden, da in Letzteren der Radius des Proteins um eine unbekannte Anzahl von Detergensmolekülen vergrößert wird. Für HVDAC1 zeigten die Messungen trotzdem

eine homogene Größenverteilung um einen Mittelwert von 65 kD. Verglichen mit einer berechneten molekularen Masse von ca. 35 kD stimmt der gemessene Wert allerdings nur dann, wenn man eine Anzahl von 60 - 70 fest im Protein-Detergens-Komplex verankerte Detergensmoleküle hinzunimmt.



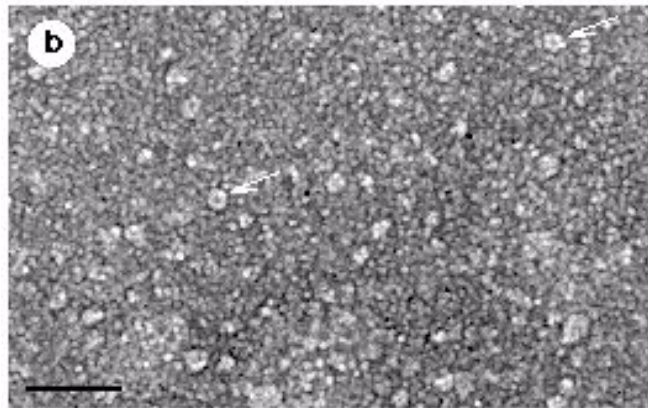
**Abb. 33:** FTIR-ATR Spektren von HVDAC1 und Omp32. Ein Vergleich der beiden Spektren zeigt die Ähnlichkeit der Sekundärstrukturen. HVDAC1 zeigt einen höheren  $\alpha$ -helicalen Anteil, während Omp32 einen höheren  $\beta$ -Faltblattanteil besitzt.

### 3.2.5 Elektronenmikroskopie an HVDAC1

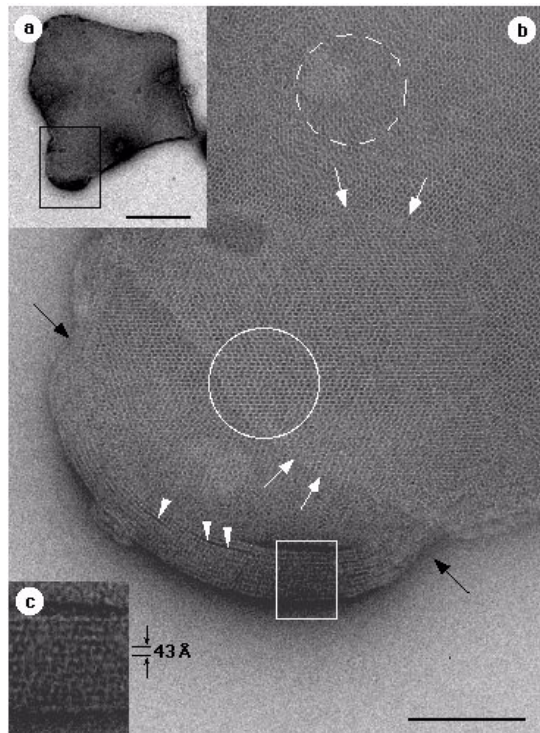
Gereinigte Proben von HVDAC1 wurden für die Untersuchung im Elektronenmikroskop auf dem Kupfergrid mit Uranylacetat kontrastiert und bei Raumtemperatur untersucht. In der Anordnung zufällig orientierter Moleküle erkennt man einige Partikel, die als stehende monomere Poren mit einem Durchmesser von 35 - 40 Å interpretiert werden können. Abb. 34 zeigt das EM-Bild einer solchen Probe auf Kohlegrids, in der Partikel mit einer barrelartigen Form und senkrechter Orientierung mit Pfeilen gekennzeichnet sind.

HVDAC1 kann in Gegenwart von DMPC und zweiwertigen Ionen wie  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  durch Dialyse und damit Verarmung des Detergens in 2D-kristalline Arrays überführt werden. Das ideale Verhältnis von Lipid zu Protein (L/P) liegt hierbei etwa zwischen 0,2 - 0,5 Gewichtsprozent, was einem Verhältnis von ca. 20 Lipiden pro Porinmonomer entspricht. Die Größe der nach Dialyse vorliegenden Kristalle war heterogen mit Vesikeln bis zu 5  $\mu m$  im Durchmesser. Bei höherer Vergrößerung erkennt man in negativ kontrastierten Proben (siehe dazu Abb. 35), dass die betrachteten Vesikel multilamellar oder mehrschichtig ist. Diese Anordnung führt, wie

im nächsten Abschnitt diskutiert, in der Projektion der Kristalle zu einer schwierigen Interpretation und macht die weitere Verwendung für Tomografie unbrauchbar.



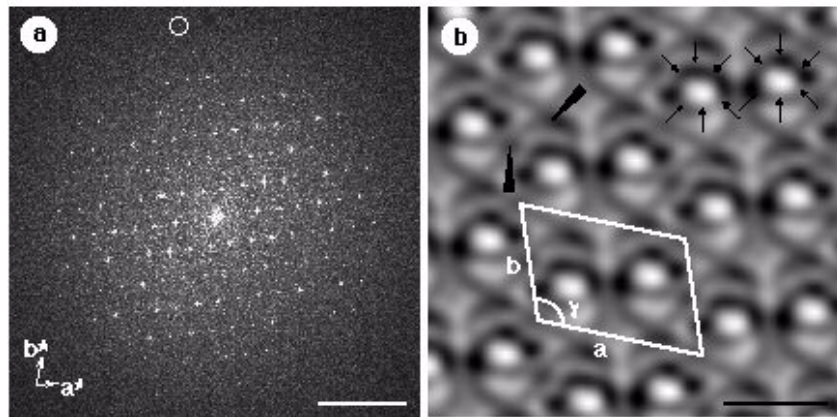
**Abb. 34:** EM-Aufnahme zufällig orientierter Partikel von HVDAC1 in negativ Kontrastierung.



**Abb. 35:** (a) Uranylacetat kontrastierter Vesikel Protein-Lipidvesikel von HVDAC1 in der Übersicht gezeigt. Der schwarze Balken entspricht 1  $\mu\text{m}$ . (b) Das Vesikel bei höherer Auflösung zeigt das Gitter des 2D-Kristalls, der an der an einem Ende kollabiert ist und dadurch einen Blick auf die Innenseite des Vesikels ermöglicht.

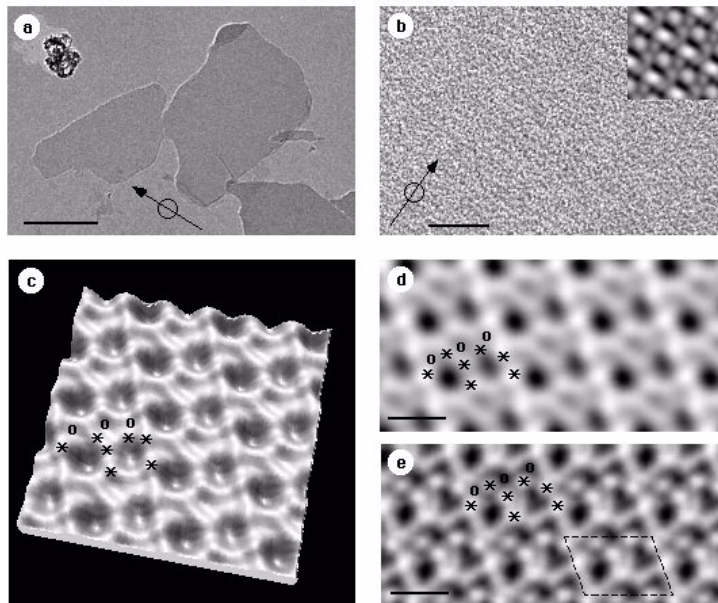
Nachdem die Bestimmung der Zellkonstanten und die Optimierung der Kristallisationsbedingungen über die Analyse negativ kontrastierter Proben abgeschlossen war, wurden 2D-Kristalle auch in Glukose und Eis eingebettet. Auch in EM-Aufnahmen der Proben in Eis, in denen der Kontrast der Mikroskopie allein durch die Proteinelektronendichte hervorgerufen wird, zeigt sich das Problem des

mehrschichtig additiven Proteinkontrastes, der die Zuordnung zu einzelnen Proteinschichten schwierig bzw. unmöglich gestaltet. Da sich die Mehrschichtigkeit zwar auf den Kontrast, nicht aber auf die laterale Kristallordnung auswirkt, zeigen die besten, in Eis eingebetteten Proben, im Powerspektrum immerhin Beugungsmaxima bis etwa 8 Å Auflösung (siehe dazu Abb. 36a). In Abb. 36b ist eine gemittelte Aufnahme von in Glukose eingebettete HVDAC1-Kristallen gezeigt, die eine Pore mit leicht elliptischer Form erahnen lassen und deren `Barrelgrenze` mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Mit einer Einheitszellgrösse von  $a = 81,1 \pm 1,1$  Å,  $b = 56,7 \pm 0,5$  Å und einem Winkel  $\gamma = 110,4 \pm 0,6$  Grad zeigt das Porin eine für die erwarteten Porindimensionen `normale` Einheitszellgröße.



**Abb. 36:** (a) Powerspektrum eines in Glukose eingebetteten 2D-Kristalls von HVDAC1. Schwache Reflexe bis 8 Å wurden beobachtet und sind durch einen weißen Kreis markiert. (b) Gemitteltes EM-Bild eines 2D-Kristalls von HVDAC1. Die Zelle mit a und b sowie der Winkel  $\gamma$  dazwischen ist markiert. Der ungefähre Barrelverlauf eines Porinmonomers ist mit Pfeilen markiert.

In Abb. 37 sind EM-Aufnahmen von mit TaW bedampften Oberflächen von HVDAC1-Kristallen zu sehen. Der Kontrast bei diesen Proben resultiert hauptsächlich aus der bedampften Schweratomschicht und gibt dabei vor allem die Kristalltopologie wieder. Die Pfeile in Abb. 37a und 37b deuten auf die Bedampfungsrichtung des Molekularstrahls aus Ta und W-Atomen hin. Die Topologie des Kanals ist mit Sternen gekennzeichnet, die sich als mehrere aus der Kristallebene weisende Domänen hin interpretieren lassen und eine Pore mit einer Vertiefung umgeben. Die Dimensionen der Pore in Eis stimmen dabei mit den aus negativ-kontrastierten Proben bestimmten sehr gut überein.



**Abb. 37:** (a) Übersicht eines bedampften Kristalls. (b) Kristall bei höherer Vergrößerung. (c) Bild eines gemittelten Kristalls in dem erhöhte Bereiche des Porins mit Sternen gekennzeichnet sind, einige Vertiefungen mit Kreisen.

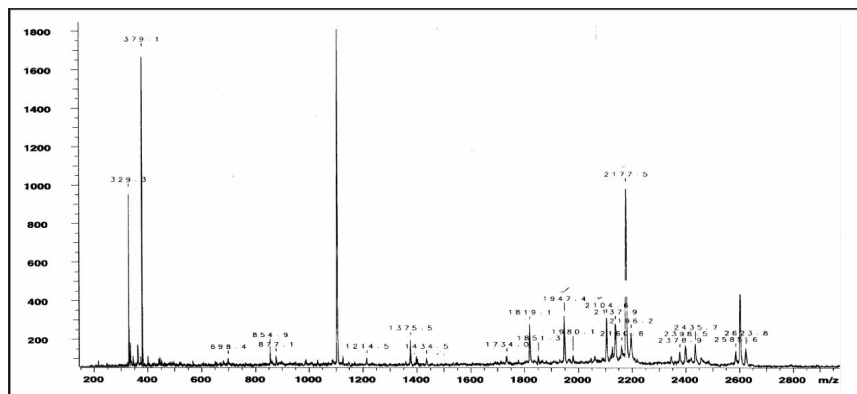
### 3.2.6 Peptide mapping und die Topologie von HVDAC1

*Peptide mapping*-Analysen von Membranproteinen verknüpft mit massenspektrometrischen Methoden können über die Topologie bzw. Tertiärstruktur Aufschluss geben. Das Prinzip der Methode angewendet auf Membranproteine, beruht auf der limitierten Zugänglichkeit des in Micellen eingebauten Proteins für verschiedene Proteasen, die dann entsprechend ihrer Spezifität das Protein nur in zugänglichen Bereichen fragmentieren. Unter der Annahme, dass diese Proteasen ausschließlich an für sie zugänglichen Strukturen schneiden können, sollte der in Micellen eingebettete amphipatische Membranbereich somit intakt bleiben und sich in den MALDI-Spektren widerspiegeln.

HVDAC1 wurde mit vier Enzymen inkubiert und proteolytisch verdaut. Die Proteasen Trypsin und LysC besitzen mit ihrer Präferenz nach Lysin zu spalten eine sehr ähnliche, jedoch keine identische Substratspezifität, da die Trypsinspaltung auch nach Argininresten erfolgen kann. AspN besitzt eine Aminoterminal Spezifität für Aspartatreste, GluC eine Carboxyterminale Glutamat-Spezifität. Alle vier Spaltungen wurden unter denselben Bedingungen in neutralem Milieu durchgeführt. Proben der Abbaugemische wurden nach einer Stunde, nach vier Stunden und nach 24 h entnommen und ohne vorherige Trennung als Gemischspektrum über MALDI-MS analysiert. Das Spektrum eines Trypsinabbaugemisches, gestoppt nach einer Stunde Inkubationszeit, ist in Abb. 38 gezeigt. Ein Vergleich der Spektren von

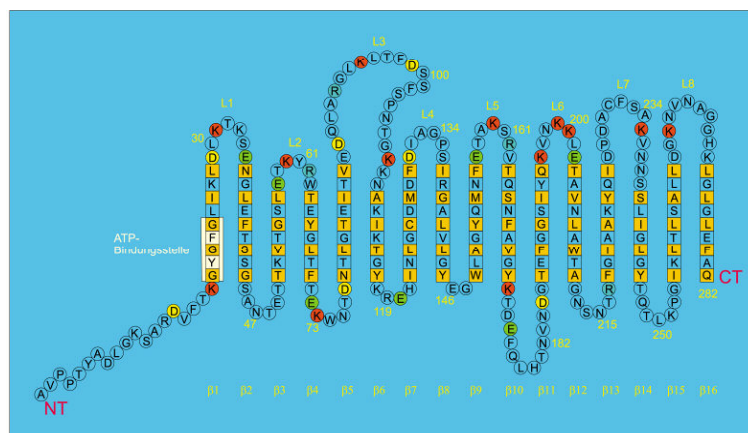


Abbaugemischen nach einer, vier und 24 Stunden Inkubation mit Protease deutet an, dass die Reaktion schon nach einer Stunde abgeschlossen ist und durch längere Inkubation mit den Proteasen keine zusätzlichen Fragmente im Spektrum auftauchen (Daten werden hier nicht gezeigt). Um den Einfluss der Spaltung auf die Sekundärstruktur des Porins hin zu untersuchen, wurden FTIR-Spektren nach Trypsinspaltung aufgenommen. Aus den Spektren ergibt sich, dass sich die Spektren zwar durch gebildete Peptide verändern, ein Verlust an Sekundärstruktur  $\beta$ -Struktur erst bei Proben mit einer Inkubationsdauer von 24 h bemerkbar macht.



**Abb. 38:** MALDI-Gemischspektrum eines Trypsin-Abbaugemisches von HVDAC1 nach einer Stunde Inkubationszeit der Protease.

Die Proteasen erzeugen etwa 40 Peptide mit Massen, die über MALDI-MS bestimmt wurden und der Sequenz zugeordnet werden konnten. Die Fragmente sind in Tabelle 9 aufgeführt.



**Fig. 39:** Topologie-Diagramm von HVDAC1 mit 16  $\beta$ -Strängen erstellt durch *peptide mapping*-Analyse. N- und C-Terminus sowie die ATP-Bindungsstelle (hellgelb unterlegt) sind markiert. Die ersten 19 AS werden als  $\alpha$ -Helix postuliert. Gelb unterlegte AS sind hydrophober Natur und bilden den Membran-exponierten Teil der amphipatischen  $\beta$ -Stränge. Rot markierte AS zeigen Proteaseschnittstellen von Trypsin und LysC, gelbe die von Protease AspN, grüne die GluC Spaltstellen.

Exp. Bestimmte Masse	<u>LYS-C</u>			<u>Trypsin</u>		Peptid-fragment
	Berechnete Masse	Peptid-fragment		Exp. Bestimmte Masse	Berechnete Masse	
4381	4379	161 – 199		2601	2600	174 – 196
4040	4038	161 – 195		2177	2176	74 – 92
3117	3115	236 – 265		2138	2140	93 – 112
2945	2941	174 – 199		2104	2103/2102	236 – 255, 120 – 138
2602	2600	174 – 196		1947	1946/1945	200 – 217, 218 – 235
2536	2533	200 – 223		1819	1818	201 – 217
2104	2101	236 – 255		1401	1400	96 – 108
1727	1725	266 – 282		1375	1374	63 – 73
1695	1694	61 – 73		1214	1213	163 – 173
1458	1457	161 – 173		855	854	20 – 27
1325	1325	20 – 31		698	701	109 – 114
	<u>AspN</u>			<u>GluC</u>		
3570	3570	88 – 119		4482	4486	189 – 229
3186	3184	157 – 184		3700	3699	88 – 120
3091	3093/3092	99 – 126 / 72 – 98		3500	3497	59 – 87
2456	2453	58 – 76		2966	2966	177 – 202
2434	2434	77 – 98		2773	2776	121 – 146
1881	1884	185 – 201		2102	2102	158 – 176
1798	1795	58 – 71		1795	1795	59 – 72
1557	1558	15 – 28		1262	1262	89 – 99
1105	1105	29 – 38				
1104	1102	176 – 184				

**Tab. 9:** Zuordnung der durch MALDI-MS bestimmten Peptidmassen zu Sequenzen in HVDAC1. Das in Micellen eingebaute Protein wurde mit den Proteasen Trypsin, LysC, AspN und GluC verdaut und die Fragmente in Gemischspektren über MALDI-MS identifiziert. Kursiv gedruckte Werte weichen von der vorhergesagten Masse stärker ab als 0,1% ab.

Die meisten Peptidfragmente wurden auf Grund der für sie experimentell genau bestimmten Masse und über das Vorliegen angrenzender Peptide verifiziert. Trägt man alle Spaltstellen in die linearisierte Sequenz ein, so ergeben sich mehrere Cluster von Proteaseschnittstellen, die nach genauer Analyse den Loopregionen des Proteins zugeordnet werden können. Zwischen zwei Loops findet man die erwarteten amphipatischen Muster von  $\beta$ -Strängen wieder. Diese Muster, zusammen mit den Proteolysedaten, ergeben das in Abbildung 39 aufgestellte Topologiediagramm, das HVDAC1 als 16-strängiges Porin mit N-terminaler  $\alpha$ -Helix und sieben kurzen Turns sowie acht relativ kurzen cytosolischen Loops postuliert.

### 3.3 Ergebnisse zu Porin P100 aus *Thermus thermophilus*

#### 3.3.1 Homologieüberlegungen und Sekundärstrukturvorhersagen

Porin P100 aus *T. thermophilus* besitzt 917 AS und wird aus drei Domänen modular zusammengesetzt:

- An die N-terminale SLH (*S-layer homology*)-Domäne (AS 1 - ~ 70)
- schließt die *triple-coiled-coil*-Domäne (AS 70 - ~ 260) an, die in die
- große integrale Membrandomäne (AS 260 - 917) mündet.

Die Sequenzvergleiche der kleinen SLH-Domäne mit Proteinen der Datenbank ergeben eine hohe Ähnlichkeit zu mehreren Proteinen, deren Lokalisation als periplasmatisch oder membranständig angegeben wird. Die höchste Identität mit etwa 50% existiert zu der SLH-Domäne von Omp $\alpha$  aus *Thermotoga maritima* (SP: Q01969), einem Protein, das durch eine weitere Domäne in der äußeren Membran verankert wird und eine *coiled-coil*-Domäne besitzt, welche die beiden Domänen verbindet. Daneben findet man starke Ähnlichkeit zu S-layer-Proteinen aus *Bacillus licheniformis* (SP: P49052) und *Bacillus anthracis* (SP: P49051), die beide über drei homologe repetitive Domänen der SLH-Faltung verfügen. Auch ein enzymatischer Vertreter, die Exozellobiohydrolase aus *Clostridium thermocellum* findet sich unter diesen und zeigt gleich drei dieser N-terminalen repetitiven Einheiten. Das Cellulosome-verankernde Protein (SP: Q06852) besitzt sogar vier repetitive Domänen, von denen allerdings die Domänen eins und vier nicht in kompletter Länge vorliegen.

Die Vorhersage der Sekundärstrukturen sagt ein  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ -Motiv mit zwei langen  $\alpha$ -Helices voraus, die ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt flankieren und damit einen Sekundärstrukturgehalt von 63% (57%  $\alpha$ -Helix, 6%  $\beta$ -Faltblatt) ergeben.

Innerhalb des Alignments der in Abb. 40 ausgewählten Sequenzen sind nur zwei AS hochkonserviert, nämlich ein Tryptophan zu Beginn der Helix1 und ein Glycin in dem kurzen Betastrang. Allerdings erkennt man auch am Beginn der Helix2 ein in nahezu allen Domänen konserviertes *Leu-Thr-Arg*-Motiv.



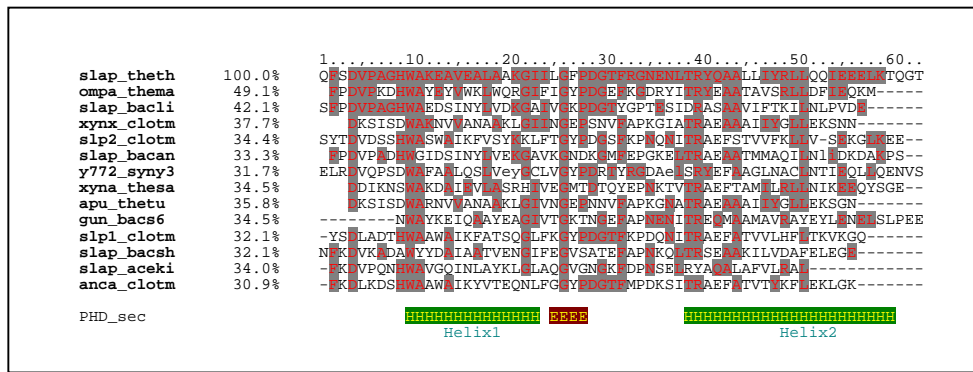


Abb. 40: BLAST-Sequenzalignment der N-terminalen SLH-Domäne aus P100.

