

Funktions- und Strukturanalyse eines integralen Cytoplasmamembranproteins

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors rerum naturalium
der Fakultät für Biologie
Universität Konstanz

vorgelegt von
Rainer R. Ehrle

Konstanz
August 1997

Danke

Es sollen dir danken, Herr, alle deine Werke.
Ps. 145, 10as

Meiner Sabine und meiner Mutter

Ich bedanke mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. M. Ehrmann für das sehr interessante
Dissertationsthema und für die Betreuung.
Bei Herrn Prof. Dr. W. Boos bedanke ich mich für seine Unterstützung und dafür, daß diese
Arbeit in den Labors seiner AG stattfinden konnte.

An alle meine Laborkollegen ein großes Danke für das Miteinander!
Besonders bedanken möchte ich mich bei Kerstin Uhland für die famose Zusammenarbeit und
gemeinsames Nachdenken und Kopfzerbrechen, das für mich zu einer großen Bereicherung
geworden ist.

Für Ratschläge und Hilfestellungen zu dieser Arbeit bedanke ich mich herzlich bei:
Prof. Dr. H.-J. Apell, Dipl. Ing. Gerd Demny, Dr. K. Diederichs und Dr. J. Pleiss.

Finanzielle Unterstützung

Meine Doktorarbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der Hans Böckler Stiftung
gefördert und zeitweilig durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 156), wofür
ich mich bedanken möchte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit wurden zu einem Teil in folgenden Zeitschriftenartikeln veröffentlicht:

Uhland, K., Ehrle, R., Zander, T., Ehrmann, M. (1994). Requirements for translocation of periplasmic domains in polytopic membrane proteins. *J. Bacteriol.* **176** (15): 4565-4571.

Ehrle, R., Pick, C., Ulrich, R., Hofmann, E., Ehrmann, M. (1996). Characterization of transmembrane domains 6, 7, and 8 of MalF by mutational analysis. *J. Bacteriol.* **178** (8): 2255-2262.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Zusammenfassung	1
II. Einleitung	3-19
1. Das integrale Cytoplasmamembranprotein MalF als Bestandteil des Maltoseregulons und des Maltose- und Maltodextrintransporters von <i>Escherichia coli</i>	3
1.1 Das Maltoseregulon.....	3
1.2 Das Maltose- und Maltodextrintransportsystem von <i>Escherichia coli</i>	4
2. Integrale Membranproteine: Membraninsertion, Topologie, Struktur und Funktion mit dem Beispiel MalF	5
2.1 Klassifizierung von Membranproteinen und Transmembrandomänen.....	5
2.2 Modelle der Membraninsertion integraler Membranproteine.....	6
2.3 Membraninsertion durch den Sec-Translokationsapparat.....	7
2.4 Sequenzdeterminanten von Membraninsertion und Membrantopologie.....	9
2.5 Topologiebestimmung integraler Membranproteine.....	11
2.5.1 Methoden der Topologiebestimmung integraler Membranproteine.....	11
2.5.2 Topologiebestimmungen mit Alkalische Phosphatase als Reporterprotein.....	13
2.5.3 Die Topologie von MalF und MalG.....	13
2.6 Die Faltung polytopter Membranproteine.....	14
2.7 Die Membraninsertion und Ausbildung der Topologie am Beispiel von MalF.....	15
2.8 Die Zusammenlagerung von MalF zur quartären Struktur mit MalG und MalK.....	15
2.9 Der Transportvorgang am MalFGK ₂ -Komplex.....	16
2.10 Substratspezifische Mutationen in MalG.....	17
2.11 Maltosebindeprotein-unabhängiger Transport von Maltose.....	17
3. Modellbildung einer 3D-Struktur integraler Membranproteine	18
4. Fragestellungen und methodische Ansätze dieser Arbeit	19
III. Material und Methoden	20-39
1. Abkürzungen	20
2. Labormaterial, Chemikalien und Enzyme	21
3. Bakterienstämme	22
4. Plasmide	23
5. Bakteriophagen	26
6. Flüssigmedien, Agarplatten und Medienzusätze	26
7. Mikrobiologische Methoden	28
7.1 Wachstumsbedingungen.....	28
7.2 Aufbewahren von Stämmen.....	28
7.3 Bestimmung der Zelldichte.....	29
7.4 MacConkey-Plattentests.....	29

8. Molekularbiologische Methoden	29
8.1 Herstellung eines Phagen-Stammlysates (M13 Helferphage f1R408).....	29
8.2 Präparation von Plasmid-DNA.....	30
8.2.1 Präparation von Plasmid-Einzelstrang-DNA.....	30
8.2.2 Präparation von Plasmid-Doppelstrang-DNA.....	30
8.3 Agarosegelelektrophorese.....	30
8.4 Transformation.....	31
8.4.1 TSS-Transformation.....	31
8.4.2 Transformation mit CaCl ₂ behandelten Zellen.....	31
8.4.3 Elektrotransformation.....	31
8.5 M13-Einzelstrang-DNA Mutagenese.....	32
8.6 Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA.....	33
8.7 Sequenziergele.....	34
8.8 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	35
8.8.1 Konstruktion der <i>malF-phoA</i> -Fusionen.....	35
8.8.2 Konstruktion der <i>malF IIIphoA</i> -Fusionen.....	36
8.9 Stammkonstruktion durch Transduktion mit dem Bakteriophagen P1.....	37
8.9.1 Herstellung eines P1-Lysats.....	37
8.9.2 P1-Transduktion.....	37
8.9.3 Stammkonstruktionen.....	37
9. Biochemische Methoden	38
9.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
9.2 "Westernblotting" (Immunoblotanalyse).....	38
9.3 Bestimmung der Alkalische Phosphatase-Aktivität.....	38
9.4 Maltose-Transporttest.....	39
9.5 Proteolyse von MalF in Sphäroplasten.....	39

IV. Ergebnisse.....40-103

1. Identifizierung und Charakterisierung funktionell wichtiger Aminosäuren in MalF	40
1.1 Die Suche nach Mutationen.....	40
1.1.1 Mutagenese der Transmembrandomäne 6 und 8 von MalF.....	40
1.1.2 Umkehrmutagenese.....	43
1.2 Charakterisierung von Eigenschaften und Phänotypen der MalF-Mutanten.....	43
1.2.1 Konservative und nicht konservative Aminosäuresubstitutionen in der Transmembrandomäne 6 und 8.....	43
1.2.2 MalF-Mutanten mit einer Instabilität <i>in vivo</i>	44
1.2.3 Maltosetransportaktivität der MalF-Mutanten.....	44
1.2.3.1 Maltosetransportraten.....	44
1.2.3.2 Vergleich der Transmembrandomänen 6 und 8 anhand des Maltosetransports der MalF-Mutanten.....	45
1.2.3.3 V _{max} -Werte und K _m -Werte des Maltosetransports der isolierten Mutanten.....	46
1.2.4 Phänotypen von MalF-Mutanten auf Minimal-Maltose-Platten.....	46
1.2.5 Phänotypen von Mutanten auf Minimal-Dextrin-Platten und generelle Kategorien von Substratphänotypen.....	47