Eine Sekundärstrukturvorhersage der Struktur zwischen AS 70 und 260 ergibt Korrelationswerte, die auf *coiled-coil*-Motive hindeuten. In diesem Bereich zeigt die Sequenz keine ausgeprägten Ähnlichkeit zu bekannten bakteriellen Proteinen. Mit 22% besteht jedoch auch für diese Domäne die höchste Identität zu Omp $\alpha$  aus *Thermotoga maritima*. Entsprechend dem Programm COILS [Lupas, 1996] zeigt die *coiled-coil*-Struktur eine Framelänge von 28 Resten, die sich insgesamt viermal wiederholt.

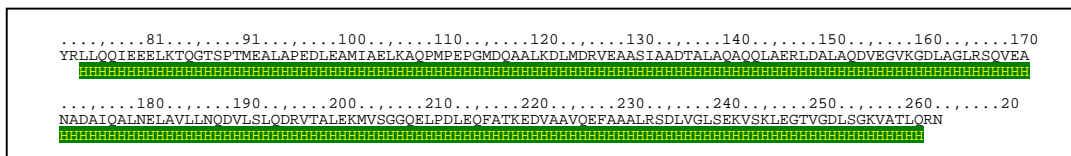
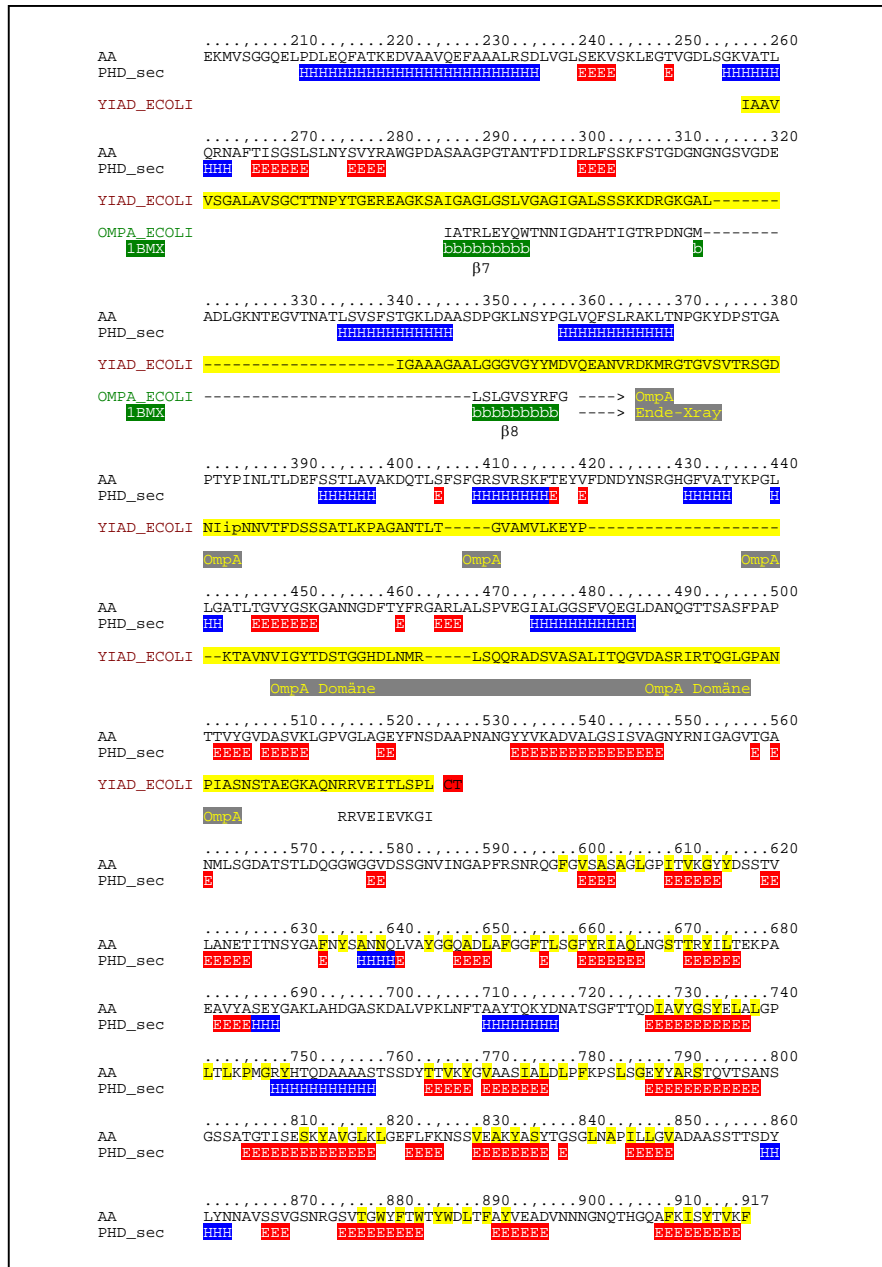


Abb. 41: COILS-Sekundärstrukturvorhersage der *Coiled-coil*-Domäne von P100.

Eine Alignierung der etwa 70 kD großen C-terminalen Domäne führt zu einem Lipoprotein aus *E. coli* (SP: P37665) mit einem Molekulargewicht von 22 kD. Dieses wiederum zeigt eine große Ähnlichkeit zu der C-terminalen periplasmatischen Domäne von OmpA aus *E. coli* und schließt in seinem N-terminalen Bereich die beiden letzten  $\beta$ -Stränge der N-terminalen und strukturell bekannten Membrandomäne von OmpA mit ein. Gemäß der Homologie zu OmpA findet sich auch in dem C-terminalen Bereich des Lipoprotein eine sogenannte OmpA-Domäne, die offensichtlich auch in P100 konserviert. Das Alignment und die Sekundärstrukturvorhersage für die Membrandomäne von P100 sind in Abb. 42 gezeigt.

Die Sekundärstrukturvorhersage ergibt für diese C-terminale Domäne 17%  $\alpha$ -Helix, 28%  $\beta$ -Faltblatt und 55% ungeordnete Struktur. Die  $\alpha$ -helicalen Bereiche befinden sich insbesondere im N-terminalen Bereich der Domäne, die noch einen kleinen Teil der *coiled-coil*-Region einschließt, dann in die Lipoprotein- und zuletzt in die integrale

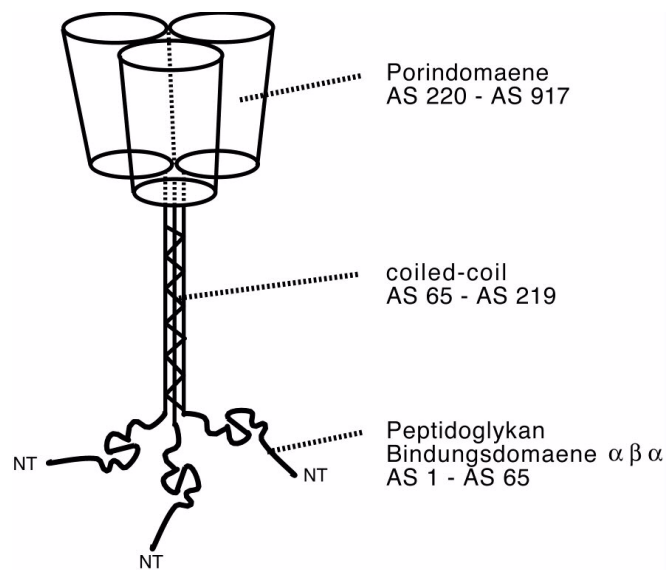
$\beta$ -Barreldomäne übergeht. Der große integrale  $\beta$ -Strukturbereich im C-terminalen Teil des Proteins beginnt etwa bei AS 530, dem Ende der OmpA-Homologiedomäne und endet am C-Terminus mit einem Phenylalanin.



**Abb. 42:** Sequenzalignment zwischen der C-terminalen Domäne aus P100, dem Lipoprotein Yiad\_ecoli und OmpA aus *E. coli* (SP: ). Helices (H) und  $\beta$ -Struktur (E) sowie die aus der OmpA-Struktur bekannten  $\beta$ -Stränge (b) sind markiert. Die OmpA-Domäne ist gesondert gekennzeichnet.

Ein aus den Sekundärstrukturvorhersagen entwickeltes sehr schematisches Modell ist in Abb. 43 dargestellt. Der kurzen N-terminalen SLH-Domäne ( $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ -Motiv) folgt eine etwa 9 - 10 nm lange Coiled-coil-Domäne, die aus den drei langen N-terminalen

Enden des Proteins gebildet wird, die dann in die große integrale und eigentliche Porindomäne münden.



**Abb. 43:** Schematisches Modell von P100 aufgestellt basierend auf Sequenzanalyse und Sekundärstruktur- vorhersagen.

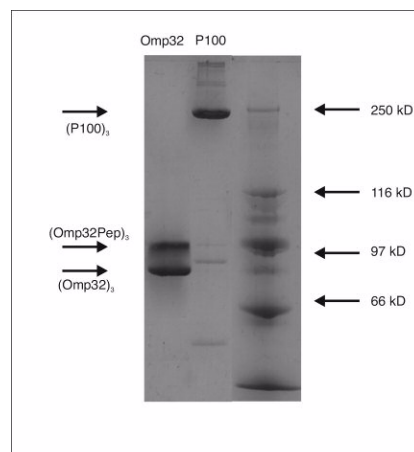
### 3.3.2 Zellzucht und Reinigung

*Thermus thermophilus* ist ein Gram-negatives Bakterium mit einer Wachstumstemperatur von 60 - 70°C unter aeroben Bedingungen. 16S-rRNA Sequenzen führen zu einer Einteilung des Bakteriums in die Klasse der grünen Nicht-Schwefel-Bakterien. Das fadenförmige Bakterium mit einer Länge von bis zu 10 µm und einem Durchmesser von 1 - 3 µm besitzt wie alle Bakterien seiner Klasse zwei Membranen. Die isolierte äußere Membran zeigt schon in elektronenmikroskopischen Aufnahmen einen parakristallinen Aufbau des homotrimeren Proteins P100 [Caston *et al.*, 1993].

Wildtypzellen von *Thermus thermophilus* wurden im Fermenter bei 70°C gezogen. Nach dem Zellaufschluss über *French press* werden im ersten Schritt durch Zentrifugation die Membranen von den löslichen Proteinen abgetrennt, bevor im zweiten Schritt nach Solubilisierung der inneren Membran, diese Proteine von der äußeren Membran abgetrennt werden können. Unter den gewählten Solubilisierungsbedingungen bleibt die durch das Peptidoglykan sehr rigide äußere Membran erhalten und kann durch Zentrifugation pelletiert werden. Die äußere Membran lässt sich dann im letzten Präparationsschritt in Detergentien lösen, nachdem das Peptidoglykan durch Lysozym abgedaut wird.

Das Porin kann in zwei Chromatographieschritten gereinigt werden. Bei einer molekularen Masse von 300 kD bietet sich die Abtrennung kleiner Proteine über Gelpermeations-Chromatografie an, bevor im zweiten Schritt die Trennung von den übrigen noch kontaminierenden Proteinen über einen Anionenaustauscher folgt. P100 zeigt eine hohe Affinität für Anionenaustauscher und eluiert von diesen erst bei einer NaCl-Konzentration von ca. 300 mM.

Das Molekulargewicht der denaturierten P100-Proben im SDS-Gel entspricht sehr gut dem erwarteten MW von etwa 100 kD, während das MW des trimeren Proteins bei einer molekularen Masse von etwa 250 kD läuft. Das Gel in Abb. 44 zeigt zwei Proben im Vergleich unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die Masse des homotrimeren P100-Komplexes zeigt in ihrer Hauptbande ein Molekulargewicht von ca. 250 kD und eine schwache weitere Bande bei etwa 90 kD, die dem monomeren Porin zugeordnet werden kann. Zum Vergleich der Molekulargewichte ist der homotrimere ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> Komplex von Omp32-Peptid-Komplex (~ 110 kD) aufgetragen.

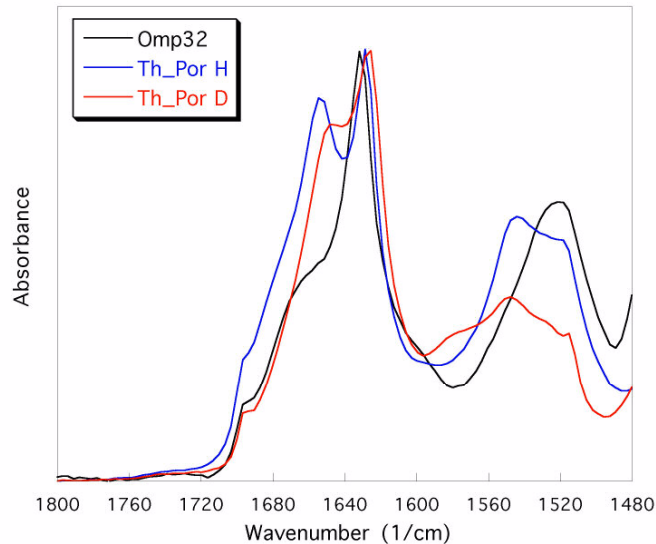


**Abb. 44:** SDS-PAGE von P100 (mittlere Spur) und Omp32-Peptidkomplex (links). Die Proteinproben wurden vor ihrer Auftragung nicht erhitzt.

### 3.3.3 FTIR Spektroskopie

Um den Anteil an Sekundärstrukturen zu bestimmen und den aus der Sekundärstrukturvorhersage hervorgehenden hohen Anteil an  $\alpha$ -Helix zu verifizieren, wurden P100-Proben nach Dialyse mittels FTIR-ATR untersucht. 512 Einzelspektren wurden addiert und gemittelt und ergaben ein FTIR-Spektrum, das nach Spektrenanalyse der Absorption einen relativen Anteil von 40%  $\beta$ -Strang und 30%  $\alpha$ -Helix ergaben. Wie aus dem Spektrum in Abb. 45 deutlich wird, ist der Anteil an  $\alpha$ -Helix in P100 (Bande bei  $1655\text{ cm}^{-1}$ ) erheblich höher als in Omp32, das bis auf die

kurze  $\alpha$ -Helix in L3 eine reine  $\beta$ -Faltblattstruktur (Absorption bei  $1632\text{ cm}^{-1}$ ) darstellt und als Referenzspektrum gewählt wurde. Die Schulter im unten aufgeführten Spektrum bei  $1695\text{ cm}^{-1}$  rührt von einer größeren Anzahl an Turnstrukturen her und zeigt sich auch im Spektrum von Omp32.



**Abb. 45:** FTIR Absorptionsspektren von P100 vor (in blau) und nach Deuteriumaustausch (in rot) und Omp32 (in schwarz) im Vergleich. Eine Analyse von Amid-I-Bande und Amid-II-Bande gibt Aufschluß über den Anteil an Sekundärstrukturen.

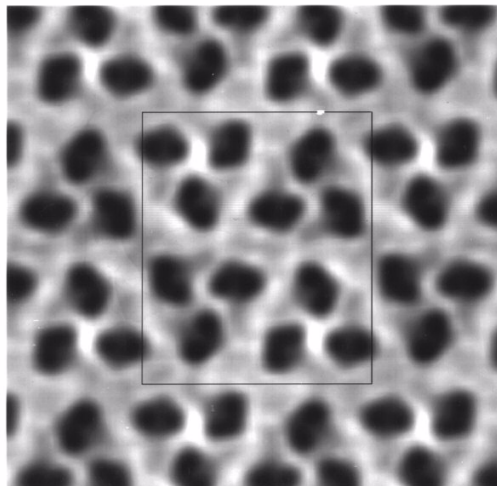
### 3.3.4 2D-Kristallisation und Elektronenmikroskopie

Tertiärstrukturinformation konnte von P100 bei geringerer Auflösung erhalten werden, indem 2D-Kristalle des Proteins dargestellt wurden und als Basis für Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie, Elektronenkristallografie und Rasterkraftmikroskopie eingesetzt werden konnten.

Ausgehend von einer Lösung mit dem Protein als Protein-Detergens-Micelle und Lipid in einem Lipid-zu-Proteinverhältnis (LZP) von 1:1 bis 500:1, wird durch Dialysetechnik das Detergens sukzessive entfernt. Die Bildung von 2D-Kristallen bzw. Vesikeln kann in der verwendeten Apparatur simultan über die Zunahme der Streulichtintensität beobachtet werden.

Das Verhältnis von Lipid zu Protein wurde über einen sehr weiten Bereich variiert und unter fast allen gewählten Verhältnissen wurde Vesikelbildung und 2D-Kristalle in einer Größe von bis zu  $15\text{ }\mu\text{m}$  beobachtet. Die Kristallgröße und -qualität sowie deren Raumgruppe wurde durch Kontrastierung der Kristalle mit Uranylacetat im Elektronenmikroskop bestimmt. Abhängig von der LZP bildeten sich kleinere Kristalle

bei einem Lipidüberschuss von 1:1 bis 1:2 Kristalle mit der Symmetrie  $P22_12_1$ , die jedoch von schlechter Qualität waren. Diese Kristalle wurden später auch unter dem AFM untersucht und zeigen eine parallele Orientierung der Poren relativ zur Kristallebene. Über den weiten Bereich von LZR 10:1 bis 500:1 bildeten sich Kristalle der Symmetrie P2. Darin liegt das Porin in einer antiparallelen Orientierung vor, die sich insbesondere für die Untersuchungen im AFM als sehr vorteilhaft erweisen sollte. Die Zellkonstanten der Kristalle wurden im EM mit  $a = 40,8 \text{ \AA}$ ,  $b = 47,7 \text{ \AA}$  sowie  $\gamma = 90^\circ$  ermittelt. Die Aufnahmen in negativer Kontrastierung nach Mittelung sind unten abgebildet und zeigen drei Symmetrie-verwandte Partikel mit intensivem Kontrast der Pore. Die asymmetrische Einheit, deren Inhalt von vier Porinen gebildet wird, ist in Abb. 46 als Rechteck gekennzeichnet. Obwohl die Aufnahmen nur in Transmission gemacht wurden, erkennt man in den Partikeln unterschiedlicher Orientierung leichte Unterschiede, was deren Kontrast betrifft. Dies lässt auf die unterschiedliche Bindung oder Zugänglichkeit von Uranylacetat schließen.



**Abb. 46:** EM-Aufnahme eines 2D-Kristalls von P100 nach Mittelung. Die Einheitszellvektoren sind als dargestellt.

EM-Bilder der negativ-kontrastierten Proben wurden von großen kristallinen Arealen aufgenommen und nach Bestimmung der Raumgruppenparameter an Hand der Powerspektren ausgewählt. Eine Anzahl von 354 Einheitszellen wurde gemittelt und durch die äußersten Reflexe der Powerspektren bei  $15 \text{ \AA}$  die Auflösung der Kristalle bestimmt. Der Durchmesser des monomeren Porins in Abb. 46 erscheint im Vergleich zu bekannten bakteriellen Porinen mit  $5 - 6 \text{ nm}$  etwas erweitert.

Da die Kontrastierung durch Uranylacetat eine wenig schonende Behandlung für Proteine darstellt, wurden nachfolgend die Kristalle in Glucose und Aurothiglucose (ATG) eingebettet, in  $N_2$  eingefroren und konventionell sowie in Beugung im EM

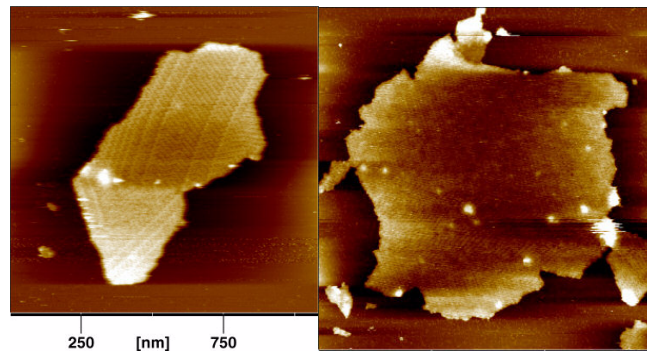
untersucht. Der reine Proteinkontrast der nativen Kristalle in Glucose ist nun sehr schwach und es sind im Powerspektrum nur Beugungsreflexe bis ca. 25 Å zu beobachten. Der Kontrast von in ATG eingebetteten Kristalle ist jedoch erheblich besser und Powerspektren zeigen hier für die besten geordneten Bereiche eine Reflexverteilung bis zu 18 Å (Daten werden hier nicht gezeigt).

### 3.3.5 AFM-Untersuchungen an 2D-Kristallen von P100

Da im Elektronenmikroskop 2D-Kristalle am einfachsten in Projektion zu untersuchen sind und im Fall von Porinen der Kontrast der Uranylacetat-gefüllten Pore dominiert, lassen sich flexible Domänen wie z.B. eine *coiled-coil*-Struktur in Mittelungen deshalb nur ansatzweise oder gar nicht darstellen.

Das AFM kann in solchen Fällen als komplementäre Methode einbezogen werden, da sein Potenzial neben der guten Auflösung und einem guten Signal-Rausch-Verhältnis, vor allem in der Möglichkeit zur Datensammlung unter den nativen Bedingungen einer Pufferlösung liegt. Zudem kann durch die Variation der Kraft zwischen AFM-Spitze und Oberfläche des beobachteten Proteins Aufschluss über die Flexibilität bzw. Deformierbarkeit der Probe und ihre Topologie geben. Abhängig vom Abstand der Spitze zur Unterlage (entsprechend der übertragenen Kraft) lassen sich so teilweise sehr selektiv einzelne topologische Bereiche und vertikale Schichten eines Proteinkristalles mit relativ guter Auflösung darstellen.

Im vorliegenden Fall des P100-Kristalls wird die maximale Ausdehnung in z-Richtung (relativ zur Unterlage) durch den langen *coiled-coil* und die SLH-Domäne vorgegeben. Es sollte nun prinzipiell gelingen können, in den Kristallen mit antiparalleler Orientierung der Porinmoleküle, durch Variation der Kraft einmal den flexiblen *coiled-coil* bzw. die kleine N-terminale SLH-Domäne abzutasten (entsprechend einem großen Abstand zwischen Spitze und Unterlage) und nach Reduzierung des Abstandes zwischen Spitze und Oberfläche dann an ein und derselben Probe auch noch die Porenoberfläche abzubilden.