1.2.6	Spezifische Substrat-dominant negative Phänotypen.....	48
1.2.7	Vergleich der Transmembrandomänen 6 und 8 anhand der verschiedenen Substratphänotypen der <i>malF</i> -Mutanten.....	48
1.2.8	Temperatursensitivität und Kältesensitivität von <i>malF</i> -Mutanten.....	49
1.2.9	Die Position der Aminosäureaustausche in einer Helixgrafik.....	52
1.3	Strukturelle Änderungen von MalF-Derivaten.....	55
1.3.1	Proteasesensitivität der MalF-Mutanten in TM 6 und TM 8.....	55
1.3.2	Die Ergebnisse der Proteasetests von MalF-Derivaten der TM 6 und TM 8.....	57
1.4	Gibt es eine Korrelation von Hydropathieveränderung und Phänotypen von Mutationen?.....	62
2.	Untersuchung der Membraninsertion von MalF-PhoA-Fusionen.....	65
2.1	Geladene Aminosäuren in Transmembrandomänen beeinflussen die Membraninsertion.....	65
2.1.1	Die Transmembrandomäne 6 von MalF als Stop-Transfer-Signal.....	65
2.1.2	Die Transmembrandomäne 6 von MalF als Exportsignal.....	71
2.2	Grundlegende Exportbedingungen für die C-terminale hydrophile Domäne des polytopen Membranproteins MalF-AP-Fusion J.....	76
2.2.1	Das genetische Selektionssystem.....	76
2.1.2	Mutationen, die das Wachstum in einem <i>serB trxB E. coli</i> -Stamm ermöglichen...77	77
3.	Modellierung eines Arbeitsmodells des MalF/MalG	
	Transmembrankomplexes	80
3.1	Sequenzvergleiche mit homologen Proteinen liefern Informationen über strukturelle Charakteristika der membranspannenden Segmente.....	80
3.2	Vorhersage der Topologie von CymF/CymG und MalC/MalD.....	83
3.3	Beschränkung der Untersuchung einer jeden Helix auf ihre putativ zentralen achtzehn Aminosäuren.....	83
3.4	Durchführung der Alignments und ihre Auswertung.....	84
3.4.1	Konservierte und identische Reste.....	84
3.4.2	Positionen, welche von polaren Resten eingenommen werden können.....	84
3.4.3	Nicht identische Positionen bei eng verwandten Sequenzen.....	85
3.5	Länge der Loops zwischen den Transmembrandomänen.....	85
3.6	Biophysikalische und statistische Analysen zur relativen Orientierung der Helices von MalF und MalG.....	86
3.6.1	Einteilung der Aminosäuren in zwei Klassen.....	86
3.6.2	Unterscheidung von Transmembrandomänen bezüglich ihrer Hydrophobizität.....	86
3.6.3	Bewertung von Helixseiten durch das "Hydrophobe Moment".....	87
3.6.4	Bewertung von Helixseiten durch Mutabilität.....	88
3.6.5	Prolin im zentralen Bereich einer Transmembranhelix.....	89
3.7	Experimentelle Daten als Kriterium für die Anordnung der Helices.....	89
3.7.1	Mutanten des MalF-Proteins mit der Folge einer Instabilität <i>in vivo</i> oder einer erhöhten Proteasesensitivität.....	89
3.7.2	Mutanten mit der Folge eines konditionalen (Transport-) Defektes (Temperatursensitivität).....	90
3.7.3	Mutanten mit der Eigenschaft einer veränderten Substratspezifität.....	90
3.7.4	Clustering von Punktmutationen, die die Transportfunktion verändern.....	90
3.7.5	Suppressoranalyse von Mutanten in MalF.....	90
3.7.6	MBP-unabhängige Mutationen.....	90
3.8	Ergebnisse der Sequenzvergleiche.....	91

3.9	Identifizierung struktureller Eigenschaften der Transmembranhelices von MalF und MalG.....	91
3.10	Identifizierung homologer Charakteristika der Helices von MalF und MalG.....	99
3.11	Herleitung von Aufeinanderfolge und genereller Anordnung der Helices im MalF/MalG-Komplex.....	100
3.12	Die Erstellung des Arbeitsmodells.....	101
3.13	Die Form des Arbeitsmodells.....	103
3.14	Die 180°-Rotationsymmetrie.....	103

V. Diskussion..... 104-135

1. Mutationen der Transmembrandomänen 6 und 8 von MalF.....	105
1.1 Die Suche nach Mutanten mit reduziertem Maltosetransport.....	105
1.2 Phänotypen und Eigenschaften der isolierten MalF-Mutanten.....	106
1.2.1 Mutanten mit veränderter Substraterkennung: Verschiedene Kategorien von Substratphänotypen.....	106
1.2.2 Temperatursensitive Mutationen in MalF.....	108
1.2.3 Proteinase K-Sensitivität.....	109
1.3 Positionen von Substitutionen verschiedener Phänotypen in Helixdarstellungen von TM 6 und TM 8.....	111
1.3.1 Positionen von Substitutionen, die die Substratspezifität verändern.....	111
1.3.2 Positionen von Substitutionen, die Temperatursensitivität und Instabilität <i>in vivo</i> verursachen.....	112
1.4 Existenz einer Substratbindestelle für Maltose und Maltodextrin in den Cytoplasmamembranproteinen MalF/MalG?.....	117
2. Untersuchungen zur Membraninsertion von MalF-PhoA-Fusionsproteinen.....	120
2.1 Die Untersuchung der Membraninsertion von Transmembrandomäne 6.....	120
2.1.1 Die Stop-Transfer-Funktion von Transmembrandomäne 6.....	120
2.1.2 Die Exportfunktion von Transmembrandomäne 6.....	122
2.1.3 Ausblick: Weitere mögliche Untersuchungen zur Membraninsertion von TM 6.....	124
2.2 Ist die Hydrophobizität von Transmembrandomänen überdimensioniert?.....	125
2.3 Wie verhält sich eine veränderte Membraninsertion einer mutierten TM 6 im Kontext der vollständigen MalF-Sequenz?.....	125
2.4 Wie verhindert die Zelle den Export der C-terminalen Domäne eines polytopen Membranproteins?.....	127
3. Das Arbeitsmodell von MalF/MalG.....	129
3.1 Grundzüge der Herleitung des Arbeitsmodells von MalF/MalG.....	129
3.2 Das Arbeitsmodell ergibt neue Aspekte zur Funktion und Organisation des Transporters.....	131
3.3 Grenzen der Aussagefähigkeit des Arbeitsmodells von MalF/MalG.....	134
3.4 Ausblick: Das Arbeitsmodell von MalF/MalG bietet Ansatzpunkte für weiterführende Experimente.....	135

VI. Literatur..... 136-144

Abbildungen

Einleitung

Abbildung 1.	Proteinkomponenten des Maltosetransportsystems von <i>Escherichia coli</i>	4
Abbildung 2.	Topologiemodell von MalF.....	14

Material und Methoden

Abbildung 3.	Konstruktion von <i>malF-phoA</i> -Fusionen.....	36
--------------	--	----

Ergebnisse

Abbildung 4.	Position und wichtige Phänotypen der Punktmutationen im "helical wheel" von TM 6..	53
Abbildung 5.	Position und wichtige Phänotypen der Punktmutationen im "helical wheel" von TM 8..	54
Abbildung 6.	Proteinase K-Sensitivität von Wildtyp-MalF.....	57
Abbildung 7.	Proteinase K-Sensitivität der MalF-Punktmutanten von TM 6.....	59
Abbildung 8.	Proteinase K-Sensitivität der MalF-Punktmutanten von TM 8.....	60
Abbildung 9.	Proteinase K-Sensitivität der MalF-Doppelmutanten und der Dreifachmutation von TM 6.....	61
Abbildung 10.	Hydrophathie-Plots der Transmembrandomänen 6 und 8 von MalF.....	64
Abbildung 11.	Die Sequenz der Fusionsstelle der MalF-AP-Fusionsproteine.....	67
Abbildung 12.	Schema einer C-terminalen Deletionsfusion MalF-AP.....	68
Abbildung 13.	Westernblot der MalF-AP-Fusionen.....	69
Abbildung 14.	Die TM 6 von MalF-AP-Fusionen als Stop-Transfer-Signal.....	70
Abbildung 15.	Schema einer C-terminalen Deletionsfusion MalF III-AP.....	72
Abbildung 16.	Westernblot der MalF III-AP-Fusionen.....	73
Abbildung 17.	Die TM 6 von MalF III-AP-Fusionen als Exportsignal.....	75
Abbildung 18.	Prinzip der Selektion von Mutanten der MalF-AP-Fusion J, bei denen die AP im Cytoplasma vorliegt.....	77
Abbildung 19.	Deletionsderivate 1-11 von <i>malF-phoA</i> *J.....	78
Abbildung 20.	Hydrophathie-Plots von MalF, CymF und MalC.....	82
Abbildung 21.	Hydrophathie-Plots von MalG, CymG und MalD.....	82
Abbildung 22.	Multiples Sequenz Alignment der MalF-homologen Proteine.....	92
Abbildung 23.	Multiples Sequenz Alignment der MalG-homologen Proteine.....	94
Abbildung 24.	Charakteristika der "helical wheels" der Transmembrandomänen von MalF.....	95
Abbildung 25.	Charakteristika der "helical wheels" der Transmembrandomänen von MalG.....	96
Abbildung 26.	Arbeitsmodell MalF/MalG.....	102

Diskussion

Abbildung 27.	Positionen von Substitutionen in TM 6 und TM 8, die die Substratspezifität verändern und die an einer MBP-Unabhängigkeit beteiligt sind.....	112
Abbildung 28.	Substitutionen mit den Phänotypen Temperatursensitivität und Instabilität <i>in vivo</i> im "helical wheel" von TM 6.....	113
Abbildung 29.	Funktionsbereiche der 6. Helix von MalF.....	114
Abbildung 30.	Substitutionen mit den Phänotypen Temperatursensitivität und Instabilität <i>in vivo</i> im "helical wheel" von TM 8.....	115
Abbildung 31.	Funktionsbereiche der 8. Helix von MalF.....	116
Abbildung 32.	Hypothetische Auswirkungen von Mutationen in TM 6 auf die Topologie von MalF...126	

Tabellen

Material und Methoden

Tabelle 1:	<i>E. coli</i> -Stämme.....	22
Tabelle 2:	Plasmide.....	23
Tabelle 3:	Bakteriophagen.....	26
Tabelle 4:	Antibiotika und Medienzusätze.....	28

Ergebnisse

Tabelle 5:	Mutationen in der 6. Transmembrandomäne von MalF.....	41
Tabelle 6:	Mutationen in der 8. Transmembrandomäne von MalF.....	42
Tabelle 7:	Vergleich des Maltosetransports der Mutanten von TM 6 und TM 8.....	45
Tabelle 8:	Vergleichende Darstellung von Wachstumsverhalten, Transportaktivität und MalF-Expression der MalF-Mutanten der 6. Transmembrandomäne.....	50
Tabelle 9:	Vergleichende Darstellung von Wachstumsverhalten, Transportaktivität und MalF-Expression der MalF-Mutanten der 8. Transmembrandomäne.....	51
Tabelle 10:	MalF-Mutanten für die Konstruktion von MalF(III)-AP-Fusionen.....	66
Tabelle 11:	Aktivität der MalF-AP-Fusionen.....	68
Tabelle 12:	Aktivität der MalF III-PhoA-Fusionen.....	73
Tabelle 13:	Homologe Proteine zu MalF und MalG.....	81
Tabelle 14:	Asymmetrisch verteilte Merkmale der Helices von MalF und MalG.....	97
Tabelle 15:	Mittlere Hydrophobizität und Mutabilität der 18-Reste-Helices.....	98
Tabelle 16:	Hydrophobizitätsmomente und Mutabilitätsmomente der 18-Reste-Helices.....	98
Tabelle 17:	Loop-längen in MalF und MalG; minimale Loop-längen.....	101

I. Zusammenfassung

Das Maltose- und Maltodextrintransportsystem von *Escherichia coli* ist ein Mitglied der Bindeprotein-abhängigen ABC- (ATP-binding-cassette) Transportsysteme. Es transportiert Maltose und Maltooligosaccharide unter Energieverbrauch entgegen einem Konzentrationsgradienten ins Zellinnere. In dieser Arbeit wurde eine Proteinkomponente dieses Transportsystems untersucht, das polytope integrale Cytoplasmamembranprotein MalF. Transmembrandomänen von MalF wurden durch genetische und biochemische Experimente auf ihre funktionelle und strukturelle Rolle für das Protein selbst und für den in der Cytoplasmamembran integrierten Transporterkomplex MalFGK₂ untersucht.

Die C-terminalen Transmembrandomänen 6 und 8 von MalF wurden einer systematischen Mutationsanalyse unterzogen. Es konnten Punkt- und Mehrfachmutationen isoliert werden, die verschiedene Phänotypen auslösen: Mal⁺Dex⁻, Mal⁻Dex⁻, Temperatursensitivität, Instabilität *in vivo* und - am Maltosetransportsystem bisher unbekannt - Mal⁻Dex⁺ und Dex^{dom-}. Die Mutanten wurden durch die Messung des spezifischen Maltosetransports, Wachstum auf Maltose und Maltoheptaose genauer charakterisiert. Durch Proteasetests von MalF (im MalFGK₂-Komplex) wurden Punkt- und Mehrfachmutanten auf Konformationsänderungen hin untersucht. Dabei zeigten sich beträchtliche individuelle Unterschiede zwischen den Mutanten.

Die drei Aminosäuren, deren Mutation einen Mal⁻Dex⁺-Phänotyp auslöst, liegen im mutmaßlichen Zentrum der Transmembrandomäne 6 und an einer Seite im "helical wheel". Sie sind möglicherweise an der Erkennung von Maltose beteiligt und damit Bestandteil einer putativen Substraterkennungsstelle.