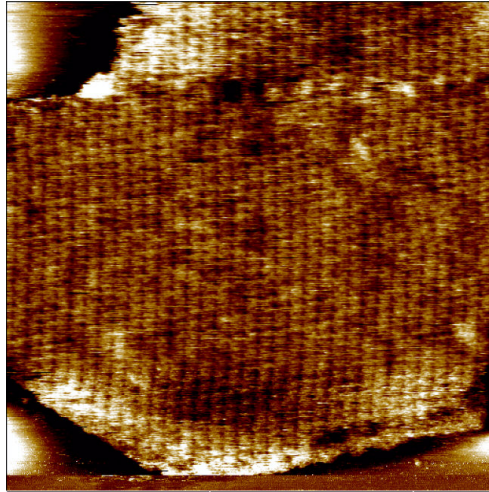
**Abb. 47:** Zwei kristalline Fragmente mit LZP 500 absorbiert auf Glimmer. Die Oberfläche wurde im *tapping mode* abgetastet. Die Größe der meisten auf Glimmer absorbierten Fragmente lag zwischen 200 und 1000 nm.

Die Präparation der Kristalle auf Glimmer war relativ einfach. Die Kristalltypen paralleler und antiparalleler Orientierung wurden zu diesem Zweck für kurze Zeit mit Ultraschall behandelt und dadurch in der Pufferlösung vereinzelt. Danach wurde die Probe unter physiologischen Pufferbedingungen auf Glimmer aufgebracht und überschüssige Kristalle nach kurzer Inkubationszeit durch sorgfältiges Waschen entfernt. Alle Proben wurden im *tapping*-Modus abgebildet und verschiedene Spitzen mit leicht unterschiedlichen Anregungsfrequenzen eingesetzt.

Die ersten Messungen ergaben, dass sich insbesondere die Kristalle der antiparallelen Proteinerorientierung im *tapping*-Modus unter den gewählten Puffer gut abbilden ließen. In Fig. 47 sind zwei typische Kristallfragmente einer Größe von ca. 500 nm adsorbiert auf Glimmer zu erkennen (LZP war hier 500). Unter den im AFM beobachteten Fragmenten lag die Größe zwischen 200 und 2000 nm. Große Fragmente mit bis zu 10  $\mu\text{m}$ , wie sie im EM oft zu finden waren, wurden unter den AFM-Bedingungen der Adsorption nicht wiedergefunden.

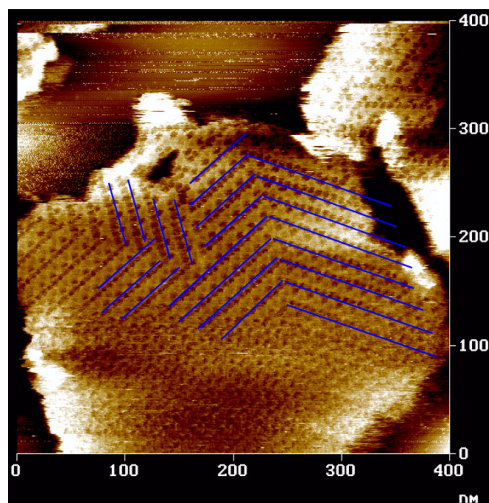
Auf fast allen Bildern selbst mit einer relativ schlechten Auflösung erkennt man schon das regelmäßige Gitter der kristallinen Fragmente. Fig. 48 zeigt ein Fragment mit LZP 1 und einer Größe von etwa 400 nm. Die Raumgruppe dieser Kristallfragmente ist P2. Auf den Bildern erkennt man eine Kristalloberfläche, die durch Proteine mit gleicher Orientierung gebildet wird. Kristalle diesen Typs wurden auch im EM analysiert, zeigten aber schon dort eine schlechte Ordnung und waren schwierig zu indizieren. Die Auflösung, die auf diesen Kristallen erzielt werden konnte, war deshalb auch im AFM schlechter als jene mit einem höheren LZP-Verhältnis. Die 2D-Kristalle der parallelen Orientierung lagen alle in einer Orientierung vor, in der die *coiled-coil*-Domäne in Richtung der Spitze orientiert war, sodass nur diese eine Oberfläche des Kristalls strukturell zugänglich war.





**Abb. 48:** 2D-Kristall von P100 gewachsen unter LZP-Verhältnis von 1. Der Kristall wurde nicht gemittelt. Der parallel orientierte Einbau der Proteine ist gut sichtbar. Die Oberfläche zeigt die Ansicht von der periplasmatischen Seite.

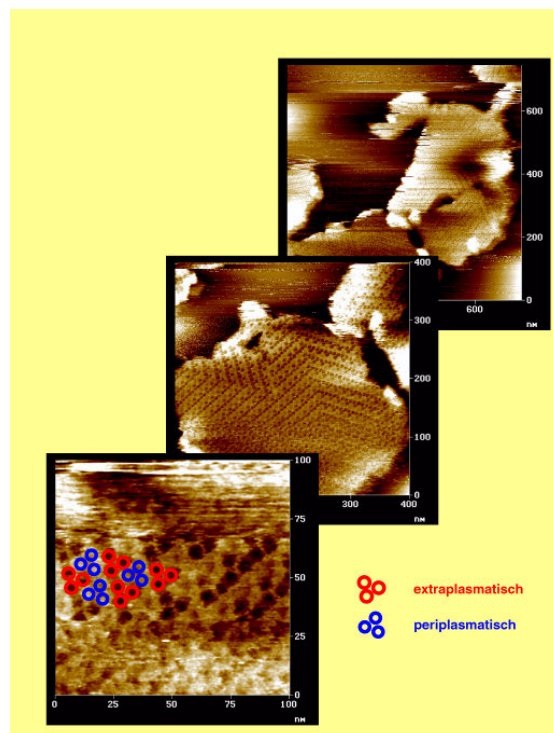
Verschiedene kristalline Fragmente der Kristalle mit hohem Verhältnis von Lipid zu Protein wurden ausgewählt und unter hoher Kraft abgebildet. Das Gitter und die Anordnung der drei Poren war hier schon bei relativ niedriger Auflösung sehr gut sichtbar. In allen abgebildeten Kristallen dieses Typs fällt auf, dass einzelne kristalline Domänen gegeneinander verschoben sind. Abb. 49 zeigt diese Fehlordnung einzelner Domänen sehr eindrucksvoll. Diese Gitterartefakte wurden unter den für das EM gewählten Adsorptionsbedingungen nicht beobachtet und könnten deshalb erst durch die Adsorption der 2D-Kristalle auf Glimmer induziert worden sein.



**Abb. 49:** P100-Kristalle (LZP500) abgebildet mit hoher Kraft. Die Versetzung der Gitterlinien in einzelnen Domänen ist mit blauen Linien markiert.

Unter den Bedingungen höherer Kraft verbessert sich die Auflösung der trimeren Pore und deren Durchmesser lässt sich bei großen Bildausschnitten entsprechend

einer Pixelgröße von 0,5 - 1 nm (siehe Abb. 50 unteres Bild) mit etwa 5 nm bestimmen und mit den EM-Daten gut korrelieren. Außerdem erkennt man in diesen Bildern immer auch Teile des *coiled-coils* und der SLH-Domäne, die durch die antiparallele Orientierung immer mit abgebildet wurden. In Fig. 50 ist diese Orientierung dargestellt bei hoher Auflösung dargestellt. Die Orientierung der extraplasmatischen Pore ist dabei mit roten Kreisen gekennzeichnet, die der periplasmatischen mit blauen.

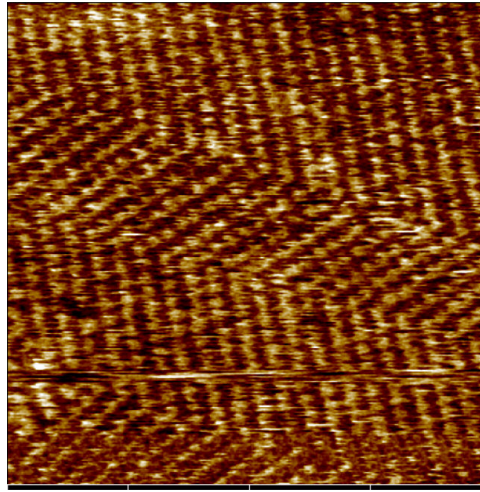


**Abb. 50:** Darstellung eines P100-Kristalls bei niedriger, mittlerer und hoher Auflösung. Bei hoher Auflösung sind einzelne Porintrimere bzw. Poren sichtbar, deren extraplasmatische Seite mit roten, die periplasmatische Seite mit blauen Kreisen markiert ist.

Rastert man die Kristalle unter geringer Kraftübertragung bzw. großem Abstand zwischen Spitze und Unterlage ab, so erfasst die Spitze nur die oberste Kristallschicht, d.h. die N-terminale Domäne. Da diese Domäne sehr flexibel ist, erkennt man in Bildern mit schlechtem Signal/Rausch-Verhältnis zwar das Gitter der Porine, eine Struktur der Domäne lässt sich jedoch nicht wirklich erahnen.

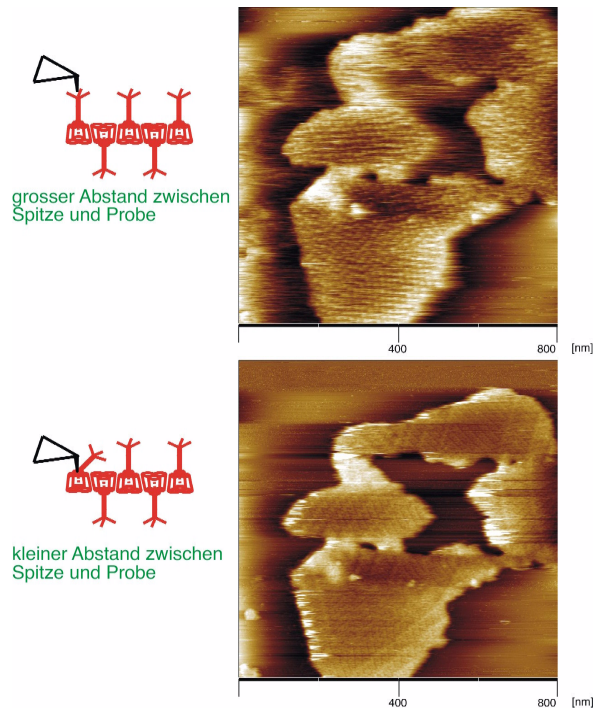
Abbildung 51 zeigt einen Ausschnitt eines 2D-Kristalls der unter Bedingungen schwacher Kräfte abgetastet wurde. Auch in diesem Fall erkennt man die ausgeprägte Störung der Gitterstrukturen. Der Abstand zwischen zwei Domänen entspricht sehr gut dem der durch EM ermittelten Zellkonstanten. Auch in diesem Fall lassen sich die *triple-coiled-coil*-Domänen getrennt voneinander darstellen, allerdings

reicht die Auflösung nicht aus, um die drei N-terminalen SLH-Domänen zu unterscheiden.



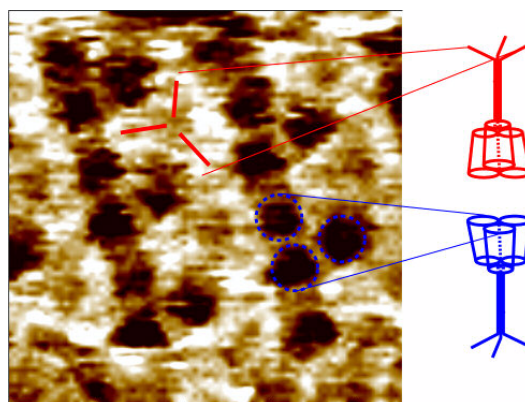
**Abb. 51:** 2D-Kristall von P100 bei niedriger Kraft im AFM abgetastet.

Die Kristalle mit der antiparallelen Orientierung (LZP: 500) der *coiled-coil*-Domäne sind ideal für ein AFM-Experiment geeignet, bei dem, in Abhängigkeit von dem Abstand zwischen Spitze und Probe, einmal die tiefer liegende Porindomäne abgebildet werden kann und zum anderen die aus dem 2D-Kristall heraus ragende *coiled-coil*-Domäne. Das Experiment kann an ein und derselben Probe durchgeführt werden. Das Prinzip dieses Experiments ist in Abb. 52 schematisch angedeutet. Solange der Abstand zwischen Spitze und Probe groß ist, und die AFM-Spitze gerade noch die Probenoberfläche berührt, kann nur die äußerste Domäne (*coiled-coil*) abgebildet werden. Dies ist im oberen Bild von Abb. 52 gezeigt. Da diese Domäne sehr flexibel ist, zeigt sich in den AFM-Bildern bei geringer Auflösung nur eine undefinierte, aber periodische Struktur, deren Abstand zu den Symmetrieverwandten Punkten ähnlicher Höhe gut mit der Gitterkonstante übereinstimmt. Erhöht man die Kraft (unteres Bild), so bildet man Strukturen des Kristalls ab, die denen im obigen Abschnitt erwähnten entsprechen. Die drei regelmäßigen großen Poren und die *coiled-coil*-Domäne, deren Struktur sich in diesen Bildern nur durch eine Erhöhung mit dreizähliger Symmetrie verdeutlicht lassen sich dann abbilden.



**Abb. 52:** Prinzip der Kraft-Experimentes. Bei großem Abstand zwischen Spitze und Probe wird nur die äußerste Oberfläche des Porinkristalls abgetastet (oberer Fall). Wird der Abstand der Spitze zur Unterlage vermindert, lassen sich auch die tiefer liegenden Porendomänen sichtbar machen.

Das Strukturmodell in Fig. 53, das aus den obigen AFM-Messungen entwickelt werden kann, sieht eine antiparallele Orientierung der Porintrimere im Kristall vor. Die Abbildung der *coiled-coil*-Domäne gelingt unter Bedingungen schwacher Kraft, zeigt jedoch aufgrund der Flexibilität keine Strukturierung. Die abgeschätzte Länge des *triple-coiled-coil* beträgt ca. 9 nm und stimmt damit recht gut mit den Vorhersagen überein. Die drei großen Porinporen lassen sich, wie im unteren Bild sichtbar, sehr gut abbilden und die monomere Pore zeigt einen Durchmesser von etwa 5 nm.



**Abb. 53:** Molekulare Modell von Porin P100. In Kristallen mit antiparalleler Orientierung der Moleküle lassen sich diese bei hoher Kraft abbilden und dabei bei Domänen gleichzeitig sichtbar machen. Die N-terminale *coiled-coil*-Domäne ist dabei in rot, die C-terminale Membrandomäne in blau gekennzeichnet.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion zu Omp32

#### 4.1.1 Sequenzanalyse von Omp32 und verwandten Porinen

Die Alignierung der Omp32-Sequenz mit den verfügbaren Datenbanksequenzen führt zu den Porinen der  $\beta$ -Unterabteilung der Proteobakterien und zeigt hier zu Porinen aus den Gruppen der *Neisserii* und *Bordetella* die höchste Ähnlichkeit. Eine vergleichbare Übereinstimmung besteht außerdem zu einem Porin der  $\gamma$ -Unterabteilung, aus dem moderat halophilen Bakterium *E. vacuolata*. Dieses Porin ist im Zusammenhang mit Omp32 von besonderem Interesse, da es trotz der phylogenetischen Distanz eine große Sequenzähnlichkeit zeigt und, ebenso wie Omp32, funktionell ein Anionen-selektives Porin darstellt [Wolf *et al*, 1997].

Bei der Analyse konservierter Proteinbereiche zeigt sich die große Ähnlichkeit zwischen den Porinen vor allem im Bereich der integralen Membrandomäne, in der die Substitution einzelner AS nur unter Beachtung der Amphipathiekriterien erfolgen kann. Gerade für die Membran-zugewandte Seite wird dies besonders deutlich, da hier hauptsächlich AS mit aliphatischem Charakter (Leu, Ile und Val) vorkommen und nur durch eine dieser drei ersetzt werden können. Neben dem Membranbereich sind auch die kurzen periplasmatischen Turns stärker konserviert, die bevorzugt durch Glycine und Proline ausgebildet werden und die wegen der besonderen geometrischen Anforderungen nur schwer ersetzt werden können.

Bei der Analyse der identischen AS auf dem Level einzelner konservierter Reste fallen z.B. im Alignment zwischen Omp32 und dem Porin aus *E. vacuolata* 27 konservierte Glycine auf, die fast ein Drittel der insgesamt 91 identischen AS ausmachen. Daneben findet man in vielen Porinen konservierte AS innerhalb des Aromatengürtels.

Eine auffällig hohe Konservierung in den Bereichen der  $\beta$ -Stränge  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 16$  könnte strukturell wichtig sein, weil das periplasmatische 54-AS-Peptid über  $\beta 1$  an das Porin bindet. Die über Wasserstoffbrücken vermittelte Bindungsstelle ist in allen Porinen aus den Klassen *Neisserii* und *Bordetella* konserviert. Eine Konservierung der AS in diesem Bereiches weist somit auf ein strukturell wichtiges Bindungsmotiv hin. Hingegen findet sich weder in dem Porin aus *E. vacuolata* noch in den strukturell bekannten Porinen wie z.B. OmpF dieses Bindungsmotiv wieder. Neben der Bindung

des Peptids sind  $\beta 1$  und  $\beta 16$  jedoch auch in die Monomer-Monomer- und Trimerwechselwirkungen involviert, in die auch  $\beta 2$  teilweise eingebunden ist.  $\beta 16$  endet C-terminal wie in den meisten sequenzierten Porinen, und vielen weiteren Proteinen der äußeren Bakterienmembran, mit einem Phenylalanin. Dieses Phenylalanin scheint *in vivo* neben der Assemblierung auch für die Membraninsertion der Proteine verantwortlich zu sein [de Cock *et al.*, 1997]. Im Gegensatz zu den bakteriellen Proteinen besitzen die mitochondrialen Proteine der äußeren Membran wie VDAC und TOM40 dieses Phenylalanin nicht mehr, assemblieren aber auch nicht.

Omp32 zeigt durch eine Einstülpung auf  $\beta 2$  (P1 in Abb. 23) und auf Loop3 (P2 in Abb. 23) ein für unspezifische Porine strukturell neues Faltungsmotiv, das im ersten Fall etwa 10 Å weit in die Pore ragt (P1) bzw. sich im zweiten Fall am Poreneingang befindet (P2) und mit P1 zusammen zu einer erheblichen Porenverengung beiträgt. Die Analyse der Sequenzen im Bereich der ersten Protrusion P1 (AS 32 - 37 in Omp32) deutet auf ein generelles Auftreten dieses Strukturmotivs in den Porinen der  $\beta$ -Unterabteilung hin (siehe auch Abb. 8a). Dagegen zeigt sich im Porin aus *E. vacuolata* im Bereich von P1 eine Deletion von fünf AS, die ungefähr der Länge dieser Protrusion entsprechen würde (siehe Abb. 8b). Auch der Bereich der zweiten Protrusion P2 (AS 118 - 130 in Omp32) lässt sich mit den verwandten Porinen alignieren. Allerdings weisen einige Punkt-Deletionen in diesem Bereich darauf hin, dass der Verlauf und auch die Länge der Ausstülpung leicht abgewandelt sein könnten.

Konservierte elektrostatische Motive im Poreninneren scheinen innerhalb der Porinüberfamilie nicht zu existieren, sieht man sich die Potentialoberflächen der strukturell bekannten Porine an. Allerdings sind in vielen bekannten Porinen z.B. drei Arginine (Arg38, Arg75, Arg133 in Omp32) im Zentrum der Porenengstelle konserviert. Diese Arginine bilden in Omp32 einen Teil der 'Argininleiter' (siehe Abschnitt 3.1.11) und sie könnten dadurch einen Beitrag zum Transport negativ geladener Substrate durch die Pore leisten.

Die Alignierung der Peptidsequenz mit der Datenbank führt - wie erwartet - auch zu einer Familie von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 20 kD aus der Gruppe der *Bordetella* und *Neisserii* (Abb. 10). Die Identität zwischen diesen Sequenzen ist mit fast 70% jedoch erheblich höher als für die der Porine.



Damit erweist sich der Komplex aus Omp32 und dem 54-AS-Peptid als eine Art Modellkomplex für die Porin-Komplexe der pathogenen Arten, der dazu dienen kann, Strukturmodelle dieser noch unbekannteren Porine zu erstellen.

#### 4.1.2 Topologieuntersuchungen an Omp32

Durch die Succinylierung von Porinen kann deren Eigenschaft hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit in planaren Membranen verändert werden, da mit jeder Modifikation eine Veränderung der Ladung einhergeht. Drei der succinylierten Proben von Omp32 (S1, S10 und S100) wurden auf ihre Leitfähigkeitseigenschaften in planaren Membranen untersucht, jedoch ohne Einsprünge zu registrieren. Der Grund dafür, dass keine Membraninsertionen beobachtet werden konnten, kann auf verschiedenen Ursachen beruhen, die hier jedoch nicht diskutiert werden sollen.

Bei einem Vergleich der Reaktivitäten zwischen den Porinen aus *C. acidovorans* und *R. capsulatus* zeigt sich, dass bei einem Verhältnis von 100 (entspricht Probe S100), im Porin aus *R. capsulatus* nur vier Succinylierungen auftreten (von 10 möglichen Stellen), während in Omp32 etwa 15 Lysine modifiziert werden (von 17 möglichen Stellen). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte unter anderem auf den unterschiedlichen Oberflächenpotentialen der beiden Porine basieren und auch auf dem engeren Porendurchmesser von Omp32. Auch eine Analyse der Succinylierungsstellen zeigt signifikante Unterschiede im Modifikationsverhalten. Unter den selben Reaktionsbedingungen werden im Porin aus *R. capsulatus* drei Lysine im Poreninneren und dessen N-Terminus modifiziert. Im Unterschied dazu werden in Omp32 zuerst die Lysine des Lysingürtels modifiziert, bevor die schlechter zugänglichen des Poreninneren modifiziert werden. Unter der Annahme, dass die Succinylierung kinetisch gesteuert wird und der Theorie von McConolly folgt, ergibt sich aus obigem ein für die Reaktivität von Omp32 erwartetes Bild, während die Reaktivität des Porin aus *R. capsulatus* eher unerwartet ist. Die reaktivsten  $\epsilon$ -Aminogruppen sind in Omp32 auch die am besten zugänglichen und befinden sich bevorzugt im Bereich des Lysingürtels und der kurzen periplasmatischen Turns. Der Lysingürtel ist somit nicht durch den Detergensmantel der Protein-Detergens-Micelle in seiner Zugänglichkeit verdeckt, sondern scheint frei zugänglich zu sein. Damit spiegelt das Reaktionsverhalten von Omp32 sehr gut die Korrelation zwischen Zugänglichkeit und Reaktivität wieder. Dieses Reaktionsverhalten wurde auch für andere Proteine beschrieben, so z.B. für die Succinylierung von Hühner-

Eiweisslysozym, dessen reaktivste Stelle auch gleichzeitig die beste Oberflächenzugänglichkeit besitzt [Glocker *et al.*, 1994].

#### **4.1.3 Kristallisation und Datensammlung**

Kristallisationsansätze mit der ursprünglichen Jancarik Matrix führten mit dem Detergens  $\beta$ -OG zu einer ungewöhnlich großen Zahl von 21 Kristallisationsbedingungen. Verglichen mit Lysozym, das als gut kristallisierendes lösliches Enzym nur 14 Kristallisationsbedingungen zeigt, ist diese Vielfalt insbesondere auch im Hinblick darauf bemerkenswert, dass Omp32 ein Membranprotein ist. Von den 21 Bedingungen wurden nur Kristallisationsbedingungen verfolgt, in denen Salze als Fällungsmittel enthalten waren, da unter solchen Bedingungen die größten Kristalle erzielt werden konnten. Der Nachteil von hohen Salzkonzentrationen in Verbindung mit Detergentien hoher *cmc* ist allerdings, dass sie die Neigung zur Phasentrennung im Kristallisationstropfen erhöhen. Dies führte im Fall der KF1 von Omp32 zu Schwierigkeiten, da die Proteinkristalle hier bevorzugt in kleinen, mit Protein und Detergentien angereicherten Phasen kristallisierten und die Kristallgröße stark durch die Phasengrenzen der Tropfen bestimmt war. Kristalle der KF2 wuchsen aus präzipitiertem Protein und erst nach sechs bis neun Monaten.

Beide Kristallisationsformen KF1 und KF2 konnten der Raumgruppe R3 zugeordnet werden. Eine dritte Kristallisationsform, die mit einer Auflösung von nur 3,3 Å und einem Trimer in der asymmetrischen Raumgruppe in P32 kristallisierte, wurde nicht weiter verfolgt. Die Auflösung der Kristalle in R3 war mit 2,1 und 2,3 Å gut, obwohl die Kristalle nicht unter den schonenden Cryo-Bedingungen gemessen werden konnten. Die Güte der Kristalle entspricht damit der auch für andere Porine erzielten. Entsprechend ihrer dreizähligen Symmetrie kristallisieren Porine (z.B. 1PRN, 2POR), wie auch viele weitere Proteine mit einer internen C3-Symmetrie, in R3 oder einer verwandten Raumgruppe (R32, P32, H32).

#### **4.1.4 *Molecular replacement* und SIR-Strukturlösung**

Die Sequenzähnlichkeit zwischen den strukturell bekannten Porinen und Omp32 beträgt 55 - 65%. Obwohl diese innerhalb der Porinfamilie sehr hoch ist, findet man mit 17 - 25% nur sehr niedrige Werte für die Identität der Porine. Zudem stellt die



unterschiedliche Anzahl an AS innerhalb der Porinklasse einen Parameter dar, der zwischen 289 für das Porin aus *R. blastica* und 340 für OmpF variiert, was etwa einem Sechstel der Proteinmasse und damit dem Suchmodell entspricht und die Berechnung der theoretischen Strukturparameter beeinflussen sollte.

Ausgehend von den Koordinaten des OmpF-Modells als dem auf Sequenzebene ähnlichsten Porin wurden initiale Phasen für die Strukturlösung gesucht, wobei die Methode des Molekularen Ersatzes (ME) angewendet wurde. Ähnliche Ansätze zur Strukturlösung von Porinen über ME waren jedoch bislang nur im Fall der beiden hochkonservierten Porine OmpF und PhoE von Erfolg gekrönt. Weder die Strukturlösung von OmpF noch die des Porins aus *R. blastica* mit den Phasen des *R. capsulatus*-Porins führten zum Erfolg. In letzterem Fall besteht eine Ähnlichkeit der beiden Porine von immerhin 70%.

Eine Faustregel für ME besagt, dass eine korrekte Positionierung des Suchmodells im Raum nur dann zum Erfolg führt, wenn der *rms*-Wert aller superpositionierten  $C_{\alpha}$ -Atome nicht größer als ca. 1 Å ist. Betrachtet man die *rms*-Werte der unspezifischen Porine, so zeigt sich schnell, dass schon für das strukturell ähnlichste Porin OmpF ein *rms* von 1,35 Å existiert (für 200 alignierte  $C_{\alpha}$ -Atome). Die *rms*-Abweichung für die beiden Modelle aus *R. capsulatus* und *R. blastica* liegt sogar bei 1,9 Å (für etwa 160  $C_{\alpha}$ -Atome). In diesen Fällen erklärt sich der hohe Wert durch eine leichte Barreldeformation der Porinmodelle. Ein weiterer Parameter, der für die Lösung der Rotationsfunktion negativ beeinflusst haben könnte, ist das zusätzliche 54-AS-Peptid, das etwa einem Sechstel der Gesamtproteinmasse entspricht und in den Suchmodellen nicht mit einbezogen werden konnte.

#### **4.1.5 Strukturanalyse und Vergleich mit bekannten Porinen**

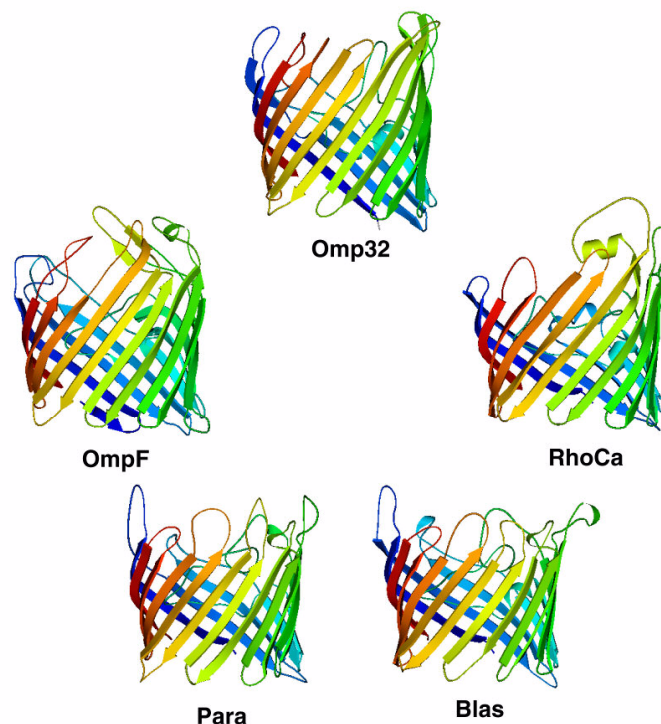
##### **Architektur des Porin-Peptid-Komplexes**

Omp32 ist das erste bakterielle Porin, das als Komplex mit einem periplasmatisch gebundenen Peptid strukturell bei guter Auflösung charakterisiert werden konnte. Dabei erinnert das gebundene Peptid im Komplex durch seine Lokalisation und Ausdehnung entfernt an eine Domäne, die schon für das Porin ScrY aus *S. typhimurium* vorgeschlagen wurde [Forst *et al.*, 1998]. In ScrY existiert eine N-terminale Domäne von etwa 70 AS, die mit den benachbarten N-Termini des Trimers eine *triple-coiled-coil*-Struktur ausbildet. Eine sehr viel größere, funktionell aber

vermutlich sehr ähnliche Struktur findet sich in dem Porin P100 aus *T. thermophilus*, dessen modularer Aufbau von Porin-, *coiled-coil*- und Peptidoglykan-Domäne in Abschnitt 4.3 diskutiert wird.

Die oligomere Architektur von Omp32 spiegelt vor allem im Bereich der 16 antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter die der schon bekannten Porine wieder. Allerdings zeigt der Vergleich der Barrel-Topologien in Abb. 54 eine starke Abweichung, was ihre Wandhöhe und Form im Bereich der Trimerkontaktzone und Membran-zugewandten Seite betrifft.

Vergleicht man die reine Barrelhöhe in dem Bereich, der die Pore zur Membran hin abgrenzt, dann wird deutlich, dass diese für Omp32 etwa 1 nm höher ist, als für die Porine aus *P. denitrificans* und *R. blastica*. Die Wandung von OmpF und dem Porin aus *R. capsulatus* hingegen zeigen eine vergleichbare Höhe. Betrachtet man die Anzahl der in das Barrel integrierten AS, so findet man, dass in Omp32 etwa 60% der AS (202 AS)  $\beta$ -Stränge ausbilden, während dies in OmpF nur 57% (193 AS von 340), in den Porinen aus *R. capsulatus* 57% (170 AS von 301), aus *R. blastica* 59% (172 AS von 289) und aus *P. denitrificans* 55% (162 AS von 295) sind.



**Abb. 54:** Vergleich der Membran-zugewandten Barreelseiten der Porine Omp32, OmpF, RhoCa (Porin aus *R. capsulatus*), Para (Porin aus *P. denitrificans*) und Blas (Porin aus *R. blastica*).

## Faltungsstruktur des Porins

Die Sequenz von Omp32 beginnt mit einem N-terminalen Pyroglutamat, einer Aminosäure, die erst durch post-translationale Cyclisierung eine Glutaminsäure gebildet wird. Der N- und C-Terminus der bisher bekannten Porine befindet sich in allen Fällen auf der periplasmatischen Seite. Während der N-Terminus in den Porinen PhoE und OmpF mit sieben AS wieder in Richtung des C-Terminus in die Membran zurück faltet, findet man in Omp32 den N-Terminus relativ zu den Porinen aus *R. capsulatus* und *R. blastica* in Richtung des periplasmatischen Membranendes verlängert. Dagegen zeigen die C-Termini aller Porine mit einem Abstand von etwa 1 Å zu Omp32 eine geringe Abweichung voneinander.

Die geschlossene Form des Barrels, die durch eine große Anzahl von Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Betasträngen stabilisiert wird, sowie die vielfältigen hydrophoben Monomer-Monomer-Wechselwirkungen verleihen den Porinen eine ungewöhnlich hohe Stabilität. Diese Stabilität und die daraus resultierende Resistenz gegen Proteolyse und thermische Denaturierung findet man - schwächer ausgeprägt - auch in den monomeren Barrelproteinen OmpA und FepA. Für eine in das Barrel einbezogene AS wird bis auf die endständigen AS jeweils eine Wasserstoffbrücken ausgebildet, was zu einem festen Netzwerk führt und für Omp32, je nach zu Grunde gelegten Abstandskriterien, einer Gesamtzahl von etwa 200 Wasserstoffbrücken entspricht. Durch die Ausbildung dieses Netzwerkes kommt auch es zu einem kooperativen Verhalten bzw. Entfalten unter thermischer Denaturierung. Ein weiterer Energiebeitrag zur Stabilisierung der homotrimeren Anordnung wird in manchen Porinen durch die Bindung von zweiwertigen Ionen an den Monomer-Monomer-Kontaktstellen vergrößert wie z.B. im Fall des Porins aus *R. capsulatus*.

Die  $\beta$ -Stränge sind in Übereinstimmung mit anderen Porinen zur Längsachse des Trimers hin geneigt. Der mittlere Neigungswinkel der  $\beta$ -Stränge und der Porenradius lassen sich für ein ideales Barrel über die Scherzahl sowie die Anzahl der  $\beta$ -Stränge plus zwei Abstandskriterien berechnen. Die Scherzahl beträgt 20 für Omp32, wie auch für alle unspezifischen Porine und erfüllt damit die für große  $\beta$ -Barrels aufgestellte Formel:

$$S = n + 4,2,$$

in der S der Scherzahl und n der Anzahl der  $\beta$ -Stränge entspricht [Murzin *et al.*, 1994]. Für ein ideales 16-strängiges Barrel ergibt sich daraus ein mittlerer Neigungswinkel von 42,5 Grad und ein Porendurchmesser von 31 Å. Das Barrel von Omp32 besitzt jedoch durch seine elliptische Verzerrung keine ideale Barreiform mehr und weicht deshalb auf Werte von 2,8 x 3,3 nm ab.

Die mittlere Neigung der Betastränge relativ zur Trimerachse beträgt im Trimerkontaktbereich etwa 55 Grad, während die Neigung im Bereich des der Membran zugewandten Teiles nur etwa 35 Grad ist. Entsprechend dieser Neigung ergibt sich auch eine veränderliche Höhe der Porenwandung, die außerdem abhängig von der Anzahl der AS im betreffenden Strang ist. Im Trimerkontaktzentrum liegt dadurch die stärkste Neigung und geringste Höhe von 23 Å vor, während die zur Membran hin orientierten Seiten die geringste Neigung und mit 48 Å die größte Höhe aufweisen. Der Durchmesser des hydrophoben Teils einer Membran beträgt ca. 30 Å woraus direkt folgt, dass ein monomeres bakterielles Porin durch seine minimale Höhe von nur 20 - 25 Å nicht als solches stabil in die Membran integriert werden kann und es deshalb nur als Trimer seine biologische funktionelle Einheit darstellen kann [Pastor *et al.*, 1991]. Im Gegensatz dazu beträgt die Höhe des monomeren hydrophoben Barrels aus OmpA und OmpX 32 - 35 Å und besitzt damit die für eine Insertion erforderliche Höhe in Membranen [Pautsch & Schulz, 1998].

Die maximale Länge der Betastränge in Omp32 (max. 18 AS) liegt etwas höher als in den bekannten Porinen und auch OmpA (max. 16), ist jedoch kürzer als der längste Strang von FhuA mit 28 AS. Die Länge der  $\beta$ -Stränge zeigt ein Maximum in den beiden ersten Strängen, deren Beginn im Trimerkontaktbereich liegt, deren Ende aber in der Membran-zugewandten Seite liegt.

Von den acht Loops in Omp32 ist L3 wie in allen anderen Porinen der längste und zeigt durch die Ausstülpung P2 ein strukturell neues Motiv. Diese Ausstülpung bedingt vermutlich auch, dass die Loops L5 - L7 mit nur wenigen AS im Vergleich zu anderen Porinen sehr kurz sind und auf Grund der sterischen Gegebenheiten nicht in die Richtung Pore falten können.

Die sieben Turns, deren Länge zwischen einer und fünf AS liegen, werden durch die einzigen drei Proline des Proteins und durch mehrere Glycine ausgebildet. Omp32 zeigt auch extrazellulär verglichen mit anderen Porinstrukturen überwiegend kurze Loopstrukturen. Die kurze  $\alpha$ -Helix, die in den langen Loop L3 leitet, besteht aus sechs AS und befindet sich an derselben Stelle wie in den bekannten unspezifischen



AS 138 bis 141 auf  $\beta 6$  und 154 bis 159 auf  $\beta 7$  in die Kontaktfläche einbezogen. Im C-terminalen Bereich sind T7 sowie die letzten sechs AS von  $\beta 16$  beteiligt. Eine Darstellung der Kontaktfläche von OmpF und dem Porin aus *R. blastica* zeigt ähnliche Bereiche die ebenso den N-Terminus bis L3 einschließen sowie einen kleineren C-terminalen Bereich. In OmpF faltet L2 zudem in die benachbarte Pore und stabilisiert das Proteintrimer durch Ausbildung von mehreren Wasserstoff- und Salzbrücken [Phale *et al.*, 1998]. Im Porin aus *R. blastica* wird das Homotrimer durch Wechselwirkungen von L3 mit den benachbarten Monomeren stabilisiert.

### **Der hydrophobe Membran-exponierte Bereich**

Der hydrophobe Membranbereich besitzt eine Höhe von etwa 25 Å und wird durch zwei Aromatengürtel an seinen Seiten begrenzt. Das Motiv dieser Aromatengürtel findet sich ähnlich auch in  $\alpha$ -helicalen Membranproteinen wieder und dürfte deshalb von prinzipieller Bedeutung für die Verankerung von integralen Membranproteinen in biologischen Membranen sein [Schulz, 1994, Michel *et al.*, 1985]. Der innere hydrophobe Membranbereich stellt eine Weiterführung der hydrophoben Region im Trimerkontaktbereich dar. Auch in Omp32 weisen die Seitenketten der Tyrosine in Richtung der Lipidkopfgruppen, die der Phenylalaninreste ins Membraninnere. Der dem extraplasmatischen Raum nahe Aromatengürtel besteht überwiegend aus Tyrosinen und die Verteilung der Aromaten stimmt so mit der für andere Porine und auch OmpA gut überein. Der dem Periplasma nahe Aromatengürtel enthält wie auch in den bekannten Proteinen der äußeren Membran überwiegend Phenylalanine. Einige der aromatischen AS in den Gürteln sind innerhalb der Porine konserviert. Zwischen OmpF und Omp32 finden sich so fünf konservierte Tyrosine (in Omp32: Tyr140, Tyr154, Tyr178, Tyr212, Tyr259) von denen vier identische Seitenketten-Konformationen zeigen. In Tyr154 zeigt die Aromatengruppe in Richtung des Membranendes, im Falle von OmpF jedoch in die Membran. Auch nach der Alignierung von Omp32 mit den Porinen aus *R. capsulatus* und *R. blastica* zeigen sich mehrere konservierte Tyrosine.

### Der hydrophile Membranbereich

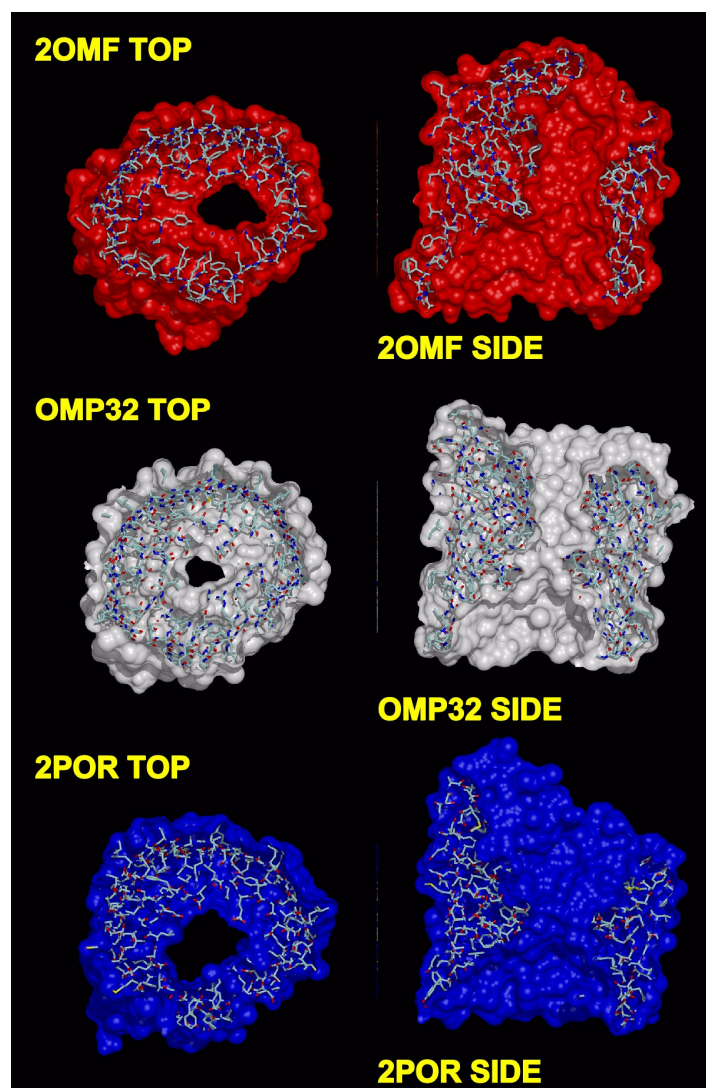
Im Anschluss an den extrazellulären Aromatengürtel befindet sich in allen Porinen eine polare Zone, die in ScrY und dem Porin aus *R. capsulatus* durch eine größere Anzahl von negativ geladenen AS gebildet wird. In Verbindung mit den an ihnen gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können diese AS ein Netzwerk mit sauren Phosphat- und Carboxylatgruppen des LPS ausbilden. In Omp32 und auch für das modellierte Porin aus *B. pertussis* (siehe Abschnitt 4.1.5) findet man eine Ansammlung von 10 (bzw. 8) Lysinen und einem Arginin auf gleicher Membranhöhe, die auf Grund ihrer Ähnlichkeit zu den Aromatengürteln als Lysingürtel bezeichnet werden können. Die starke nach außen hin gerichtete positive Ladung, wird vor allem im Porin aus *B. pertussis* nur partiell durch eine ähnliche Zahl von Aspartaten und Glutamaten kompensiert. Einer Hypothese zufolge basierend auf der Röntgenstruktur von FhuA mit einem LPS-Molekül wird vermutet, dass die Bindung von äußeren Membranproteinen und LPS auch über die Wechselwirkung von Lysinen mit den Phosphaten des LPS vermittelt werden können. Der ausgeprägte Lysingürtel in Omp32 und im Porin aus *B. Pertussis* lässt vermuten, dass Lysine eine wesentliche Rolle bei der Interaktion zwischen dem Porin und dem LPS spielen.

### Das polare Poreninnere

Die Diffusion von Ionen durch Ionenkanäle hängt sehr stark von deren Durchmesser und Oberflächeneigenschaften ab. Alle untersuchten Porine zeigten bislang einen großen Überschuss an negativ geladenen AS und ein negatives Porenpotential auch an der zur Membran gewandten polaren Oberfläche. In den Porinen aus *E. coli* und *R. capsulatus* wird durch die Trennung in zwei Cluster positiver und negativer Ladungen über die Pore hinweg ein elektrisches Feld aufgebaut, dessen Wirkung möglicherweise in der Selektion von polaren Substraten liegen könnte. Trotz der stark negativen Oberflächenladung zeigen diese Porine eine erstaunlich wenig beeinflusste Selektivität für positive Ionen. Diese liegt für das Porin aus *R. capsulatus* und OmpF bei einem Faktor von 1 - 5. Das bedeutet, dass zu dem Einfluss der gesamten Oberflächenladung auch der Einfluss der Porenengstelle tritt und letztlich alle Faktoren zusammen die Diffusionseigenschaften der Poren beeinflussen.