In Transmembrandomäne 8 wurden zumeist Mutationen identifiziert, die im Vergleich zum Wachstum auf Maltose zu einem reduzierten Wachstum auf Dextrin führen. Sie befinden sich gehäuft im mittleren Bereich der Helix. Ob die betreffenden Aminosäuren an einer Substraterkennung beteiligt sind oder ob vorliegende Konformationsänderungen von MalF oder dem MalFGK₂-Komplex zu dem Phänotyp führen, ist noch offen.

Die Veränderung der Membraninsertion von Derivaten der Transmembrandomäne 6 wurde über die Konstruktion von MalF-PhoA-Fusionen untersucht. In diesen polytopen Membranproteinen wurde die Transmembrandomäne 6 als C-terminales Stop-Transfer-Signal und, mittels einer Topologieinversion, auch als Exportsignal untersucht.

Die Funktion als Stop-Transfer-Signal ist bis zu einer Hydrophobizität von -35 kcal/mol gegeben und wird durch N-terminal positionierte positive Reste, die zu niedrigerer Hydrophobizität führen, abgeschwächt. Die Reduktion der Funktion geschieht graduell mit fortschreitender Abnahme der Hydrophobizität des Stop-Transfer-Signals.

Das Exportsignal der Transmembrandomäne 6 wird durch die untersuchten Punktmutationen geladener Aminosäuren nicht in seiner Funktion beeinträchtigt. Mit der niedrigsten erreichten Hydrophobizität von -25,2 kcal/mol ist die Exportfunktion nicht reduziert. Im Gegenteil: Ein positiver Rest am N-Terminus erhöht die Exportfunktion um das 1,5-fache und ein Paar gegensätzlich geladener Aminosäuren, ebenfalls am N-Terminus, um das 3-fache. Die Steigerung der Exporteffizienz durch positiv geladene Reste, die bei abspaltbaren Signalsequenzen bekannt ist, ist folglich auch bei einem internen Exportsignal am C-Terminus eines polytopen Membranproteins möglich.

Eine Studie *in vivo* zu den Bedingungen der Translokation einer großen C-terminalen Domäne in dem Fusionsprotein MalF-PhoA*J, zeigte, daß die N-terminale Transmembrandomäne, eine interne Exportsequenz, für die Translokation entscheidend ist.

Für den MalF/MalG-Transmembrankomplex wurde ein Arbeitsmodell entwickelt. Der Beitrag der Transmembrandomänen beider Proteine zu Funktion und Struktur des Maltosetransporters steht in diesem Modell im Mittelpunkt. Das Modell beschreibt jede Helix im Komplex durch die relative Position ihres Helixzentrums zu dem der anderen Helices, ihre Orientierung durch Rotation um die zentrale Helixachse im Verhältnis zu der anderer Helices und die Lage ihrer zentralen Helixlängsachse relativ zum seitlichen Lipid. Die Positionen der in dieser Arbeit charakterisierten Punktmutationen wurden entsprechend der Interpretation ihrer Phänotypen in den Kontext des Transporters eingeordnet und damit plausibel erklärt. Darüber hinaus ist das Arbeitsmodell in der Lage, die bis jetzt bekannten experimentellen Daten zur Funktion von MalF und MalG zu deuten und zusammenfassend darzustellen.

II. Einleitung

1. Das integrale Cytoplasmamembranprotein MalF als Bestandteil des Maltoseregulons und des Maltose- und Maltodextrintransporters von *Escherichia coli*

1.1 Das Maltoseregulon

Die strukturellen Gene des Maltoseregulons von *Escherichia coli* sind auf drei Operons und zwei weitere Stellen im Chromosom verteilt. Eines der drei Operons liegt in der *malA*-Region bei 75 min im Chromosom und umfaßt die Gene *malQ*, *malP* und *malT*. Die ersten beiden Gene werden im Gegenuhrzeigersinn transkribiert, *malT* im Uhrzeigersinn. Die beiden anderen divergenten Operons, das *malEFG*-Operon und das Operon mit *malK*, *lamB*, und *malM* liegen in der *malB*-Region bei 91 min (Hofnung, 1974) und umfassen die Gene für das Transportsystem von Maltose und Maltodextrin. Gegen den Uhrzeigersinn transkribiert wird das *malEFG*-Operon, mit dem Uhrzeigersinn *malK*, *lamB* und *malM* (Silhavy *et al.*, 1979).

Die Transkription der drei Operons wird durch Maltose induziert und über das Produkt des positiven Regulatorgens *malT*, einem Transkriptionsaktivator, vermittelt (Hofnung & Schwartz, 1971; Schwartz, 1967). MalT existiert in der Zelle in zwei Konformationen (Raibaud *et al.*, 1989), von denen die transkriptionsaktivierende Form durch die Bindung von Maltotriose an die inaktive Form von MalT entsteht (Raibaud & Richet, 1987).

In Anwesenheit von Glucose kann das Regulon aufgrund einer Katabolitrepression nicht induziert werden. Die MalT-Transkription wird durch den CAP-cAMP-Komplex kontrolliert (Chapon, 1982; Débarbouillé & Schwartz, 1979).

Von MalT werden noch weitere Gene kontrolliert, und zwar *malS* bei 80 min und *malZ* bei 9,3 min.

Die Funktionen der Genprodukte sind, soweit bekannt, die folgenden:

Die Funktionen der drei cytoplasmatischen Enzyme MalQ, MalP und MalZ und des periplasmatischen MalS sind Synthese und Abbau von Dextrinen. MalQ ist eine Amylomaltase, MG 70 kDa, die Glucose freisetzt und Amylose synthetisiert (Monod & Torrinai, 1950). Dabei werden Dextrinylreste auf andere Dextrine übertragen (Palmer *et al.*, 1976). MalP, eine Maltodextrin Phosphorylase, 90,3 kDa, baut als Dimer Dextrine ab, wobei Glucose-1-Phosphat entsteht (Schwartz & Hofnung, 1967). MalZ, mit dem MG 68,9 kDa, ist eine Maltodextrin-Glucosidase. Dieses Enzym baut Dextrine zwischen drei und sieben Glucoseeinheiten zu Maltose und Glucose ab (Tapio *et al.*, 1991). MalS, mit signifikanter Homologie zu MalZ, ist eine α -Amylase, die langkettige und zyklische Dextrine abbaut. Das Hauptprodukt ist dabei Maltohexaose (Schneider *et al.*, 1992).

Die Genprodukte des *malEFG*-Operons, und von *malK*, *lamB* und *malM* sind bis auf die Ausnahme von MalM Komponenten des Transportsystems, welches die Akkumulation von Maltose und Dextrinen im Cytoplasma durch unidirektionalen Transport bewältigt. Dieses Transportsystem wird im nächsten Abschnitt näher beschrieben. MalM ist ein periplasmatisches Protein, von dem man nur weiß, daß es für den Maltosetransport scheinbar nicht essentiell ist.

1.2 Das Maltose- und Maltodextrintransportsystem von *Escherichia coli*

Das Maltosetransportsystem von *E. coli* ist ein Mitglied der Bindeprotein-abhängigen (BPD) ABC-Transportsysteme (Hyde *et al.*, 1990), die zu der Superfamilie der ABC-Transporter gehört (Saier, 1994). ABC (ATP-bindig-cassette)-Transporter schaffen Substrat ohne chemische Veränderung über die Cytoplasmamembran, wobei Energie durch ATP-Hydrolyse verbraucht wird.

Das Maltosetransportsystem von *E. coli* gestattet die spezifische Akkumulation von Maltose und Maltooligosaccharide (-1->4 verknüpfte D-Glucoseoligomere), die auch Maltodextrine oder Dextrine genannt werden, bis zur Größe von Maltoheptaose (Ferenci, 1980). Dies kann gegen einen beträchtlichen Konzentrationsgradienten geschehen. Bei einer äußeren Konzentration von 1 μM Maltose wird innerhalb von zwei Minuten mehr als 10 mM Maltose im Zellinneren akkumuliert, was einem Gradienten zwischen einer Zelle und dem Externen Medium von ca. 1:10⁵ entspricht (Szmelcman *et al.*, 1976).

Der Maltosetransportprozeß an sich erfordert fünf Proteinkomponenten: LamB, MalE (MBP), MalF, MalG und MalK-Proteine; sie sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

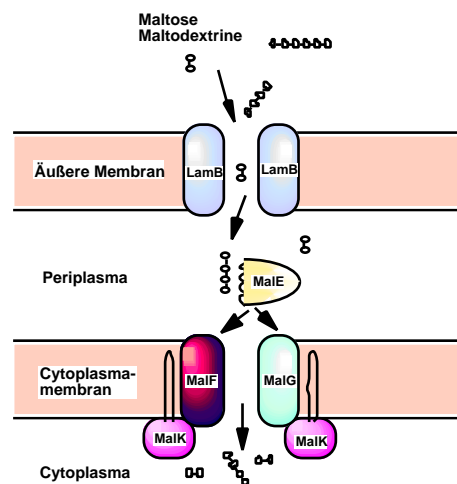


Abbildung 1. Proteinkomponenten des Maltosetransportsystems von *Escherichia coli*

Dargestellt ist ein schematischer Querschnitt durch die Zellhülle des Bakteriums mit den Proteinen, die am Maltose/Maltodextrintransport beteiligt sind. Die Proteine und ihre Funktionen im Transportsystem sind im Text erläutert.

Maltoporin (LamB), das außerdem als β -Rezeptor fungiert, ist aus drei Untereinheiten zusammengesetzt und bildet drei wassergefüllte Kanäle durch die äußere Membran (Neuhaus *et al.*, 1983), durch welche erleichterte Diffusion von Maltose bei externen Konzentrationen unterhalb von 100 μM und von Dextrinen größer als Maltoetraose bei allen Konzentrationen stattfindet (Szmelcman & Hofnung, 1975; Szmelcman *et al.*, 1976). Für die Zuckerbindestelle von LamB wurde eine Dissoziationskonstante von ca. 0,1 mM festgestellt (Benz *et al.*, 1986; Freundlieb *et al.*, 1988). Bei einer externen Konzentration von 1 μM Maltose ist die Diffusion von Maltose bis Maltopentaose durch LamB der die Geschwindigkeit bestimmende Schritt des Gesamttransportes (Wandersman & Schwartz, 1982). Im Periplasma wird Maltose/Dextrin durch das Maltosebindeprotein (MBP; MalE) mit hoher Affinität (K_D von 1 μM) gebunden (Ferenci *et al.*, 1986; Kellermann & Szmelcman, 1974). Eine mögliche Rückdiffusion durch die äußere Membran wird dadurch

verhindert. Das MBP transferiert das gebundene Substrat an die integralen Cytoplasmamembranproteine MalF und MalG. Diese Proteine bilden mit MalK einen heterotetrameren Transportkomplex aus: die Stöchiometrie wurde bestimmt mit einem MalF, einem MalG und zwei MalK Proteinen (MalFGK₂) (Davidson & Nikaido, 1990). MalK ist möglicherweise partiell in die Membran integriert, wenn es im Komplex vorliegt (Schneider *et al.*, 1995). Dieses Protein enthält Walker A und B Sequenzen, Mononukleotid-Bindemotive für ATP (Walker *et al.*, 1982). Der gereinigte und in Proteoliposomen rekonstituierte MalFGK₂-Komplex katalysiert ATP-abhängigen Transport (Davidson & Nikaido, 1991). Somit energetisiert MalK das Transportsystem (Walter *et al.*, 1992). Maltose und Dextrin gelangen damit durch einen aktiven Transportprozeß ins Cytoplasma.

2. Integrale Membranproteine: Membraninsertion, Topologie, Struktur und Funktion mit dem Beispiel MalF

Der Ablauf von der Membraninsertion eines integralen Cytoplasmamembranproteins in *Escherichia coli* bis zur Erreichung der Tertiär- oder Quartärstruktur (Assembly), soll hier im Überblick nachgezeichnet werden. Die bis jetzt bekannten Daten von MalF werden hierzu beschrieben.

Bei dem Insertionsprozeß eines Membranproteins entscheidet sich, wie viele Transmembrandomänen (TMs) ausgebildet werden, in welcher Orientierung sie die Membran durchqueren und welche Transmembranabschnitte sich daraufhin zusammenlagern. Nach der Insertion sind Änderungen in der Orientierung einzelner TMs ("flip-flop") oder des ganzen Proteins aus energetischen Gründen unwahrscheinlich. Sie wurden experimentell auch noch nicht beobachtet. Somit ist für ein polytopes Membranprotein, bei welchem der Großteil seiner Sequenz in der Membran eingelagert vorliegt, der Insertionsprozeß der wichtigste Schritt für die Zusammenlagerung einzelner Domänen und Untereinheiten zum funktionellen Protein.

Die Initiationsphase des "Assembly" kann mit der Beteiligung des zellulären Sec-Translokationsapparates erfolgen, der den Export von Proteinen ins Periplasma vermittelt, der aber auch an der Translokation periplasmatischer Domänen integraler Membranproteine beteiligt sein kann. Als Alternative ist auch die Sec-unabhängige Membraninsertion bekannt. Abgesehen von einer Sec-abhängigen oder Sec-unabhängigen Insertion steuern topogene Signale des Proteins die Insertion und legen die Topologie fest. Die Signalsequenz initiiert eine Insertion bzw. Translokation. Transmembrandomänen als interne Exportsequenzen bestimmen den Export C-terminaler hydrophiler Domänen oder vermitteln als Stop-Transfer-Sequenzen die Verankerung in der Membran. Nach Insertion, Verankerung und Anordnung der verschiedenen Proteindomänen relativ zur Membran, die im Ausbilden der Tertiärstruktur endet, kann abschließend durch Oligomerisierung eine Quartärstruktur zum funktionellen Homo- oder Heteromer ausgebildet werden.

2.1 Klassifizierung von Membranproteinen und Transmembrandomänen

Während oder kurz nach ihrer Synthese werden integrale Membranproteine asymmetrisch in die Membran integriert. Wesentlich verantwortlich dafür sind bestimmte Aminosäureabschnitte in der Polypeptidkette, sogenannte "topogene Sequenzen", zu denen die Transmembrandomänen (TM) gezählt werden.