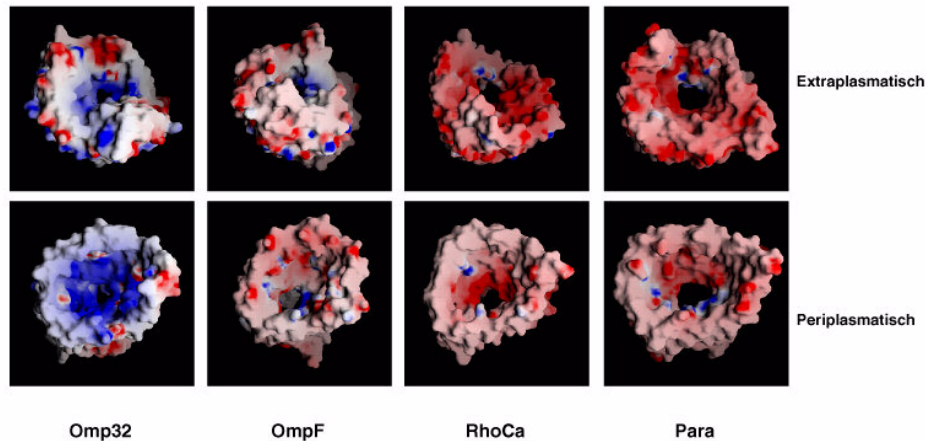
Wie aus einem Vergleich der Porendurchmesser von Omp32 und anderen Porinen hervorgeht (siehe dazu Abb. 56), besitzt dieses unter den unspezifischen Porinen

bekannter Struktur den mit Abstand engsten Porendurchmesser. Nur LamB aus *E. coli* weist einen ähnlichen Porenquerschnitt auf. Die Porenengstelle befindet sich in Omp32 nahezu zentrisch in der Barrelmitte, während die Öffnung im Fall der anderen Porine durch halbseitige Ausbildung des großen Loops zur Trimerachse verschoben sind. Der Durchmesser der Porenengstelle wird vor allem durch zwei strukturelle Merkmale bestimmt. Zum einen ist der große Loop L3 dafür verantwortlich, zum anderen findet man in Omp32 die Einstülpung P1 in  $\beta 2$ . Eine Darstellung dieser Verhältnisse in Form von horizontalen und vertikalen Schnitten in der Nähe der Engstelle ist in Abb. 56 gezeigt. Aus diesen Schnitten durch die Pore geht hervor, dass der Durchmesser der Pore im gesamten Barrelbereich weit unter dem der anderen Porine liegt. Hierfür ist vor allem die große Ausstülpung P2 verantwortlich, die den Bereich von L3 bis fast in den extraplasmatischen Raum stark verengt.



**Abb. 56:** Vergleich der Proteinoberflächen von OmpF (2OMF), Omp32 und dem Porin aus *R. capsulatus* in der Aufsicht und der Seitenansicht.





**Abb. 57:** Vergleich der Oberflächenpotentiale von Omp32 mit OmpF und den Porinen aus *R. capsulatus* und *R. blastica*. Die geladene Proteinoberfläche ist von der extraplasmatischen und periplasmatischen Seite gezeigt.

Ein Vergleich des Oberflächenpotentials von Omp32 und dem anderer Porinen zeigt, dass die Anhäufung positiver Ladungen in der Porenregion überwiegt, was insbesondere in der Aufsicht von der periplasmatischen Seite her deutlich wird. Omp32 ist damit mit einer Ladungsverteilung von +4 das erste Porin bekannter Struktur, das einen Überschuss an positiven Ladungen in der Pore zeigt und kein transversales Feld aufbaut (siehe Abb. 57). Im Längsschnitt zeigt Omp32 eine Verteilung positiver Ladungen, die sich durch die gesamte Pore erstreckt und durch ihre Ähnlichkeit zur 'Aromatenrutsche' der spezifischen Porine hier als 'Argininleiter' bezeichnet werden kann. Ob mit dieser Argininleiter die strukturelle Basis für den hier postulierten Transport von negativ geladenen Substraten wie organischen Säuren aufgebaut wird, bleibt experimentell noch zu klären. Vorstellbar ist jedoch, dass ein negativ geladenes Substrat die Pore erreicht und über die Leiter der positiven Argininen entlang durch das Porin gleitet. Ein ähnliches Muster der Verteilung von AS-Resten wird auch in ScrY beobachtet, das durch eine vektorielle Anordnung von aromatischen AS eine 'Rutsche' für Zucker enthält.

### Die Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstelle

Innerhalb der  $\beta$ -Unterabteilung ist das Motiv der Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstelle nicht konserviert. Hingegen zeigt sich eine starke Konservierung der Ligandenumgebung zwischen Omp32 und dem Porin aus *E. vacuolata*. Die Seitenketten von Asp64 und Asn136 sowie Glu158 (im Porin aus *E. vacuolata* durch ein Asp ersetzt) in Omp32 sind alle konserviert. Da an der Bindung von Ca<sup>2+</sup> auch zwei Carbonylgruppen der

Hauptkette beteiligt sind, ist deren Bindung nicht von der Seitenkette abhängig und deshalb in der Sequenz austauschbar. Ionenbindungsstellen können in Proteinen, wie oben schon kurz erwähnt, zu einer erheblichen Stabilisierung beitragen und wurden für das Porin aus *R. capsulatus*, für ScrY und MalY beschrieben [Weiss *et al.*, 1991; Schirmer *et al.*, 1997; Forst *et al.*, 1998]. Dabei lassen sich strukturell verschiedene Bindungsplätze unterscheiden. Bindungsstellen, die auf der Trimerachse oder nahe den Monomer-Monomer Kontaktflächen sind, werden zu einer erhöhten Stabilität der Trimere beitragen. Bindungsstellen, die sich in der Pore oder in den Loopbereichen befinden, werden hingegen eher Stabilitätsbeitrag innerhalb eines Porinmonomers liefern oder vielmehr das elektrostatische Potential der Pore und damit die Ligandenbindung oder Diffusion verändern. Im Fall von ScrY und MalY befinden sich die Bindungsstellen für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen direkt auf der Trimerachse des Porins, während die Bindungsstelle im Porin aus *R. capsulatus* sowohl an den Monomerkontakten lokalisiert ist als auch direkt in der Pore.

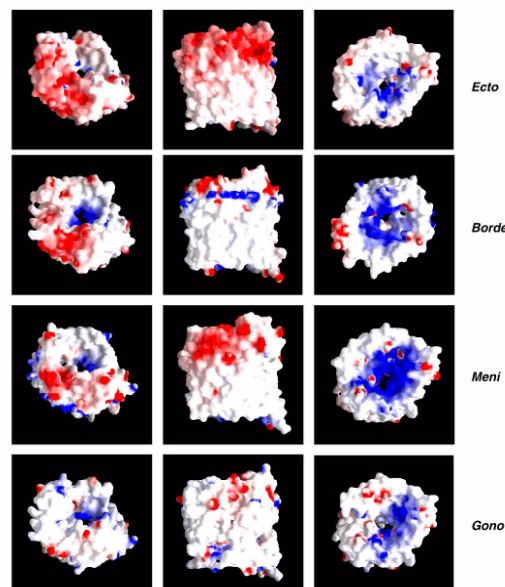
In Omp32 befindet sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle an der Monomer-Monomer-Kontaktstelle und so an einer Position, die nach Überlagerung der Struktur mit dem Porin aus *R. capsulatus* nur etwa 3 Å von dessen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle entfernt ist. Experimente die zeigen, dass die Stabilität von Omp32 und dem Porin aus *E. vacuolata* nach Zugabe von EDTA geringer ist, deuten tatsächlich auf den stabilisierenden Einfluss der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen hin [Gerbl-Rieger *et al.*, 1992; Wolf *et al.*, 1996]. Die Geometrie im Fall der Ca(III)-Bindungsstelle des Porins aus *R. capsulatus* ist heptagonal, wobei ein Aspartat mit seiner Carboxylatgruppe als zweizähliger Ligand gewertet wird und ein Wassermolekül eine freie Position einnimmt. Ein Vergleich der Konformation, die der in Omp32 vorgefunden sehr ähnlich ist zeigt folgender Vergleich der beiden Koordinationssphären in Tab. 12:

Koordinationsstelle	2POR	Omp32
1	Asp136 OD1	Glu158 OE1
2	Asp136 OD2	Glu158 OE2
3	H2O	H2O
4	Asn116 OD1	Asn136 OD1
5	Lys138 O	Leu29 O
6	Gly 140 O	Gly309 O
7	Asn20' OD1	Asp64 OD1

**Tab. 12:** Vergleich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Koordinationsstelle von dem Porin aus *R. capsulatus* und Omp32

#### 4.1.2 *Molecular modelling* von Porinen

Porine der Spezies *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* besitzen durch ihre Beteiligung als antigene Determinanten der Immunantwort des menschlichen Körpers nach Bakterieninfektion eine wichtige Bedeutung. Ausgehend von einem atomaren Modell dieser Porine könnten die strukturellen Grundlagen für die Antikörpererkennung vorhergesagt werden. Da bislang von diesen Porinen noch keine Strukturen bei hoher Auflösung vorliegen, bietet es sich an, Modelle von diesen Proteinen durch paarweise Sequenzalignierung mit Omp32 und anderen Porinen und anschließendem *molecular modelling* unter Verwendung der Koordinaten zu erstellen. Die Sequenzidentität zu den interessierenden Porinen ist dabei mit etwa 25% zwar relativ niedrig, die Ähnlichkeit mit etwa 70% aber immerhin so hoch, dass sich große Teile der Porine unter Verwendung der Omp32-Koordinaten mit guter Zuverlässigkeit modellieren lassen sollten. Die größten Unsicherheiten in diesen Modellen bleiben am Ende naturgemäß in den Bereichen der heterogenen Loops. Da für die Vorhersage antigener Strukturen jedoch nicht der genaue Verlauf sondern vielmehr die exponierten Strukturen an sich eine Rolle spielen, lassen sich diese zufriedenstellend postulieren und Peptide mit einer potentiellen vakkzinischen Wirkung konstruieren.



**Abb. 58:** GRASP-Oberflächendarstellung der durch *homology modelling* erzielten Porin-Strukturmodelle von *E. vacuolata* (*Ecto*), *B. pertussis* (*Borde*), *N. meningitidis* (*Neis*) und *N. gonorrhoeae* (*Gono*). In der linken Spalte ist die extrazelluläre Aufsicht, in der mittleren die Seitenansicht und in der rechten die periplasmatische Ansicht gezeigt.

In Abb. 58 ist die Potentialoberfläche von vier strukturell unbekanntem Porine aus *E. vacuolata*, *B. pertussis*, *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* abgebildet, deren Koordinaten über *molecular modelling* erstellt wurden.

In diesem Vergleich der Potentialoberflächen zeigt das Porin aus *E. vacuolata* eine stark negativ geladene extraplasmatische Proteinoberfläche. Dabei ist nicht nur die Oberfläche um den Poreneingang mit negativen Ladungen besetzt, sondern auch die Membran-zugewandte Oberfläche. Dies wird letztlich auch durch die Gesamtladung von -17 für den modellierbaren Teil des Proteins widerspiegelt. Die periplasmatische Oberfläche des Porins zeigt dagegen eine überwiegende Anzahl von positiven Ladungen und ein - ähnlich Omp32 - insgesamt positives Oberflächenpotential. Da für dieses Porin eine starke Anionenselektivität gemessen wurde, legt das Modell nahe, dass hier der größte Beitrag des Selektivitätsfilters aus der periplasmatischen Oberfläche resultiert.

Die drei Porine der  $\beta$ -Untereinheit zeigen eine ins extraplasmatische Medium gerichtete negativ geladene Oberfläche im Bereich des äußeren Porenrandes. In Nähe der Engstelle weisen sie jedoch ein stark positives Feld auf. In der Seitenansicht erkennt man desweiteren sehr deutlich, dass das Porin aus *B. pertussis* auf der Höhe der LPS-Lipidkopfgruppen ebenso wie Omp32 einen Lysingürtel aufweist. Das Porin aus *N. meningitidis* zeigt hingegen in der Seitenansicht keinen Lysingürtel, sondern eine stark negativ polarisierte Oberfläche, ähnlich dem Porins aus *E. vacuolata*. Das Porin aus *N. gonorrhoeae* weist in diesem Bereich nahezu keine Ladungen auf. Die Sicht auf die periplasmatische Seite der drei Porine spiegelt das auch in Omp32 ausgeprägte positive Potential wieder. Dieses verdeutlicht sich besonders stark in den Porinen aus *N. meningitidis* und *B. pertussis*, ist aber auch noch im Porin aus *N. gonorrhoeae* erkennbar.

Ein Vergleich der Gesamtladung der Proteinmodelle stellt die starke Ansammlung positiver Ladungen für das Porin aus *C. acidovorans* heraus. Eine ähnliche Nettoladung zeigt nur das Porinmodell von *N. gonorrhoeae*.

Porin	Gesamtladung
<i>C. acidovorans</i> -Porin	+4
<i>E. vacuolata</i> -Porin	-17
<i>B. pertussis</i> -Porin	0
<i>N. meningitidis</i> -Porin	-2
<i>N. gonorrhoeae</i> -Porin	+3

**Tab. 10:** Vergleich der Gesamtladung von Omp32 mit den Porinmodellen der  $\beta$ -Unterabteilung.

Im Zusammenhang mit der Protein-Nettoladung, die einen der Parameter für die Selektivität darstellen könnte, lohnt sich ein Vergleich zwischen Omp32 und Porinen, die in Leitfähigkeitsmessungen eine ausgeprägte Anionenselektivität zeigen. Unten aufgeführte Auswahl an Porinen phylogenetisch verschiedener Untergruppen zeigt das Verhältnis von negativen (Glu und Asp) zu positiven Ladungen (Lys und Arg). Der Vergleich weist Omp32 als einziges der Anionen-selektiven bakteriellen Porine mit einem Überschuss an positiven AS aus.

<b>Porin</b>	<b>Gesamtladung</b>
<b>P24305 (Omp32 aus <i>C. acidovorans</i>)</b>	<b>28/31 = +3</b>
<b>O05107 (Porin aus <i>E. vacuolata</i>)</b>	<b>42/21 = -21</b>
<b>P05695 (OprP aus <i>P. aeruginosa</i>)</b>	<b>57/48 = -9</b>
<b>P21420 (NmpC aus <i>E. coli</i>)</b>	<b>47/32 = -15</b>
<b>P21796 (HVDAC1 aus <i>H. sapiens</i>)</b>	<b>29/32 = +3</b>

**Tab. 11:** Vergleich ausgewählter Anionen-selektiver Porine und ihrer Nettoladung ( $\sum \text{Arg} + \text{Lys} - \sum \text{Asp} + \text{Glu} = \text{Nettoladung}$ ).

Somit ist die Nettoladung des Proteins kein zuverlässiger Indikator für die Ausprägung der Ionenselektivität. Andererseits weist dieser Vergleich darauf hin, dass der Umgestaltung der Porenengstelle, des Ionenfilters, funktionell eine große Bedeutung zukommt.

## 4.2 Diskussion zu VDAC

### 4.2.1 Sequenzanalyse von HVDAC1 und HVDAC2

Im humanen Genom sind zwei Isoformen des *voltage-dependent anion channel*, bekannt (HVDAC1, HVDAC2). Eine Suche in Datenbanken nach VDAC-verwandten Proteinen führt in Wirbeltieren wie z.B. der Maus zu vier in ihrer Sequenz sehr ähnliche Isoformen (MVDAC1 - MVDAC4). Diese stellen Gene mit großer Ähnlichkeit zu beiden humanen Isoformen dar, weisen jedoch alle eine Länge von 280 bis 300 AS auf und sind deshalb eher mit HVDAC1 vergleichbar. Auch in einigen Pflanzen wie Mais und Tomate finden sich VDAC-Vertreter, die auf Grund ihrer Sequenzlänge eher Ähnlichkeit zu HVDAC1 als zu HVDAC2 zeigen.

Ein paarweises Sequenzalignment der beiden humanen Isoformen ergibt eine hohe I/A von 73/93% für die Alignierung der 270 AS des Kernbereichs. HVDAC2 weist mit 347 AS 65 zusätzliche AS auf, die zu gleichen Teilen den Bereich N- und C-terminaler Extensionen bilden und zwei weitere  $\alpha$ -helikale Domänen ausbilden. HVDAC2 ist bislang der einzige Vertreter der mitochondrialen Porine in der Datenbank mit diesen beiden Extensionen. Ob die Extensionen funktionell eine Rolle spielen oder gar eine Gewebe-spezifische Komponente darstellen, ist bisher nicht bekannt. Bemühungen, die Expression dieser zweiten Isoform in humanen Zellen nachzuweisen, waren bislang nicht erfolgreich [Thinnes, persönliche Mitteilung].

Auch in den Mitochondrien der Hefen *Neurospora crassa* und in *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) finden sich HVDAC1-verwandte Porine. Wie das Alignment in Abb. 28 zeigt, gibt es, ähnlich den bakteriellen Porinen, auch hier nur wenige konservierte Sequenzbereiche, die auch mit dem bisherigen Wissen über die VDAC-Topologie, keine genauen Aussagen über strukturell konservierte Motive liefern können. Allerdings scheinen auch hier die integralen Membranbereiche stärker konserviert zu sein. Im Unterschied zu den bakteriellen Porinen endet die Sequenz der mitochondrialen Porine nicht mehr mit einem konservierten Phenylalanin.

### 4.2.2 Expression und Rückfaltung

Eukaryonte Membranproteine ohne Signalsequenz werden von Bakterienzellen hauptsächlich in Form von unlöslichen *inclusion bodies* produziert. Nur zwei mitochondriale Proteine der äußeren Membran wurden bisher erfolgreich in Bakterien

exprimiert und rückgefaltet. Dies sind der Translokationskomplex *TOM* aus *N. crassa* [Hill *et al.*, 1998] sowie *VDAC* aus *N. crassa* und *S. cerevisiae* [Koppel *et al.*, 1998]. Daneben gelang jedoch schon die Rückfaltung mehrerer Transporter aus der inneren mitochondrialen Membran.

Der Nachteil von *inclusion bodies* besteht vor allem darin, dass das gebildete Protein noch nicht in seiner nativen Form vorliegt. Des Weiteren werden in Bakterienzellen nur wenige post-translationalen Modifikationen eukaryonter Proteine angebracht, was deren Struktur und Funktion stark beeinflussen kann. Für *HVDAC1* kann hier die in den natürlichen Proteinen vorkommende N-terminale Acetylierung erwähnt werden, die unter Umständen die Bindung an cytoplasmatische Kinasen beeinflussen können [Dolder, persönliche Mitteilung].

Der Vorteil der Herstellung von *inclusion bodies* hingegen besteht darin, dass nach Induktion der Expression das gewünschte Protein, in vergleichbar riesigen Mengen von bis zu 50% des Gesamtzellproteins anfällt. Zudem vereinfacht die Unlöslichkeit der *inclusion bodies* die Proteinreinigung dahin gehend, dass lösliche und Membran-gebundene Proteine relativ einfach abgetrennt werden können und dadurch das exprimierte Protein oft schon vor den eigentlichen Rückfaltungs- und den Chromatographieschritten in einer Reinheit von mehr als 95% vorliegt. Auch lässt sich auf diese Weise das in vielen Fällen bei der Kristallisation störende LPS durch Expression des Proteins in unlöslicher Form abtrennen. Das Verfahren der Rückfaltung aus *inclusion bodies* hat sich vor allem für  $\beta$ -Barrelproteine bewährt, da diese im Gegensatz zu vielen löslichen Proteinen und  $\alpha$ -helicalen Membranproteinen relativ verlässlich ihre native Struktur einnehmen.

Die Rückfaltung einer großen Zahl von bakteriellen Proteinen der äußeren Membran und deren korrekte Assemblierung in Monomere und Homooligomere wurde in der Literatur beschrieben [Buchanan, 1999]. Dabei scheint für die korrekte Faltung das früher als essentiell betrachtete bakterielle LPS der Membran keine Rolle zu spielen. Unter den rückgefalteten Proteinen befinden sich monomere Proteine wie *FepA*, ein Eisenrezeptor aus *E. coli* und *OmpA*, ein integrales Protein der AM von *E. coli*. Ein dimeres Enzym, die Phospholipase *OMPLA* aus *E. coli* konnte sogar nach Überexpression und Rückfaltung kristallisiert werden. Homotrimere bakterielle Porine wie *OmpF* aus *E. coli* und das *Porin* aus *R. blastica* lassen sich selbst in Detergentien wie SDS in ihre native Gestalt bringen [Eisele & Rosenbusch, 1990].

Das Prinzip der Rückfaltung beruht auf der Löslichkeit der Proteine in hochmolaren GuaHCl- oder Harnstofflösungen und der Faltung in ihre native Form durch schnelle Verdünnung in Detergenspuffern oder langsame Verdünnung durch Dialyse oder Säulenchromatografie. Die erfolgreiche Expression und Rückfaltung sowie Kristallisation in 2 und 3 Dimensionen zeigen die Beispiele des HVDAC1 (2D-Kristalle) und die Röntgenstrukturen des rückgefalteten Porins aus *R. blastica* [Dolder *et al.*, 1999, Schmid *et al.*, 1996]. Ein Vergleich der Röntgenstrukturen des nativen und rückgefalteten Porins aus *R. blastica* zeigt sehr eindrucksvoll, dass die Variabilität der Proteingeometrie vernachlässigbar gering ist.