In einer generellen Hypothese zur "intrazellulären Proteintopogenese" (Blobel, 1980) wurde eine Terminologie für Membranproteine und Transmembrandomänen (TMs) vorgestellt. Membranproteine können danach als monotop (periphere Membranproteine ohne TM), bitop (eine TM), und polytop (mindestens zwei TMs) klassifiziert werden. Später wurde diese Einteilung durch oligotope Membranproteine erweitert (Wickner & Lodish, 1985), die zwei TMs besitzen, bei denen N- und C-Terminus sich auf der gleichen Membranseite befinden.

Bitope Proteine können in die Typen Ia, Ib und II eingeteilt werden (Pugsley, 1993).

Der Typ Ia inseriert mit Hilfe einer 'typischen' Signalsequenz (siehe folgender Absatz) in die Membran. Die Insertion bzw. Translokation wird durch ein Stop-Transfer-Segment (siehe folgender Absatz) unterbrochen, welches das Protein dauerhaft in der Membran verankert. Die Signalsequenz wird abgespalten. Die resultierende Orientierung der Topologie ist $N_{\text{out}}C_{\text{in}}$. Ein Beispiel dieses Membranproteintyps ist M13 procoat.

Der Membranproteintyp Ib ist selten. Er hat keine abspaltbare Signalsequenz, dafür eine reverse Signalsequenz, bei der positive Ladungen nicht N-terminal sondern C-terminal an der TM vorliegen. Die entstehende Topologie ist $N_{\text{out}}C_{\text{in}}$, analog zum Typ Ia. Man kann beispielsweise die Leader Peptidase (LepB) als ein Hybridprotein sehen, das aus den Typen Ib und II besteht.

Der Membranproteintyp II besitzt ein ungeschnittenes Signalpeptid, welches das Protein in der Orientierung $N_{\text{in}}C_{\text{out}}$ in der Membran verankert. Ein Protein diesen Typs kann als periplasmatisches Protein betrachtet werden, das nicht von der Membran abgelöst wurde. Polytope Proteine durchspannen die Membran mehrmals. Sie können gedacht werden als Konstrukte aus einem Signalpeptid oder einem reversen Signalpeptid mit einer alternierenden Abfolge von Stop-Transfer-Sequenzen und ungeschnittenen Signalsequenzen.

Transmembrandomänen können abhängig von ihrer Funktion allgemein in fünf Gruppen eingeteilt werden (Dalbey, 1990): 1. N-terminale Signalsequenzen ($N_{\text{in}}C_{\text{out}}$) (Michaelis & Beckwith, 1982; von Heijne, 1990a), die für das Targeting, die Insertion und C-terminale Translokation über die Membran hinweg notwendig sind und von einer Leader Peptidase abgeschnitten werden. 2. Signalhalt-Sequenzen ($N_{\text{out}}C_{\text{in}}$) (Lee *et al.*, 1992; von Heijne & Gavel, 1988), die gegenüber den viel häufiger verbreiteten Signalsequenzen in umgekehrter Orientierung und unabhängig von einem Translokationsapparat in die Membran inserieren. 3. Ungeschnittene Signalsequenzen oder Exportsequenzen ($N_{\text{in}}C_{\text{out}}$) (Zhu & Dalbey, 1989), die am N-Terminus oder intern im Membranprotein vorliegen. Sie initiieren ebenfalls C-terminale Translokation, verbleiben aber im Protein als "Transmembrananker". 4. Stop-Transfer-Sequenzen ($N_{\text{out}}C_{\text{in}}$) (Davis & Model, 1985). Sie beenden die Translokation über die Membran hinweg, die durch eine Signalsequenz oder ungeschnittene Signalsequenz initiiert wurde und verbleiben als Membranankerdomäne im Protein. 5. Insertionsdomänen (Kuhn *et al.*, 1986), die zwei TMs besitzen ($N_{\text{in}}C_{\text{in}}$) und die spontan und ohne Hilfe durch andere Proteine in die Membran inserieren.

2.2 Modelle der Membraninsertion integraler Membranproteine

In den siebziger Jahre wurden erste grundlegende Hypothesen zur Membraninsertion und Translokation konzipiert. Die Signalthypothese (Blobel & Dobberstein, 1975; Milstein *et al.*, 1972) wurde für sekretierte Proteine formuliert und später auf integrale Membranproteine adaptiert (Rothman & Lenard, 1977). Nach dieser Hypothese bindet eine N-terminale Signalsequenz an einen membrangebundenen Rezeptor und wird von einem Peptid-Transportsystem erkannt. Das Protein wird durch die Energie einer cotranslationalen

Proteinsynthese durch eine damals noch nicht identifizierte Proteinpore durch die Membran geschoben. Eine hydrophobe Sequenz stoppt diesen Vorgang und geht in die Membran über. Die Installation einer hydrophoben Sequenz endet immer mit der Orientierung $N_{out}C_{in}$. Eine Erklärung für die Insertion polytooper Membranproteine konnte dieser Mechanismus nicht geben. Diesem "Bedarf" Rechnung getragen hat die 'Membran-Trigger'-Hypothese (Wickner, 1979). Sie nimmt keine cotranslationale Katalyse eines Proteinapparates für Insertion und Translokation an. Die Signalsequenz erleichtert die Faltung hydrophober Proteinabschnitte im wässrigen Milieu. Die Insertion des integralen Membranproteins geschieht durch dessen Erkennung von Membranproteinen, Lipiden oder den besonderen physikalischen Eigenschaften der Lipidphase. Treibende Kraft für die Insertion ist die Thermodynamik hydrophober Aminosäureabschnitte, deren Konformationsänderung durch den Membrankontakt beim Übergang von der wässrigen Phase in die Membran ausgelöst ("getriggert") wird. Die Information einer asymmetrischen Proteineinlagerung in die Membran liegt in der Sequenz und Struktur des Proteins selbst.

Ein detaillierterer Vorgang der Membraninsertion wird in der 'Loop'-Hypothese (Inouye & Halegoua, 1980) vorgeschlagen. Für die Initiation der Insertion wird demnach ein Loop ausgebildet, der die hydrophobe Region des Signalpeptides und angrenzende zwanzig Aminosäurereste umfaßt. Nach diesem Modell könnten positiv geladene Reste den N-Terminus einer Signalsequenz durch elektrostatische Interaktionen mit den sauren Kopfgruppen der Phospholipide an der cytoplasmatischen Membranoberfläche verankern. Für diesen Teilvorgang der Insertion gibt es aktuelle, experimentell gewonnene Anhaltspunkte mit pro-OmpA. An der Loopausbildung ist vermutlich SecA beteiligt und möglicherweise die selbständige Bindung von Teilen des Präproteins an die Membranoberfläche. Die Translokation selbst ist hier mit dem Sec-Apparat gekoppelt (Kuhn *et al.*, 1994).

Energetische Berechnungen waren die Grundlage der heute noch relevanten 'Helical hairpin'-Hypothese (Engelman & Steitz, 1981; von Heijne & Blomberg, 1979). Nach ihr falten sich während der Translokation 40-50 Aminosäuren, eine Mindestanzahl für stabile Peptide (Janin *et al.*, 1978), in wässriger Lösung zu zwei gegenläufigen Helices, stabilisiert durch hydrophobe Wechselwirkungen und dem Dipolmoment der Helices. Für die Membraninsertion entscheidend ist die helicale Konformation, da sie die einzige Konformation ist, die eine vollständige interne Sättigung von H-Brücken der Aminosäureseitenketten im hydrophoben Lipid gewährleistet. Die 'helical hairpin' inseriert spontan aufgrund hydrophober Interaktionen mit dem Lipid in die Membran. Ist die zweite Helix polar, wird die Translokation dieser Sequenz eingeleitet. Wenn eine hydrophobe Signalsequenz vorhanden ist, ist sie Teil der 'hairpin'. Die 'helical hairpin'-Hypothese kann die Insertion monotoper, bitoper und polytooper Membranproteine erklären. Dieser Insertionsmechanismus könnte auch Bestandteil einer Insertion mit Hilfe eines Translokationsapparates sein. Das Membranpotential könnte diese Insertion zusätzlich fördern.

2.3 Membraninsertion durch den Sec-Translokationsapparat

Das Sec-System vermittelt den Export von Proteinen aus dem Cytoplasma zu drei verschiedenen Kompartimenten der Zellhülle: in die äußere Membran, in das Periplasma und in die Cytoplasmamembran. Das Sec-Translokationssystem erkennt die zu transportierenden Proteine, dirigiert sie zur Membran hin und bewerkstelligt die Membraninsertion bzw. Translokation.

Integrale Cytoplasmamembranproteine besitzen oft große periplasmatische Domänen, die in das Periplasma transloziert werden müssen. N-terminale und interne Signalsequenzen werden nicht abgespalten sondern verbleiben als Transmembrandomänen des Proteins. Ob die Mehrheit oder vielleicht fast alle dieser Proteine das Sec-System für die Insertion und Translation ihrer Domänen tatsächlich benötigt, ist noch nicht geklärt.

Das Sec-Translokationssystem besteht aus dem cytoplasmatischen Chaperon SecB, dem ATP-bindenden und die Insertion vermittelnden SecA und den integralen Cytoplasmamembranproteinen SecY,E,G, die eine Art 'Translokase' ausbilden. Zwei zusätzliche integrale Membranproteine, SecD und SecF, erleichtern die Translokation in einem späten Stadium des Gesamtvorgangs.

Der hypothetische Membraninsertions- bzw. Translokationsvorgang läßt sich in vier Schritten beschreiben:

Schritt 1. Das homotetramere SecB (Watanabe & Blobel, 1989) bindet das (Prä-) Protein an einer Stelle C-terminal der Signalsequenz beim Entstehen am Ribosom (Gannon & Kumamoto, 1988) und verhindert so eine zu frühe Faltung und Aggregation durch hydrophobe Interaktionen (Lecker *et al.*, 1990). Dieser Komplex wird durch SecA gebunden. SecB erkennt vermutlich das C-terminale Ende von SecA (Breukink *et al.*, 1995); SecA erkennt und bindet an die Signalsequenz (Akita *et al.*, 1990) und an 'reife' Teile des Präproteins (Akita *et al.*, 1991). SecA besitzt zwei essentielle Nukleotid-Bindestellen (Matsuyama *et al.*, 1990). Die Bindung von ATP bewirkt die Insertion des N-Terminus von SecA in die Translokase-Untereinheiten in der Membran (Breukink *et al.*, 1992; Cabelli *et al.*, 1991; Economou & Wickner, 1994), wobei SecB abgelöst wird.

Schritt 2. Die Translokase der Untereinheiten SecY, SecE und SecG, ein Heterotrimer (Brundage *et al.*, 1992), öffnet durch die Insertion von SecA vermutlich eine Art "Translokationskanal". SecY und SecE interagieren wahrscheinlich (Flower *et al.*, 1995) und sind zusammen mit SecY möglicherweise an einem "proofreading" der Signalsequenz beteiligt, eine Annahme, die durch sogenannte *prl*-Mutationen (Flower *et al.*, 1994) gestützt wird.

Schritt 3. Die aufeinanderfolgende Hydrolyse von ATP an den beiden Nukleotid-Bindestellen von SecA ändert die Konformation dieses Proteins, so daß SecA die Bindung vom Präprotein löst und sich aus der Membran zurückzieht (Breukink *et al.*, 1992).

Bei diesem Insertionsvorgang von SecA werden möglicherweise zwanzig bis dreißig Aminosäuren des Präproteins in die Membran hineinbewegt bzw. durchgeschleust (Arkowitz *et al.*, 1993; Schiebel *et al.*, 1991).

Schritt 4. Das Membranpotential könnte einen wichtigen Beitrag zur Fertigstellung der Translokation leisten, während gleichzeitig SecA die Translokation an demselben Protein unter erneuter Bindung von ATP fortsetzt (Schiebel *et al.*, 1991). SecD und SecF werden anscheinend für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials benötigt und würden damit indirekt die Translokation erleichtern (Arkowitz & Wickner, 1994).

Beispiele für die Sec-Abhängigkeit von Cytoplasmamembranproteinen sind die Leader Peptidase (LepB) (Wolfe *et al.*, 1985), das Chemotaxis-Rezeptorprotein Tsr (Gebert *et al.*, 1988) und MalF (Traxler & Murphy, 1996). Hingegen benötigen beispielsweise die Cytoplasmamembranproteine M13 procoat (Geller & Wickner, 1985; Wolfe *et al.*, 1985), das Pf3 coat-Protein (Wickner *et al.*, 1991) und ProW (Whitley *et al.*, 1994) für ihre Membraninsertion offenbar kein Sec-System. Eine Schwierigkeit bei der Untersuchung der Membraninsertion von Cytoplasmamembranproteinen durch den Sec-Apparat ist die, daß die Sec-Abhängigkeit nicht in *secA*- *secE*- oder *secY*-Nullmutanten analysiert werden kann, weil diese Gene essentiell sind (Schatz & Beckwith, 1990). In den zum Teil verwendeten Untersuchungssystemen mit konditionalen Sec-Mutanten bleibt vermutlich eine "Restfunktion" des Sec-Apparates bestehen, über die immer noch eine reduzierte, schwer zu quantifizierende Membraninsertion stattfinden kann. Es ist auch möglich, daß hydrophobe Cytoplasmamembranproteine eine größere Affinität für den Translokationsapparat besitzen, als vollständig sekretierte Proteine. Damit wären diese Proteine durch eine (experimentelle) Limitierung des Sec-Apparates weniger betroffen als sekretierte Proteine.

Die Membraninsertion von MalF ist von der Funktion des Sec-Translokationsapparats bzw. zumindest Teilen davon abhängig.