Die mitochondrialen Porine HVDAC1 und HVDAC2 lassen sich auf ähnliche Weise wie ihre bakteriellen Strukturanaloga in eine stabile Form falten. Allerdings zeigen sie nach ihrer Faltung eine notorische Tendenz zur Aggregation und Präzipitation und können deshalb, wie auch andere eukaryote Membranproteine, nur durch einige wenige nicht-ionische Detergentien wie DDM, DEM und C8E4 über längere Zeit stabil in Lösung gehalten werden. Beide Porine werden nach schneller Verdünnung in Detergenspuffer in den Detergentien DDM und LDAO mit für Membranproteine sehr guter Ausbeute (> 50%) gefaltet. Für eine hohe Ausbeute mussten Detergentskonzentrationen weit über ihrer *cmc* verwendet werden (> 1%). Dieser Effekt wurde schon für andere Membranproteine in der Literatur diskutiert [Buchanan, 1999]. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass zu faltende Protein in Lösung sich nur dann schnell falten kann, wenn die Zahl an amphipatischen Micellen hoch ist und dadurch die Wahrscheinlichkeit auf andere nicht gefaltete Proteine zu treffen minimiert wird.

Die Rückfaltung der Porine aus *N. crassa* und *S.* wurde nach Proteinfusion mit Maltosebindeprotein, einem löslichen Protein, durchgeführt. Die so gewonnenen *inclusion bodies* konnten nach Zugabe von Detergens (LDAO) und Dialyse in ihre native Form überführt werden. Im Gegensatz zu den Hefe-Isoformen, deren Stabilität nur in einer Lösung von 0,5% LDAO gewährleistet ist, zeigen die beiden humanen Isoformen auch eine hohe Stabilität (> 4 Wochen) in den nicht-ionischen Detergentien C8E4 (1,2%), C8E5 (1%) und DDM (0,5 - 1%) und eine geringere Stabilität in LDAO (0,5 %). Ein weiterer Unterschied von humanem VDAC zu NCVDAC und SCVDAC zeigt sich auch darin, dass beide humanen Proteine in Lösungen mit einer Konzentration von mehr als 20 mg/ml stabil verbleiben, solange die Detergentskonzentration weit über der *cmc* liegt und nicht-ionische Detergentien



verwendet werden. Die humanen Porine sind mit den beschriebenen hohen Ausbeuten nach Rückfaltung aussichtsreiche Kandidaten für die weitere Analyse über 2D- und 3D-Kristallisation sowie für weitere biochemische Experimente.

Aus dem in Tab. 8 beschriebenen Vergleich zwischen den für die Faltung eingesetzten Detergentien und der Ausbeute an gefaltetem Protein, geht eine Korrelation zwischen der Länge der Alkylkette des Detergens und der Rückfaltungsausbeute hervor. Die Ausbeute (bestimmt durch die Menge an löslichen Protein) ist vor allem dann höher (ca. 80 - 90%), wenn Detergentien mit C10- und (DEM) und C12-Alkylketten (DDM und LDAO) eingesetzt werden, während die Ausbeuten für Vertreter der C8-Alkylderivate ( $\beta$ -OG, C8E4 und C8E5) signifikant schlechter waren (10 - 30%). Eine ähnliche Abhängigkeit wurde auch für die Rückfaltungsstudien mit OmpF aus *E. coli* beschrieben und wird hierdurch nochmals bestätigt [Eisele & Rosenbusch, 1990]. Mit der sich verlängernden Alkylkettenlänge geht vermutlich auch ein größerer Micellendurchmesser einher, der eher dem einer biologischen Membran mit 30 Å Durchmesser entspricht. Mit der Kettenlänge verbunden ist auch ein größerer hydrophober Kern der Micelle, der für die korrekte Insertion und Ausbildung der Faltblattstrukturen essentiell sein könnte. Inwieweit die Kopfgruppe der Detergentien eine Rolle spielt, ist nicht klar. Allerdings scheinen zwitterionische Detergentien und Detergentien mit maltosidischen Kopfgruppen für die Faltung und Stabilität günstiger zu sein als Glucosyl- oder Ethylenglykol-Derivat-Gruppen.

Eine Zusammenstellung der Bedingungen für erfolgreich rückgefalteten  $\beta$ -Barrelproteine verweist auf die erfolgreiche Verwendung mehrerer Detergentien. Unter ihnen finden sich SDS, LDAO, o-POE, Triton X-100 und SB3-14 [Buchanan, 1999]. Die Rückfaltung von Proteinen durch LDAO und SDS bzw. Mischungen von nicht-ionischen Detergentien mit SDS könnten ein Indiz dafür sein, dass deren geladene Kopfgruppen und Ladungsstruktur LPS-ähnliche Eigenschaften aufweisen und deshalb die Faltungsausbeute verbessern.

#### **4.2.3 Oligomerisation und Sekundärstrukturanalyse**

Der Unterschied im Laufverhalten denaturierter und nativer Proben von HVDAC1 ist gering und entspricht dem Gelshift von 3 - 4 kD, ein Verhalten, das schon von OmpA-Proben her bekannt ist [Koppel *et al.*, 1998]. Auch Proben aus *N. crassa* bestätigen in SDS-Gelen dieses Laufverhalten und zeigen weder Dimer- noch Oligomerbildung

[Shao *et al.*, 1996]. Bakterielle Porine, mit wenigen Ausnahmen wie z.B. die des Cyclodextrin-spezifischen Porins CymA, zeigen unter den gewählten Bedingungen üblicherweise zwei oder drei Banden, die das monomere, dimere und trimere Porin repräsentieren und bei dem zwei- bis dreifachen Molekulargewicht im Gel zu finden sind. Als ergänzendes Indiz für einen monomeren Kanal mag auch die Bildung von stabilen  $\alpha\beta$ -Komplexen aus Ratten-ANT und mitochondrialem Porin gelten [Bühler *et al.*, 1998].

Dynamische Lichtstreuung kann im Fall von Membranproteinen die Unterscheidung zwischen monomeren und oligomeren Komplexen ermöglichen und zur ungefähren Bestimmung der Proteinmasse beitragen. Im Fall von Membranproteinen, deren Radius bzw. Masse durch eine nicht bekannte Anzahl von Detergensmolekülen vergrößert wird, fällt die Massenbestimmung und Unterscheidung des Oligomerisationsgrades jedoch schwerer als bei löslichen Proteinen. Hinzu kommt, dass die  $\beta$ -Barrelform sehr weit von der idealen globulären Proteinform abweicht, die für die Messung vorausgesetzt wird. Das Molekulargewicht von HVDAC1 in  $\beta$ -OG- oder C8E4-Micellen wurde mit etwa 65 kD bestimmt, was eher für ein Proteinmonomer (MW  $\sim$  35 kD) spricht. Die Differenz von etwa 30 kD zur monomeren Proteinmasse entspricht einer Anzahl von etwa 40 - 60 Detergensmolekülen. Diese Zahl steht in guter Übereinstimmung mit Messungen an Protein-Detergensmicellen von Omp32 und OmpF, deren Masse in Lösung mit 120 - 130 kD bestimmt wurde. Dies entspricht ebenfalls einer Massendifferenz von 20 - 30 kD.

Die korrekte Faltung eines reinen Strukturproteins kann am einfachsten und mit relativ hoher Genauigkeit über seine Sekundärstrukturanteile bestimmt werden. Dafür bieten sich im Prinzip zwei Methoden an, die FTIR- und CD-Spektroskopie. Da sich zur Bestimmung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen FTIR-Spektroskopie besser eignet, wurden die entsprechenden Spektren für die humanen Porine mit FTIR-ATR von hydratisierten und deuterierten Proben aufgenommen und der Anteil an  $\beta$ -Faltblatt bestimmt. Dieser liegt mit ca. 50% für HVDAC1 und 42% für HVDAC2 erheblich höher als für die beiden rekombinanten aus Porine NCVDAC und SCVDAC, deren Anteil nach CD-Messungen zwischen 30 und 45% liegt [Shao *et al.*, 1996]. FTIR-Messungen an VDAC-Proben aus *N. crassa* zeigen einen Gehalt von 48%  $\beta$ -Faltblatt und stimmen dadurch relativ gut mit diesen überein [H. Engelhardt, persönliche Mitteilung]. Im Vergleich zu humanem VDAC zeigen bakterielle Porine in FTIR-

Spektren einen noch höheren Anteil an  $\beta$ -Faltblatt von 55 - 65% [Gerbl-Rieger *et al.*, 1992]. Der Anteil an  $\alpha$ -Helix ist bei mitochondrialen Porinen höher als für bakterielle und lässt sich auf 10 - 15% quantifizieren. Da für den N-Terminus in HVDAC1 und für N- und C-Terminus in HVDAC2 eine  $\alpha$ -helicale Struktur vorhergesagt wird, ist der höhere Anteil in den Spektren erklärbar. Vergleicht man die gemessenen Werte der Sekundärstrukturen mit den anhand der AS-Sequenz vorhergesagten 40 - 45% für  $\beta$ -Faltblatt, so ist die Übereinstimmung und Vorhersage für integrale Membranproteine ungewöhnlich gut. Nimmt man an, dass die Länge eines durchschnittlichen  $\beta$ -Faltblatts 9 - 10 AS beträgt und 16  $\beta$ -Strängen vorliegen, so deckt sich der berechnete Wert von 50 - 55% sehr gut mit dem experimentell ermittelten.

Neben der beschriebenen Bestimmung der Sekundärstruktur und damit auch der Faltung können letztlich nur Enzym- bzw. Bindungstests weitere Beweise für die korrekte Assemblierung oder Faltung des untersuchten Proteins liefern.

Auf Grund der Sequenz für HVDAC1 wird eine ATP-Bindungsstelle postuliert und HVDAC1 isoliert aus B-Lymphozyten kann diese über die Bindung an ATP-Agarose gezeigt werden. Auch für das rekombinante Protein lässt sich die Bindung an ATP-Agarose zeigen und damit ein weiteres Indiz für eine Funktion als ATP-bindenden Kanal erhärten. Weitere Indizien für diesen ATP-Transport liefern *in vitro*-Daten an Mitochondrien, die zeigen, dass Hexokinase und Glycerinkinase durch Bindung an VDAC in ihrer Funktion stimuliert werden. Die Bindung dieser Kinasen konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, allerdings legen die Bindungsexperimente mit Ratten-ANT und humaner Kreatinkinase nahe, dass eine Bindung an weitere Enzyme möglich ist und die korrekte Faltung des Proteins als sehr wahrscheinlich angenommen werden kann [Dieter Brdiczka, persönliche Mitteilung].

#### **4.2.4 Elektronenmikroskopische Analyse von HVDAC1**

Ausgehend von einer Lösung von Protein-Detergensmicellen und Lipid in einem stöchiometrischen Verhältnis von 0,5 wurden 2D-Kristalle von HVDAC1 durch Dialysetechnik hergestellt und im Elektronenmikroskop charakterisiert. Die untersuchten Kristalle zeigen jedoch trotz vielfältiger Variation der Dialyseparameter immer eine Mehrschichtigkeit. Trotzdem zeichnen sich die Kristalle durch eine sehr gute laterale Ordnung aus, die sich aus einer einfachen Fourier-Transformation ergibt. Da multilamellare Kristalle mit mehr als zwei Schichten für Bildanalysen nur

schwer zu handhaben sind, kann der Proteinkontrast nur mit großer Unsicherheit zugeordnet werden.

Die Packung innerhalb einer Proteinschicht ist mit einem mittleren Abstand der Monomere von nur 5 Å sehr eng und weist auf starke intermolekulare Wechselwirkungen zwischen benachbarten Porinmolekülen hin. Der Abstand zwischen den Proteinen bzw. deren Einheitszelleinhalt entspricht jedoch sehr gut dem nach Phospholipase-A2-Abbau von mitochondrialen Membranen aus *N. crassa* bestimmten [Manella, 1998]. Im Gegensatz zu sechs Porinmonomeren in der Einheitszelle dieser Kristalle, von denen jeweils drei durch eine Pseudo-120°-Rotationssymmetrie ineinander überführt werden können, finden sich im Falle von HVDAC1 nur jeweils zwei Monomere pro Einheitszelle.

In Bildern von rotationsbedampften 2D-Kristallen erkennt man, dass jeder Poreninnenraum von Proteindomänen variabler Höhe umgeben ist. Im Gegensatz hierzu zeigen die Phospholipase behandelten und rotationsbedampften Kristalle aus natürlichen Membranen von *N. crassa* keine größeren Extensionen über die Kristallebene hinaus, was entweder auf deren unterschiedliche Topologie rückschließen lässt oder aber einer Orientierung des 2D-Kristalls entspricht, in der alle Proteine mit der Seite der kurzen Turn der Beschattungsseite zugewandt sind [Dolder *et al.*, 1999]. Aus diesen Aufnahmen geht hervor, dass der Einbau der Monomere in den 2D-Kristall tatsächlich antiparallel vonstatten geht. Durch die Abfolge von korrigierter Pore und einer Pore mit geringerer Oberflächerrauigkeit kann die 180 Grad Symmetrie zweier Poren, mit der diese ineinander überführt werden können nachgewiesen werden. Damit zeigen diese Kristalle ein Packungsverhalten, das dem des bakteriellen Porins P100 aus *T. thermophilus* sehr ähnlich ist (siehe Abschnitt 3.3), der natürlichen parallelen Einbaurichtung von VDAC in Membranen jedoch widerspricht. Nimmt man eine leicht konkave Form der Proteine an, so wird verständlich, dass deren dichteste Packung in zwei Dimensionen einfacher in ihrer antiparallelen Anordnung zu verwirklichen ist. Zudem besitzen viele bakterielle Porine eine extraplasmatisch hoch geladene Oberfläche, die bei einem parallelen Einbau in die Membran eine stark abstoßende Wechselwirkungen mit ihren nächsten Nachbarn zeigen sollte.

Für die Topologie bzw. Sekundärstruktur von VDAC existieren verschiedene auf experimentellen Daten und über Homologiestudien entwickelte, sich aber in der Anzahl der  $\beta$ -Stränge widersprechende Modelle, die für die Pore 12, 16 und 19

Strängen vorhersagen [Thinnes & Reymann, 1997; Song *et al.*, 1998]. Aus den oben erwähnten Oberflächenrekonstruktionen ergibt sich ein Innendurchmesser des Porins mit 17 - 20 Å. Dieser ist in guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten aus Leitfähigkeitsmessungen an planaren Membranen für ncVDAC. Danach wurde der mittlere Durchmesser des Kanals mit 37 Å bestimmt und ist somit eher kompatibel mit einem Modell aus 14 oder 16 Strängen unter der Annahme, dass der Neigungswinkel einiger  $\beta$ -Stränge mehr als 35 Grad beträgt. Ein Vergleich mit den 16-strängigen bakteriellen Porinen und deren Barreldurchmesser von etwa 30 Å, bzw. der membranständigen Phospholipase A mit 22 x 32 Å, deutet eher auf ein Modell von 16 Strängen hin. Ein solches Modell, von Thinnes für HVDAC1 entworfen, basiert auf Antikörperstudien und Amphipatieanalyse und postuliert eine Pore mit 16  $\beta$ -Strängen.

#### **4.2.5 Peptide-mapping-Analyse**

Durch eine Kombination aus proteolytischer Spaltung von HVDAC1 und Massenanalyse der entstandenen Fragmente über MALDI-MS wurde erstmals experimentell die Topologie des mitochondrialen Porins bestimmt. Aus diesen Daten und den Sekundärstrukturvorhersagen mittels Gibbs-Sampler und PhD-Programm [<http://www.embl-heidelberg.de/Services/index.html>] kann die Lage der amphipatischen  $\beta$ -Stränge innerhalb der Sequenz relativ genau angegeben werden. Nimmt man die bakteriellen Porine als Modellstrukturen, so erkennt man, dass in den langen extraplasmatischen Loops in den meisten Fällen eine oder mehrere zugängliche Proteaseschnittstellen lokalisiert sind. Dies bedeutet, dass Bereiche, in denen nach Proteolyse durch vier Proteasen mehrere Spaltstellen gefunden werden, den Loop-Bereichen entsprechen, während dazwischen liegende Sequenzabschnitte den amphipatischen  $\beta$ -Strängen zugeordnet werden können. Nimmt man zu den Proteaseschnittstellen die Amphipatiekriterien hinzu, so ergeben sich 16  $\beta$ -Stränge, die durch acht Loops verschiedener Länge und 7 kurze Turns verbunden werden. Diese Annahme würde sich auch mit einem bakteriellen Porinmodell von 16 Strängen sehr gut decken und die Vermutung der evolutionären Verwandtschaft erhärten. Für den N-terminalen Bereich des Proteins wird durch das PhD-Programm eine  $\alpha$ -Helix von etwa 20 AS Länge vorhergesagt, die auch proteolytisch zugänglich ist. Analog zu den bakteriellen Porinen findet sich in dem postulierten Modell der längste Loop (mit

etwa 24 AS) zwischen den  $\beta$ -Strängen 5 und 6, und zeigt eine kürzere Abmessung als bei den bakteriellen Porinen. Dass L3 in HVDAC1 topologisch dem bakteriellen Modell nicht entspricht, zeigt dessen Exposition und Proteolyse, die auf eine gute Zugänglichkeit von L3 rückschließen lässt. Entsprechend der kleineren Anzahl von 282 AS, von denen die ersten ca. 20 die N-terminale  $\alpha$ -helix bilden, ergibt sich ein Anteil von etwa 260 das  $\beta$ -Barrel ausbildende AS. Daraus folgt, dass die Loops in ihrer Länge insgesamt kürzer sein müssen, da für die  $\beta$ -Stränge und den Membrandurchgang eine minimale Länge von etwa 10 AS notwendig ist.

Verglichen mit den weiteren VDAC-Modellen, denen fast allen die Hefe-Homologen aus *N. crassa* zugrunde liegen, zeigt das Modell des humanen Porins HVDAC1 einige Unterschiede. Ein direkter Vergleich mit dem von Colombini *et al.* postulierten 12-strängigen Modell Porin scheitert daran, dass dieses Modell an einigen Stellen der Vorhersage nicht nur das Prinzip der Amphipathie verletzt, sondern auch auf sehr schwach untermauerten experimentellen Indizien beruht [Zizi *et al.*, 1998]. Zudem postuliert dieses Modell lange Loopbereiche auf beiden Membranseiten, während das hier beschriebene Modell auch aufgrund der in FTIR-Spektren beobachteten Schwingungsbanden für Turnbereiche, diese nur auf der einen Seite (vermutlich der mitochondrialen Matrix zugewandten Seite) zulässt. Hingegen zeigt ein Vergleich mit dem von Thinnes *et al* entwickelten Modell des HVDAC1 einige Übereinstimmungen was Anzahl der  $\beta$ -Stränge, deren Länge und teilweise auch deren Lage betrifft. Dieses Modell basiert auf Antikörperstudien und wurde unter Zuhilfenahme des Amphipathieprinzips erstellt und kann experimentell deshalb nur für Bereiche als wirklich gesichert gelten.

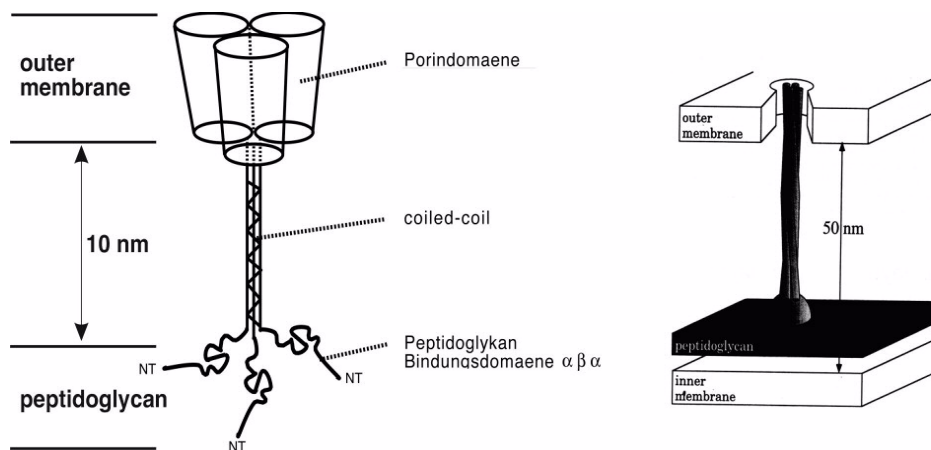
## 4.3 Diskussion zu P100

### 4.3.1 Homologiebetrachtungen

Porin P100 wurde in der Literatur auf Grund seiner schon in Membranen vorliegender 2D-kristallinen Form als bakterieller *surface layer* der äußeren Membran beschrieben [Caston *et al.*, 1993]. In dieser Arbeit wird jedoch gezeigt, dass es sich bei P100 um ein integrales Membranprotein handelt, wie bereits postuliert. [Engelhardt & Peters, 1998].

Das Protein P100 aus *Thermus thermophilus* zeigt in Sequenzanalysen und Mutationsstudien einen modularen Aufbau aus drei Domänen mit unterschiedlicher Funktionalität [Caston *et al.*, 1996]. Die kleine N-terminale SLH-Domäne ermöglicht dem bei etwa 70°C wachsenden Organismus die Bindung und Verankerung des Proteins an das Peptidoglykangerüst, das im Periplasma lokalisiert ist. Der Mechanismus der Bindung erinnert dabei an das Brown'sche Lipoprotein aus *E. coli*, ein Protein das eine Peptidoglykan-Bindungsdomäne besitzt und über ein Lipid in der äußeren Membran verankert ist. Der N-terminalen Domäne folgt eine aus drei langen  $\alpha$ -Helices aufgebaute dreifache *Coiled-coil*-Domäne, die als molekularer Abstandshalter der Länge von etwa 9 nm interpretiert werden kann, bevor das gesamte Protein durch die lange Porindomäne in die äußere Membran eingebaut und fixiert wird. Funktionell dient die große Porindomäne der Aufnahme von Nährstoffen aus dem externen Medium, wobei es sich um ein spezifisches oder unspezifisches Porin handeln könnte.

Ähnliche SLH-Domänen werden in nahezu allen Gram-negativen Bakterien gefunden. Die höchste Ähnlichkeit der Domäne von P100 besteht zur N-terminalen Domäne aus  $Omp\alpha$  aus *Thermotoga maritima*. Dieses ebenso aus drei Domänen aufgebaute Protein verankert die äußere Membran durch Insertion einer  $\alpha$ -Helix über eine an das Peptidoglykangerüst bindende Domäne. Dabei bildet eine *tetra-coiled-coil*-Struktur die etwa 40 nm lange *spacer*-Struktur zwischen Peptidoglykan und äußerer Membran [Engel *et al.*, 1992]. Neben  $Omp\alpha$  wurde in der Äußeren Membran von *T. maritima* ein Porin  $Omp\beta$  identifiziert, das, ähnlich wie das Porin aus *T. thermophilus*, in einer fast 2D-kristallinen Packung in der Äußeren Membran vorliegt.



**Abb. 59:** Vergleich der modularen Proteine P100 aus *Thermus thermophilus* (links) und *Ompα* aus *Thermotoga maritima* (rechts).

Der Vergleich der Strukturmodelle von P100 und *Ompα* ist in Abb. 60 gezeigt. Die *spacer*-Struktur des *Triple-coiled-coil* wird in P100 von etwa 150 AS gebildet, in *Ompα* hingegen von etwa 300 AS. Die Länge der dadurch gebildeten Struktur variiert jedoch beträchtlich und entsprechend der Anzahl an AS müsste die Domäne von P100 eine Länge von 15 - 20 nm zeigen, während die von *Ompα* eine Länge von 30 - 35 nm aufweisen sollte. Alignierungsversuche der langen *coiled-coil*-Domänen zeigen keine ähnlichen Sequenzen in den Datenbanken.

#### 4.3.2 Sekundärstrukturanalyse

Das FTIR-Spektrum von P100 in Abb. XX zeigt stark ausgeprägte  $\alpha$ -helicale und  $\beta$ -Faltblattanteile und dokumentiert schon dadurch den ungewöhnlichen Charakter dieses Proteins der äußeren Membran. Damit ist das Porin aus *T. thermophilus* eines der ersten, in dessen FTIR-Spektren große Anteile an  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helix auftreten. Das Spektrum eines Porins mit ebenfalls beiden Anteilen ist das des HVDAC2 mit höherem relativen Anteil an  $\beta$ -Faltblatt und geringerem  $\alpha$ -helicalen Anteil (siehe Spektrum in Abb. 45).

Die Verteilung mit etwa 36 %  $\beta$ -Sheet ergibt eine daraus abgeleitete Anzahl von 330 AS, die hauptsächlich in die Bildung des  $\beta$ -Barrel einbezogen sein dürften. Verglichen mit etwa 200 in das  $\beta$ -Barrel einbezogene AS in den unspezifischen Porinen weist diese Anzahl auf ein erheblich vergrößertes Barrel hin, was in gutem Einklang mit dem EM- und AFM-Daten wäre. Aus der Sekundärstrukturvorhersage für P100 werden 210 in amphipatische  $\beta$ -Stränge liegende AS vorhergesagt, eine Zahl die niedriger als die aus den Spektren abgeleitete Anzahl ist. Ein Grund dafür



liegt sicher in der relativ schlechten Vorhersagbarkeit von amphipatischen  $\beta$ -Faltblättern in äußeren Membranproteinen. Vergleicht man dagegen den aus FTIR-Spektren hervorgehenden Anteil von 22%  $\alpha$ -Helix an, so entspricht dieser Wert 202 AS. Addiert man die aus dem Coiled-coil abgeschätzten 185 AS zu den der dritten, der die Pore ausbildenden Domäne, so ergeben sich etwa 250 AS womit hier der experimentelle Wert etwa 25% zu klein ausfällt. Diese Situation kann man jedoch durch die Ungenauigkeit der FTIR-Spektroskopie bei der Bestimmung von  $\alpha$ -helicalen Bereichen in Proteinen erklären. Wie bei Spektren anderer antiparalleler  $\beta$ -Faltblattstrukturen zeigt sich auch in P100-Spektren eine Schulter, die ein Indiz für mehrere Turnbereiche damit für ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt ist.

### **4.3.3 2D-Kristallisation und Ultrastrukturanalyse**

Die 2D-Kristallisation von P100 wurde mittels der Dialysetechnik durchgeführt und führte mit DMPC als Lipid zu 2D-Kristallen von außergewöhnlicher Größe. Die Kristallgröße mit bis zu 15  $\mu\text{m}$  im Durchmesser entspricht damit schon fast der Länge des stäbchenförmigen Bakteriums. Die Kristallqualität und Größe übertrifft die der in natürlichen Membranen vorliegen. Allerdings unterscheiden sich die natürlichen Kristalle von den artifiziellen 2D-Kristallen hinsichtlich ihrer Einbaurichtung. In den natürlichen Kristallen sind die Proteine parallel inkorporiert, während in den 2D-Kristallen eine antiparallele Anordnung vorherrscht. Es werden jedoch unter Kristallisationsbedingungen mit einem sehr geringen Lipid-zu-Proteinverhältnis kleine Kristalle mit parallelem Einbau der Porine beobachtet, die aber eine zu den natürlichen Kristallen unterschiedliche Raumgruppe zeigen. Die Qualität der Kristalle wurde über ihre Powerspektren bestimmt. Die Beugungsmaxima zeigten für negativ kontrastierte Kristalle Reflexe bis zu 15  $\text{\AA}$ , ein Wert, der sehr nahe an das theoretische Maximum von negativ-kontrastierten Kristallen reicht. Die Kristallqualität ist damit so gut, dass weitere Untersuchungen von in Eis oder Glukose eingebetteten Kristallen eine Verbesserung Ordnung und damit der Auflösung versprechen.

Aus der Mittelung der Kristalle lassen sich die Einheitszellkonstanten bestimmen, die mit 40 mal 48 nm trotz des höheren Einheitszellinhalts sehr viel größer als die der bisher untersuchten bakteriellen Porine sind [Dolder *et al.*, 1996]. Die gemittelten Bilder zeigen wie schon für bekannte homotrimere Porine eine C3-Symmetrie. Eine Abschätzung des Porendurchmessers ergibt dann mit etwa 5 - 6 nm einen

Durchmesser, der eher dem des 22-strängigen monomeren Eisenrezeptors FhuA entspricht oder sogar noch darüber liegt.

#### 4.3.4 2D-Kristalle und Rasterkraft-Mikroskopie

Die P100-Kristalle bilden ein ideales Objekt für eine Methode, die schon erfolgreich an 2D-Kristallen von Bacteriorhodopsin (BR) angewendet wurde [Heymann *et al.*, 2000]. Dabei werden 2D-Kristalle im AFM unter physiologischen Bedingungen bei starker und schwacher Kraft abgetastet, was mit einem molekularen Schnitt durch die Z-Achse eines solchen Kristalls verglichen werden kann. Dabei kann, komplementär zu den Daten der Elektronenmikroskopie, die Topografie einer Oberfläche bestimmt werden.

Im Fall des Experimentes mit BR wurde die Oberflächentopografie in Abhängigkeit von der ausgeübten Kraft untersucht und dabei besonders flexible Loopstrukturen identifiziert. Um einzelne Loopstrukturen darzustellen, bedarf es jedoch einer Auflösung von besser als einem nm. Die für P100-Kristalle erzielte Auflösung liegt im Bereich von etwa 2 nm und damit nicht in einem Bereich, in dem Unterschiede in oben erwähnten Größenordnung messbar wären. Zudem gelingt eine Zuordnung der für P100 bestimmten Topografie mit bestimmten Strukturen des Proteins nur sehr schwer. Allerdings lassen sich Unterschiede größerer Strukturen bzw. deren Veränderung nach Änderung der Kraft problemlos erkennen. Die Domänenstruktur des *Triple-coiled-coil*, die im Fall von P100 interessiert, ist durch ihre Orientierung in Richtung der Z-Achse des Grids im Elektronenmikroskop in Projektionen nicht darstellbar. In einem solchen Fall können AFM-Messungen hilfreich sein, wenn die Oberfläche mit einem kurzen und langen Abstand zwischen der Spitze und der Probe abgescannt wird und man dadurch unterschiedliche Bilder einer Oberfläche erhält. Für P100 zeigt dieses Experiment die terminalen Strukturen des Proteins, wenn mit großem Spitze-Probe-Abstand. Da es sich um die sehr flexible Strukturen der Bindungsdomäne bzw. des *Coiled-coil* handelt, erkennt man in den AFM-Bildern nicht viel mehr als das Gitter der Probe. Erhöht man die Kraft für den Scan-Vorgang, so erreicht ab einem bestimmten Punkt die Spitze die Proteinoberfläche und beginnt auch die Pore abzubilden. Durch dieses Experiment gelang es auch eine sehr flexible Struktur darstellen. Bestimmt man den Abstand zwischen den Z-Scanschichten, so kann man aus diesem die ungefähre Länge der Coiled-coil-Struktur mit 10 - 12 nm abschätzen, was der für die Struktur vorhergesagten Länge

von 15 - 20 nm nahekommt. Mit diesen Untersuchungen ist der experimentelle Nachweis einer Stiel-bildenden Domäne erstmals geglückt. Außerdem zeigen sie, daß bestimmte Porine strukturelle Erweiterungen über die eigentliche Porenbildung hinaus aufweisen können und sie funktionell zu Proteinen stellen, die bei der Verankerung der äußeren Membran an das Peptidoglykan beteiligt sind.

## 5 Literatur

### A

Adams, V., Griffin, L.D., Gelb, B.D. & McCabe, E.R. (1991). Protein kinase activity of rat brain hexokinase. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **177**, 1101-1106.

Allen, A.B., Hilliard, N.P. & Howard, G.T. (1999). Purification and characterization of a soluble polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **43**, 37-41.

Arora, A., Rinehart, D., Szabo, G. & Tamm, L.K. (2000). Refolded outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 1594-1600.

### B

Baldermann, C., Lupas, A., Lubieniecki, J. & Engelhardt, H. (1998). The regulated outer membrane protein Omp21 from *Comamonas acidovorans* is identified as a member of a new family of eight-stranded beta-sheet proteins by its sequence and properties. *Journal of Bacteriology* **180**, 3741-3749.

Benz, R. (1994) The mitochondrial porins. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **375**, 21.

Beutner, G., Rück, A., Riede, B. & Brdiczka, D. (1997). Complexes between hexokinase, mitochondrial porin and adenylate translocator in brain: regulation of hexokinase, oxidative phosphorylation and permeability transition pore. *Biochemical Society Transactions* **25**, 151-157, 1997.

Beutner, G., Rück, A., Riede, B., Welte, W. & Brdiczka, D. (1996). Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Letters* **396**, 189-95.

Bhat, K.S., Gibbs, C.P., Barrera, O., Morrison, S.G., Jähnig, F., Stern, A., Kupsch, E.M., Meyer, T.F. & Swanson, J. (1991). The opacity proteins of *Neisseria gonorrhoeae* strain MS11 are encoded by a family of 11 complete genes. *Molecular Microbiology* **5**, 1889-1901.

1. Bofill, L., Wessollosky, M., Vicent, E., Salas, M., Besso, J., Merentes, A., Isturiz, R., Guzman, M. & Murillo, J. (1996). Septic shock due to *Comamonas acidovorans* – a most unusual association. *Infectious Diseases in Clinical Practice* **5**, 73-74.

Brünger, A.T., (1992). X-PLOR Version 3.1. A system for X-ray crystallography and NMR. Yale University Press, London.

Brunen, M., Engelhardt, H., Schmid, A. & Benz, R. (1991). The major outer membrane protein of *Acidovorax delafieldii* is an anion-selective porin. *Journal of Bacteriology* **173**, 4182-4187.

Brunen, M. & Engelhardt, H. (1993). Asymmetry of orientation and voltage gating of the Acidovorax delafieldii porin Omp34 in lipid bilayers. *European Journal of Biochemistry* **212**, 129-135.

Buchanan, S.K., Smith, B.S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D. & Deisenhofer, J. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nature Structural Biology* **6**, 56-63.

Buchanan, S.K. (1999). Overexpression and refolding of an 80-kDa iron transporter from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions* **27**, 903-908.

Buchanan, S.K. (1999). Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 455-461.

Bühler, S., Michels, J., Wendt, S., Rück, A., Brdiczka, D., Welte, W. & Przybylski, M. (1998). Mass spectrometric mapping of ion channel proteins (porins) and identification of their supramolecular membrane assembly. *Proteins Suppl* **2**, 63-73.

## C

Cartwright, K.A.V. (1995). Meningococcal disease. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, England.

Castagnola, E., Conte, M., Venzano, P., Garaventa, A., Viscoli, C., Barretta, M.A., Pescetto, L., Tasso, L., Nantron, M., Milanaccio, C. & Giacchino, R. (1997). Broviac catheter-related bacteraemias due to unusual pathogens in children with cancer – case reports with literature review. *Journal of Infection* **34**, 215-218.

Caston, J.R., Berenguer, J. De Pedro, M.A. & Carrascosa, J.L. (1993). S-layer protein from *Thermus thermophilus* HB8 assembles into porin-like structures. *Molecular Microbiology* **9**, 65-75.

Caston, J.R., Berenguer, J., Kocsis, E. & Carrascosa, J.L. (1994). Three dimensional structure of different aggregates built up by the S-layer protein of *Thermus thermophilus*. *Journal of Structural Biology* **113**, 164-176.

Collaborative Computational Project Number 4. (1994). The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **50**, 760-763.

Cowan, S.W. & Rosenbusch, J.P. (1994). Folding pattern diversity of integral membrane proteins. *Science* **264**, 914-916.

Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N. & Rosenbusch, J.P. (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**, 727-733.

Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal* **341**, 233-249.

## D

De Cock, H., Struyve, M., Kleerebezem, M., Vanderkrift, T. & Tommassen J. (1997). Role of the carboxy-terminal phenylalanine in the biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Molecular Biology* **269**, 473-478.

Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. (1985). Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature (London)* **318**, 618-624.

Dekker, N., Tommassen, J., Lustig, A., Rosenbusch, J.P. & Verheij, H.M. (1997). Dimerization regulates the enzymatic activity of *Escherichia coli* outer membrane phospholipase A. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 3179-3184.

Diederichs, K. (1994). A comparison of some heavy-atom refinement and phasing programs. *CCP4/ESF-EACBM Newsletters on Protein Crystallography* **31**, 23-30.

Diederichs, K. (1995). Structural superposition of proteins with unknown alignment and detection of topological similarity using a six-dimensional search algorithm. *Proteins* **23**, 187-195.

Diederichs, K., Freigang, J., Umhau, S., Zeth, K. & Breed, J. (1998). Prediction by a neural network of outer membrane beta-strand protein topology. *Protein Science* **7**, 2413-2420.

Dolder, M., Zeth, K., Tittmann, P., Gross, H., Welte, W. & Wallimann, T. (1999). Crystallization of the human, mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel in the presence of phospholipids. *Journal of Structural Biology* **127**, 64-71.

Dover, L.G., Evans, L.J.A., Fridd, S.L., Bainbridge, G., Raggett, E.M. & Lakey J.H. (2000). Colicin pore-forming domains bind to *Escherichia coli* trimeric porins. *Biochemistry* **39**, 8632-8637.

Dutzler, R., Rummel, G., Alberti, S., Hernandez-Alles, S., Phale, P., Rosenbusch, J.P., Benedi, V. & Schirmer, T. (1999). Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure* **7**, 425-434.

Dutzler, R., Wang, Y.F., Rizkallah, P., Rosenbusch, J.P. & Schirmer, T. (1996). Crystal structures of various maltooligosaccharides bound to maltoporin reveal a specific sugar translocation pathway. *Structure* **4**, 127-134.

## E

Ehrmann, M., Ehrle, R., Hofmann, E., Boos, W. & Schlosser, A. (1998). The ABC maltose transporter. *Molecular Microbiology* **29**, 685-694.

Eisele, J.L. & Rosenbusch, J.P. (1990). *In vitro* folding and oligomerization of a membrane protein. Transition of bacterial porin from random coil to native conformation. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 10217-10220.

Engel, A., Massalski, A., Schindler, H., Dorset, D.L. & Rosenbusch, J.P. (1985). Porin channel triplets merge into single outlets in *Escherichia coli* outer membranes. *Nature* **317**, 643-645.

Engel, A.M., Cejka, Z., Lupas, A., Lottspeich, F. & Baumeister W. (1992). Isolation and cloning of Omp alpha, a coiled-coil protein spanning the periplasmic space of the ancestral eubacterium *Thermotoga maritima*. *EMBO Journal* **11**, 4369-4378.

Engelhardt, H., Gerbl-Rieger, S., Santarius, U. & Baumeister, W. (1991). The three-dimensional structure of the regular surface protein of *Comamonas acidovorans* derived from native outer membranes and reconstituted two-dimensional crystals. *Molecular Microbiology* **5**, 1695-1702.

Engelhardt, H. & Peters, J. (1998). Structural research on surface layers: a focus on stability, surface layer homology domains, and surface layer-cell wall interactions. *Journal of Structural Biology* **124**, 276-302.

## F

Ferguson, A.D., Hofmann, E., Coulton, J.W., Diederichs, K. & Welte, W. (1998). Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**, 2215-2220.

Fernandezherrero L.A., Olabarria, G., Caston, J.R., Lasa, I. & Berenguer, J. (1995). Horizontal transference of S-layer genes within *Thermus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* **177**, 5460-5466.

Forst, D., Welte, W., Wacker, T. & Diederichs, K. (1998). Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nature Structural Biology* **5**, 37-46.

Fortelle de La, E. & Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom refinement in MIR and MAD methods. *Methods in Enzymology* **276**, 472-494.

## G

Gerbl-Rieger, S., Engelhardt, H., Peters, J., Kehl, M., Lottspeich, F. & Baumeister, W. (1992). Topology of the anion-selective porin Omp32 from *Comamonas acidovorans*. *Journal of Structural Biology* **108**, 14-24.

Glocker, M.O., Borchers, C., Fiedler, W., Suckau, D. & Przybylski, M. (1994). Molecular characterization of surface topology in protein tertiary structures by amino-acylation and mass spectrometric peptide mapping. *Bioconjugate Chemistry* **5**, 583-590.

Guo, X.W., Smith, P.R., Cognon, B., D'Arcangelis, D., Dolginova, E. & Mannella, C.A. (1995). Molecular design of the voltage-dependent, anion-selective channel in the mitochondrial outer membrane. *Journal of Structural Biology* **114**, 41-59.

Guo, X.W. & Mannella, C.A. (1993). Conformational change in the mitochondrial channel, VDAC, detected by electron cryo-microscopy. *Biophysical Journal* **64**, 545-549.

## H

Hall, J.A., Davidson, A.L. & Nikaido, H. (1998). Preparation and reconstitution of membrane-associated maltose transporter complex of *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* **292**, 20-29.

Hancock, R.E.W., Karunaratne, D.N. & Bernegger-Egli, C. (1994). Molecular organization and structural role of the outer membrane macromolecules. Ghuysen J.M. & Hakenbeck (eds.). In: Bacterial cell wall. Elsevier Science B. V., Amsterdam.

Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. & Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* **395**, 516-521.

Hirsch, A., Breed, J., Saxena, K., Richter, O.M., Ludwig, B., Diederichs, K. & Welte, W. (1997). The structure of porin from *Paracoccus denitrificans* at 3.1 Å resolution. *FEBS Letters* **404**, 208-210.

Hirsch, A., Wacker, T., Weckesser, J., Diederichs, K. & Welte, W. (1995). Purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray results from *Paracoccus denitrificans* porin. *Proteins* **23**, 282-284.

Hitscherich, C., Jeffrey, K., Allaman, M., Wienczek, J. & Loll, P. (2000). Static light scattering studies of OmpF porin: Implications for integral membrane protein crystallization. *Protein Science* **9**, 1559-1566.

Höltje, J.V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology & Molecular Biology Review* **62**, 181-203.

Hutchinson, E.G. & Thornton J.M. (1996). PROMOTIF-a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Science* **5**, 212-220.

## I/J

Jancarik, J. & Kim, S.H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography* **24**, 409-411.

Jeanteur, D., Schirmer, T., Fourel, D., Simonet, V., Rummel, G., Widmer, C., Rosenbusch, J.P., Pattus, F. & Pages, J.M. (1994). Structural and functional alterations of a colicin-resistant mutant of OmpF porin from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10675-10679.

Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica Section A Crystallography* **A47**, 110-119.

## K

Kabsch, W (1988). Evaluation of single crystal diffraction data from a position-sensitive detector. *Journal of applied crystallography* **21**, 916-924.



Kawano, S., Kuruma, A., Hirayama, Y. & Hiraoka, M. (1999). Anion permeability and conduction of adenine nucleotides through a chloride channel in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 2085-2092.

Kayser, H., Kratzin, H.D., Thinner, F.P., Götz, H., Schmidt, W.E., Eckart, K. & Hilschmann, N. (1989). Identification of human porins. II. Characterization and primary structure of a 31-kDa porin from human B lymphocytes. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **370**, 1265-1278.

Kleffel, B., Garavito, R.M., Baumeister, W. & Rosenbusch, J.P. (1985). Secondary structure of a channel-forming protein: porin from *E. coli* outer membranes. *EMBO Journal* **4**, 1589-1592.

Kleinschmidt, J.H., den Blaauwen, T., Driessen, A.J. & Tamm, L.K. (1999). Outer membrane protein A of *Escherichia coli* inserts and folds into lipid bilayers by a concerted mechanism. *Biochemistry* **38**, 5006-5016.

Koppel, D.A., Kinnally, K.W., Masters, P., Forte, M., Blachly-Dyson, E. & Mannella, C.A. (1998). Bacterial expression and characterization of the mitochondrial outer membrane channel. Effects of N-terminal modifications. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 13794-13800.

Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. & Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**, 914-919.

Kraulis, P.J. (1991). Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **24**, 826-839.

Kreusch, A., Weiss, M.S., Welte, W., Weckesser, J. & Schulz, G.E. (1991). Crystals of an integral membrane protein diffracting to 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **217**, 9-10.

Kreusch, A. & Schulz, G.E. (1994). Refined structure of the porin from *Rhodopseudomonas blastica*. Comparison with the porin from *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Molecular Biology* **243**, 891-905.

Kreusch, A., Neubüser, A., Schiltz, E., Weckesser, J. & Schulz, G.E. (1994). Structure of the membrane channel porin from *Rhodopseudomonas blastica* at 2.0 Å resolution. *Protein Science* **3**, 58-63.

## L

Landau, E.M. & Rosenbusch, J.P. (1996). Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14532-14535.

Lepault, J., Dargent, B., Tichelaar, W., Rosenbusch, J.P., Leonard, K. & Pattus, F. (1988). Three-dimensional reconstruction of maltoporin from electron microscopy and image processing. *EMBO Journal* **7**, 261-268.

Locher, K.P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J.P. & Moras, D. (1998). Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**, 771-877.

Lupas, A. (1996). Coiled coils: New structures and new functions. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 375-382.

## M

McEnery, M.W., Snowman, A.M., Trifiletti, R.R. & Snyder, S.H. (1992). Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 3170-3174.

Mannella, C.A. (1984). Phospholipase-induced crystallization of channels in mitochondrial outer membranes. *Science* **224**, 165-166.

Mannella, C.A. (1986). Mitochondrial outer membrane channel (VDAC, porin) two-dimensional crystals from *Neurospora*. *Methods in Enzymology* **125**, 595-610.

Mannella, C.A. & Guo, X.W. (1990). Interaction between the VDAC channel and a polyanionic effector. An electron microscopic study. *Biophysical Journal* **57**, 23-31.

Mannella, C.A., Guo, X.W. & Dias, J. (1992). Binding of a synthetic targeting peptide to a mitochondrial channel protein. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes* **24**, 55-61.

Mannella, C.A. (1992). The 'ins' and 'outs' of mitochondrial membrane channels. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 315-320.

Mannella, C.A. (1993). Imaging mitochondrial membrane potentials. *Biophysical Journal* **65**, 2269-2270.

Mannella C.A. (1996). Mitochondrial channels revisited. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes* **28**, 89-91.

Mannella, C.A. (1997). Minireview: on the structure and gating mechanism of the mitochondrial channel, VDAC. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes* **29**, 525-531.

Mannella, C.A., Marko, M. & Buttle, K. (1997). Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 37-38.

Mannella, C.A. (1998). Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional implications. *Journal of Structural Biology* **121**, 207-218.

Marvinsikkema, F.D. & Debont, J.A.M. (1994). Degradation of nitroaromatic compounds by microorganisms. *Applied Microbiology & Biotechnology* **42**, 499-507.

Massari, P., Ho Y. & Wetzler, LM. (2000). *Neisseria meningitidis* porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 9070-9075.

Mathes, A. & Engelhardt, H. (1998). Nonlinear and asymmetric open channel characteristics of an ion-selective porin in planar membranes. *Biophysical Journal* **75**, 1255-1262.

Mathes, A. & Engelhardt, H. (1998). Voltage-dependent closing of porin channels: analysis of relaxation kinetics. *Journal of Membrane Biology* **165**, 11-18.

Merrit, E.A. & Murphy, M.E.P. (1994). RASTER3D version 2.0: a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **50**, 869-873.

Messina, A., Guarino, F., Oliva, M., van den Heuvel, L.P., Smeitink, J. & De Pinto, V. (2000). Characterization of the human porin isoform 1 (HVDAC1) gene by amplification on the whole human genome: A tool for porin deficiency analysis. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **270**, 787-792.

Medzhitov, R. & Janeway, C.A. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298.

Messner, P. & Sleytr, U.B. (1992). Crystalline bacterial cell-surface layers. *Advances in Microbial Physiology* **33**, 213-275

Meyer, J.E. & Schulz, G.E. (1997). Energy profile of maltooligosaccharide permeation through maltoporin as derived from the structure and from a statistical analysis of saccharide-protein interactions. *Protein Science* **6**, 1084-1091.

Meyer, J.E., Hofnung, M. & Schulz, G.E. (1997). Structure of maltoporin from *Salmonella typhimurium* ligated with a nitrophenyl-maltotrioxide. *Journal of Molecular Biology* **266**, 761-775.

Müller, A., Günther, D., Dux, F., Naumann, M., Meyer, T.F. & Rudel, T. (1999). *Neisserial* porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *EMBO Journal* **18**, 339-352.

Murzin, A.G., Lesk, A.M. & Chothia, C. (1994). Principles determining the structure of beta-sheet barrels in proteins: I. A theoretical analysis. *Journal of Molecular Biology* **236**, 1369-1381.

## N

Nakae, T. (1979). A porin activity of purified lambda-receptor protein from *Escherichia coli* in reconstituted vesicle membranes. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **88**, 774-781.

Nicastro, D., Frangakis, A.S., Typke, D. & Baumeister, W. (2000). Cryo-electron tomography of *Neurospora* mitochondria. *Journal of Structural Biology* **129**, 48-56.

Nicholls, A., Sharp, K.A. & Honig, B. (1991). Protein folding and association insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**, 281-296.

Nikaido H. (1976). Outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. *Biochimica et Biophysica Acta* **433**, 118-132.

Nikaido, H. & Saier, M.H. (1992). Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science* **258**, 936-942.

Nikaido, H. (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Molecular Microbiology* **6**, 435-442.

Nikaido, H. (1993). Transport across the bacterial outer membrane. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes* **25**, 581-589.

Nikaido, H. (1994). Isolation of outer membranes. *Methods in Enzymology* **235**, 225-234.

Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**, 382-388.

Nikaido, H. (1994). Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 3905-3908.

Nikaido, H. & Hall, J.A. (1998). Overview of bacterial ABC transporters. *Methods in Enzymology* **292**, 3-20.

## O/P

Olabarria, G., Carrascosa, J.L., de Pedro, M.A. & Berenguer, J. (1996). A conserved motif in S-layer proteins is involved in peptidoglycan binding in *Thermus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* **178**, 4765-4772.

Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methody in Enzymology* **276**, 307-326.

Pajatsch, M., Andersen, C., Mathes, A., Böck, A., Benz, R. & Engelhardt, H. (1999). Properties of a cyclodextrin-specific, unusual porin from *Klebsiella oxytoca*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 25159-25166.

Pastor, R.W., Venable, R.M. & Karplus, M. (1991). Model for the structure of the lipid bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 892-896.

Pauptit, R.A., Schirmer, T., Jansonius, J.N., Rosenbusch, J.P., Parker, M.W., Tucker, A.D., Tsernoglou, D., Weiss, M.S. & Schultz, G.E. (1991). A common channel-forming motif in evolutionarily distant porins. *Journal of Structural Biology* **107**, 136-145.

- Pautsch, A. & Schulz, G.E. (1998). Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nature Structural Biology* **5**, 1013-1017.
- Pautsch, A., Vogt, J., Model, K., Siebold, C. & Schulz, G.E. (1999). Strategy for membrane protein crystallization exemplified with OmpA and OmpX. *Proteins* **34**, 167-172.
- Pautsch, A. & Schulz, G.E. (2000). High-resolution structure of the OmpA membrane domain. *Journal of Molecular Biology* **298**, 273-282.
- Pebay-Peyroula, E., Garavito, R.M., Rosenbusch, J.P., Zulauf, M. & Timmins, P.A. (1995). Detergent structure in tetragonal crystals of OmpF porin. *Structure* **3**, 1051-1059.
- Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J.P. & Landau, E.M. (1997). X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angströms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* **277**, 1676-1681.
- Penel, S., Pebay-Peyroula, E., Rosenbusch, J.P., Rummel, G., Schirmer, T. & Timmins, P.A. (1998). Detergent binding in trigonal crystals of OmpF porin from *Escherichia coli*. *Biochimie* **80**, 543-551.
- Phale, P.S., Philippsen, A., Kiefhaber, T., Koebnik, R., Phale, V.P., Schirmer, T. & Rosenbusch, J.P. (1998). Stability of trimeric OmpF porin: The contributions of the latching loop L2. *Biochemistry* **37**, 15663-15670.
- Pieper, D.H., Timmis K.N. & Ramos, J.L. (1996). Designing bacteria for the degradation of nitro- and chloroaromatic pollutants. *Naturwissenschaften*. **83**, 201-213.
- Pohlmeier, K., Soll, J., Grimm, R., Hill, K. & Wagner, R.A. (1998). High conductance solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. *Plant Cell* **10**, 1207-1216.
- Poole, K., Parr, T.R. & Hancock, R.E. (1987). Phosphate-selective porins from the outer membranes of fluorescent *Pseudomonas* sp.. *Canadian Journal of Microbiology* **33**, 63-69.
- Przybylski, M., Glocker, M.O., Nestel, U., Schnaible, V., Blüggel, M., Diederichs, K., Weckesser, J., Schad, M., Schmid, A., Welte, W. & Benz, R. (1996). X-ray crystallographic and mass spectrometric structure determination and functional characterization of succinylated porin from *Rhodobacter capsulatus*: implications for ion selectivity and single-channel conductance. *Protein Science* **5**, 1477-1489.
- Przybylski, M., Schnaible, V., Kast, J., Bühler, S., Michels, J., Wattenberg, A., Fligge, T.A., Forst, D., Diederichs, K., Nestel, U., Zeth, K., Glocker, M.O. & Welte, W. (1998). Approaches to the characterisation of tertiary and supramolecular protein structures by combination of protein chemistry and mass spectrometry. *NATO Asi (Advanced Science Institutes) Series Series C Mathematical & Physical Sciences. Ens, W.; Standing, K. G.; Chernushevich, I. V.: Eds. NATO ASI Series Series C Mathematical and Physical Sciences; New methods for the study of biomolecular complexes* 17-43.

## Q/R

Reymann, S., Flörke, H., Heiden, M., Jakob, C., Stadtmüller, U., Steinacker, P., Lalk, V.E., Pardowitz, I. & Thinnies, F.P. (1995). Further evidence for multitopological localization of mammalian porin (VDAC) in the plasmalemma forming part of a chloride channel complex affected in cystic fibrosis and encephalomyopathy. *Biochemical & Molecular Medicine* **54**, 75-87.

Rohl, T., Motzkus, M. & Soll, J. (1999). The outer envelope protein OEP24 from pea chloroplasts can functionally replace the mitochondrial VDAC in yeast. *FEBS Letters* **460**, 491-494.

Rosenbusch, J.P. (1974). Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecyl sulfate binding. *Journal of Biological Chemistry* **249**, 8019-8029.

Rosenbusch, J.P. (1990). Structural and functional properties of porin channels in *E. coli* outer membranes. *Experientia* **46**, 167-173.

Rost, B., Schneider, R. & Sander, C. (1997). Protein fold recognition by prediction-based threading. *Journal of Molecular Biology* **270**, 471-480.

## S

Sapan, C.V., Lundblad, R.L. & Price, N.C. (1999). Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology & Applied Biochemistry* **29**, 99-108.

Sass, H.J., Büldt, G., Beckmann, E., Zemlin, F., van Heel, M., Zeitler, E., Rosenbusch, J.P., Dorset, D.L. & Massalski, A. (1989). Densely packed beta-structure at the protein-lipid interface of porin is revealed by high-resolution cryo-electron microscopy. *Journal of Molecular Biology* **209**, 171-175.

Sawai, T., Matsuba, K. & Yamagishi S. (1977). A method for measuring the outer membrane-permeability of beta-lactam antibiotics in gram-negative bacteria. *Journal of Antibiotics* **30**, 1134-1136.

Saxton, W.O. (1996). Semper: Distortion compensation, selective averaging, 3-D reconstruction, and transfer function correction in a highly programmable system. *Journal of Structural Biology* **116**, 230-236.

Schägger, H., Cramer, W.A. & von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **217**, 220-230.

Schindler, H. & Rosenbusch, J.P. (1978). Matrix protein from *Escherichia coli* outer membranes forms voltage-controlled channels in lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 3751-3755.

Schindler, M. & Rosenbusch, J.P. (1982). Chemical modification of matrix porin from *Escherichia coli*: probing the pore topology of a transmembrane protein. *Journal of Cell Biology* **92**, 742-746.

- Schirmer, T., Keller, T.A. Wang, Y.F. & Rosenbusch, J.P. (1995). Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**, 512-514.
- Schmid, K., Ebner, R., Jahreis, K., Lengeler, J.W. & Titgemeyer F.A. (1991). Sugar-specific porin is involved in sucrose uptake in enteric bacteria. *Molecular Microbiology* **5**, 941-950.
- Schmid, B., Krömer, M. & Schulz, G.E. (1996). Expression of porin from *Rhodopseudomonas blastica* in *Escherichia coli* inclusion bodies and folding into exact native structure. *FEBS Letters* **381**, 111-114.
- Schnaible, V., Michels, J., Zeth, K., Freigang, J., Welte, W, Bühler, S., Glocker, M.O. & Przybylski, M. (1997). Approaches to the characterization of membrane channel proteins (porins) by UV MALDI-MS. *International Journal of Mass Spectrometry & Ion Processes* **169-170**, 165-177.
- Schulz, G.E. (1996). Porins: general to specific, native to engineered passive pores. *Current Opinion in Structural Biology* **6**, 485-490.
- Schulz, G.E. (1993). Bacterial porins: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* **5**, 701-707.
- Shafir, I., Feng, W. & Shoshan-Barmataz, V. (1998). Voltage-dependent anion channel proteins in synaptosomes of the Torpedo electric organ: Immunolocalization, purification, and characterization. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes* **30**, 499-510.
- Shao, L., Kinnally, K.W. & Mannella, C.A. (1996). Circular dichroism studies of the mitochondrial channel, VDAC, from *Neurospora crassa*. *Biophysical Journal* **71**, 778-786.
- Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483-487.
- Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T. & Tsujimoto, Y. (2000). Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 12321-12325.
- Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T. & Tsujimoto, Y. (2000). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3100-3105.
- Szmelcman, S. & Hofnung, M. (1975). Maltose transport in *Escherichia coli* K-12: involvement of the bacteriophage lambda receptor. *Journal of Bacteriology* **124**, 112-118.
- Song, J.M., Midson, C., Blachlydyson, E., Forte, M. & Colombini, M. (1998). The topology of VDAC as probed by biotin modification. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 24406-24413.

Steinkamp, T., Hill, H., Hinnah, S.C., Wagner, R., Rohl, T., Pohlmeier, K. & Soll, J. (2000). Identification of the pore-forming region of the outer chloroplast envelope protein OEP16. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 11758-11764.

Steven, A.C., Heggeler, B., Müller, R., Kistler, J. & Rosenbusch, J.P. (1977). Ultrastructure of a periodic protein layer in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Cell Biology* **72**, 292-301.

Srikumar, R., Dahan, D., Arhin, F.F., Tawa, P., Diederichs, K. & Coulton, J.W. (1997). Porins of *Haemophilus influenzae* type b mutated in loop 3 and in loop 4. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 13614-13621.

Sugawara, E. & Nikaido, H. (1994). OmpA protein of *Escherichia coli* outer membrane occurs in open and closed channel forms. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 17981-17987.

Surrey, T. & Jaehnig, F. (1992). Refolding and oriented insertion of a membrane protein into a lipid bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7457-7461.

Surrey, T. & Jaehnig, F. (1995). Kinetics of folding and membrane insertion of a beta-barrel membrane protein. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 28199-28203.

Surrey, T., Schmid, A. & Jaehnig, F. (1996). Folding and membrane insertion of the trimeric beta-barrel protein OmpF. *Biochemistry* **35**, 2283-2288.

Szabo, I., Bathori, G., Tombola, F., Coppola, A., Schmehl, I., Brini, M., Ghazi, A., Depinto, V. & Zoratti, M. (1998). Double-stranded DNA can be translocated across a planar membrane containing purified mitochondrial porin. *FASEB Journal* **12**, 495-502.

## T

Terwilliger, T.C. & Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **55**, 849-861.

Thinnes, F.P. & Reymann, S. (1997). New findings concerning vertebrate porin. *Naturwissenschaften* **84**, 480-498.

## U/V

van der Ley, P. (1988). Three copies of a single protein II-encoding sequence in the genome of *Neisseria gonorrhoeae* JS3: evidence for gene conversion and gene duplication. *Molecular Microbiology* **2**, 797-806.

Van Gelder, P., Saint, N., van Boxtel, R., Rosenbusch, J.P. & Tommassen, J. (1997). Pore functioning of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*: mutagenesis of the constriction loop L3. *Protein Engineering* **10**, 699-706.



Van Gelder, P., Dumas, F., Rosenbusch, J.P. & Winterhalter, M. (2000). Oriented channels reveal asymmetric energy barriers for sugar translocation through maltoporin of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **267**, 79-84.

Vander Heiden, M.G. & Thompson, C.B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology* **1**, E209-E216.

Voet, D. & Voet, J. (1994). *Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York.

Vogt, J. & Schulz, G.E. (1999). The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure with Folding & Design* **7**, 1301-1309.

## W

Wang, Y.F., Dutzler, R., Rizkallah, P.J., Rosenbusch, J.P. & Schirmer, T. (1997). Channel specificity: structural basis for sugar discrimination and differential flux rates in maltoporin. *Journal of Molecular Biology* **272**, 56-63.

Weiss, M.S., Wacker, T., Weckesser, J., Welte, W. & Schulz, G.E. (1990). The three-dimensional structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 3 Å resolution. *FEBS Letters* **267**, 268-272.

Weiss, M.S., Abele, U., Weckesser, J., Welte, W., Schiltz, E. & Schulz, G.E. (1991). Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* **254**, 1627-1630.

Weiss M.S., Kreuzsch A., Schiltz E., Nestel U., Welte W., Weckesser J. & Schulz G.E. (1991). The structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 1.8 Å resolution. *FEBS Letters* **280**, 379-382.

Weiss, M.S. & Schulz, G.E. (1993). Porin conformation in the absence of calcium. Refined structure at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **231**, 817-824.

Welte, W., Weiss, M.S., Nestel, U., Weckesser, J., Schiltz, E. & Schulz, G.E. (1991). Prediction of the general structure of OmpF and PhoE from the sequence and structure of porin from *Rhodobacter capsulatus*. Orientation of porin in the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **1080**, 271-274.

Welte, W., Nestel, U., Wacker, T. & Diederichs, K. (1995). Structure and function of the porin channel. *Kidney International* **48**, 930-940.

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

Wolf, E., Zahr, M., Benz, R., Imhoff, J.F., Lustig, A., Schiltz, E., Stahlzeng, J. & Weckesser, J. (1996). The porins from the halophilic species *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* and *Ectothiorhodospira vacuolata*. *Archives of Microbiology* **166**, 169-175.

Wolf, E., Achatz, G., Imhoff, J.F., Schiltz, E., Weckesser, J. & Lamers, M.C. (1997). Porin from the halophilic species *Ectothiorhodospira vacuolata* – cloning, structure of the gene and comparison with other porins. *Gene* **191**, 225-232.

## X/Y/Z

Zeth, K., Schnaible, V., Przybylski, M., Welte, W., Diederichs, K. & Engelhardt, H. (1998). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the native and chemically modified anion-selective porin from *Comamonas acidovorans*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **54**, 650-653.

Zeth, K., Diederichs, K., Welte, W., Engelhardt, H. (2000). Crystal structure of Omp32, the anion-selective porin from *Comamonas acidovorans*, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 Å resolution. *Structure with folding and design* **8**, 981-992.

Zizi, M., Byrd, C., Boxus, R. & Colombini, M. (1998). The voltage-gating process of the voltage-dependent anion channel is sensitive to ion flow. *Biophysical Journal* **75**, 704-713.

## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor. Dr. W. Baumeister für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die Gelegenheit, deren hervorragende Infrastruktur zu nutzen.

Herzlich danke ich Dr. Harald Engelhardt für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit, auch meinen eigenen Interessen nachgehen zu dürfen und so ein breites Spektrum von Methoden erlernen und einsetzen zu können.

Bei Jan Lubiniecki möchte ich mich für seine aufopferungsvolle Hilfe in allen Fragen der Zellzucht und Reinigung bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Eckard Hofmann, nicht nur für das Korrekturlesen der Doktorarbeit, sondern vor allem für seinen unermüdlichen Einsatz um das Konstanzer Labor und sein offenes Ohr in allen Fragen der Röntgenkristallographie.

Anton (Toni) Mathes und Cornelia Baldermann danke ich für die nette Aufnahme in ihre ‚Subgruppe‘ und die Verbreitung der angenehmen, oft heiteren Atmosphäre.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Prof. Baumeister danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders erwähnen möchte ich dabei alle Mitglieder des ‚Tunnelvereins‘ sowie Oana Mihalache, Günther Pfeifer, Stephan Nickell, Dr. Peter Zwickl und Dr. Erika Seemüller.

Wolfram Welte und Kay Diederichs waren maßgeblich an der Strukturlösung von Omp32 beteiligt und so gebührt auch ihnen ein Dank für das Gelingen der Arbeit.

Die Abteilung Lottspeich ist mir in vielerlei Hinsicht in Fragen der Proteinanalyse zur Seite gestanden. Ein besonderer Dank geht an Kerstin Andersson, Monica Zobawa und Reinhard Mentele.

Vielen ‚Externen‘ gilt es zu danken, für ihr Vertrauen, die Vielfältige mir zugekommene Unterstützung und Ermutigung in Phasen der Resignation. Dazu

gehören Christian Müller, Prof. Regine Hengge-Aronis, Dr. Eberhard Klauck, Clemens Scheufler, Dr. Tim Clausen, Antje May, Olaf Neuschaefer-Rube, Prof. Michael Ehrmann, Dr. Christof Spiess, Dr. Oliver Einsle, Dr. Robert Schwarzenbacher und Dr. Ruth Prassl.

## Lebenslauf

**Name:** Kornelius Zeth  
**Geburtsdatum:** 20.01.1968  
**Geburtsort:** Balingen  
**Familienstand:** ledig  
**Eltern:** Reinhard Zeth, Dipl.-Ing.  
Eleonore Zeth geb. Baur, Diplom-Musikerin

## Ausbildung

**1974 – 1978** Grundschule in Balingen  
**1978 – 1985** Gymnasium in Balingen, mittlere Reife  
**1985 – 1988** Gymnasium Furtwangen  
**Mai 1988** Allgemeine Hochschulreife  
**10/1988 – 8/1991** Studium der Chemie an der Universität Stuttgart  
**3/1991** Vordiplom im Studiengang Chemie  
**9/1991 – 1/1992** Studienaufenthalt an der University of Cincinnati/Ohio, USA  
**3/1992 – 8/1995** Studium der Chemie an der Universität Freiburg  
**9/1994 – 8/1995** Diplomarbeit am Institut für Physikalische Chemie der Universität Freiburg unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. G. Kothe:  
*„Transiente Elektronenspinresonanz an lichtinduzierten Radikalpaaren der bakteriellen Photosynthese“*  
**8/1995** Diplom im Studiengang Chemie, Universität Freiburg  
**8/1995 – 11/1995** Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physikalische Chemie der Universität Freiburg  
**12/1995 – 10/2000** Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Strukturbiologie, unter der wissenschaftlichen Anleitung von Dr. Harald Engelhardt:  
*„Strukturuntersuchungen an Porinen aus Pro- und Eukaryonten“*  
**3/1996 – 10/1998** Wissenschaftlicher Aufenthalt an der Fakultät für Biologie der Universität Konstanz