Zunächst wiesen die Befunde von McGovern *et al.* auf eine Sec-unabhängige Membraninsertion hin. Weder eine SecA- noch eine SecD-Abhängigkeit konnte festgestellt werden (McGovern & Beckwith, 1991). Jeweils ungefähr gleiche Mengen von proteasesensitivem, pulsmarkiertem MalF (ca. 50%) waren zu finden bei Zellen, deren SecA durch Na-Azid spezifisch gehemmt wurde, bei einer SecD-Mutante und auch bei unbehandelten Zellen. Neuere Versuche konnten aber zeigen, daß die pulsmarkierte, nicht proteasesensitive MalF-Menge nach einem 'chase' in Na-Azid behandelten Zellen abnimmt und in unbehandelten Zellen die proteaseresistente MalF-Menge im Verlaufe des 'chase' zunimmt. Somit ist die Membraninsertion von MalF von der Funktion des SecA abhängig. Das Ausmaß dieser Abhängigkeit scheint jedoch nicht so groß zu sein, wie diejenige von SecE. Die mit einem SecE-"Verdünnungsstamm" ausgeführten Experimente zeigen stark ansteigende, nicht in die Membran inserierte MalF-Mengen im Zeitverlauf nach dem Stop der SecE-Expression (Traxler & Murphy, 1996).

Bereits vorher wurde vermutet, daß große periplasmatische Domänen ab ca. 55 Aminosäuren bei einer effizienten Translokation auf den Sec-Apparat angewiesen sind. Zwischen der zunehmenden Länge einer zu translozierenden, periplasmatischen Domäne und der Sec-Abhängigkeit scheint ein linearer Zusammenhang zu bestehen (Andersson & von Heijne, 1993b). In MalF gibt es eine periplasmatische Domäne, die diese Bedingungen erfüllt. Es ist die zweite, "große" periplasmatische Domäne mit rund 180 Aminosäuren. Sääf *et al.* konnten zeigen, daß eine SecA-Abhängigkeit der zweiten periplasmatischen Domäne von MalF vorhanden ist, aber im Vergleich zu beispielsweise pro-OmpA relativ niedrig ist. Außerdem reduziert die native Proteinumgebung von MalF die SecA-Abhängigkeit der zweiten periplasmatischen Domäne (Sääf *et al.*, 1995).

Die Abhängigkeit von SecA, SecE, SecD und SecF verschiedener C-terminaler Deletionsfusionen von MalF mit dem Biotinylierungsmotiv PSBT konnte kürzlich gezeigt werden. Die Abhängigkeit von SecD und SecF erwies sich dabei als nicht so stark wie die von SecA und SecB (Jander *et al.*, 1996).

Die Sec-Abhängigkeit stellt sich bei den durchgeführten Experimenten nicht als ein "Alles-oder-Nichts"-Phänomen dar, sondern ist graduell abgestuft und auch von Protein zu Protein verschieden. Beispielsweise scheint bei dem zu exportierenden MBP im Gegensatz zu MalF die SecA-Abhängigkeit viel stärker zu sein als die SecE-Abhängigkeit (Traxler & Murphy, 1996). Die unterschiedlich starke Abhängigkeit von Sec-Mutanten ergibt sich durch verschiedenartige konditionale Sec-Mutanten, ihrer Reduktion bzw. Hemmung im Testsystem oder von ihrer tatsächlichen Bedeutung im Translokationsapparat.

2.4 Sequenzdeterminanten von Membraninsertion und Membrantopologie

Als wichtigste Signale, die die Topologie eines Membranproteins festlegen, gelten Transmembrandomänen (siehe unter 1.). Die Sequenz dieser Domänen enthält aber an sich keine Information, die ihre Orientierung in der Membran bestimmt (Popot *et al.*, 1992). Erste Hinweise auf topologische Determinanten konnten aus statistischen Analysen polarer Enden und hydrophiler Loops bitoper und oligotoper Membranproteine gewonnen werden. So kommen bei bakteriellen Cytoplasmamembranproteinen die positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin in den cytoplasmatischen Loops vier mal häufiger vor als in den periplasmatischen Loops (von Heijne, 1986a; von Heijne, 1986b). Ein durchschnittlich höherer Gehalt an positiv geladenen Resten in cytoplasmatischen Loops wurde auch bei eukaryotischen Plasmamembranproteinen (Hartmann *et al.*, 1989; von Heijne, 1988) und Thylakoidmembranproteinen festgestellt (Gavel *et al.*, 1991), was zur Formulierung der 'positive inside' Regel (von Heijne, 1988) führte.

Die positiven Ladungen in cytoplasmatischen Domänen sind offensichtlich schlecht zu translozieren, schlechter als negative Ladungen. Dies impliziert, daß nicht primär die Nettoladung oder einfach die Gesamtzahl aller Ladungen einer (cytoplasmatischen) Domäne, sondern die Anzahl der positiven Ladungen und im Extremfall auch die von zahlreichen negativen Ladungen die Translokation beeinflussen (Nilsson & von Heijne, 1990). Am Beispiel von MalF konnte gezeigt werden, daß die Stärke der cytoplasmatischen Domänen als 'topogenes Signal' direkt mit der Dichte (Anzahl positiver Ladungen pro Aminosäuren in der Domäne) der positiven Ladungen darin korreliert, und daß bei der Konkurrenz ähnlich starker topogener Signale vermutlich die höhere Nettoladung zusammen mit der höheren Dichte und möglicherweise Arginin gegenüber Lysin dominiert (McGovern *et al.*, 1991).

Eine einfache Erklärung für die starke Wirkung einer positiven Ladung ist außer der energetisch aufwendigen Neutralisation, die auch bei negativen Ladungen ansteht, die Bindung an die negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide an der Membranoberfläche (Flewelling & Hubbell, 1986).

Die Verankerung von TMs ist deshalb am stabilsten, wenn sie unmittelbar von positiven Ladungen eingefaßt ist. Je weiter eine positive Ladung von einem Ende einer TM entfernt ist, desto mehr nimmt die Stärke ihrer verankernden Wirkung ab (von Heijne, 1989). Experimentell wurde beispielsweise gezeigt, daß cytoplasmatische positive Reste N-terminale Stop-Transfer-Signale in der Membran verankern und ihre Insertionseffizienz steigern (Boyd & Beckwith, 1989; Traxler *et al.*, 1992).

Die negativ geladenen Aminosäuren Aspartat und Glutamat scheinen keine grundlegend wichtige Bedeutung für die Topologie zu besitzen. Sie kommen statistisch gleich häufig in translozierten und nicht translozierten Membransegmenten vor (von Heijne, 1986a; von Heijne & Gavel, 1988). Wenn negative Reste aber in passender Position neben einer positiven Aminosäure liegen, kann der Effekt der positiven Aminosäure "neutralisiert" werden (Andersson & von Heijne, 1993a). Eine größere Anzahl negativer Ladungen kann jedoch auch die Topologie beeinflussen. Ein Cluster von sechs Glutamat-Resten direkt C-terminal einer Signalsequenz kann beispielsweise die Translokationsrate senken (Laws & Dalbey, 1989). Ein Cluster von vier Aspartat-Resten ändert die Topologie eines Leader Peptidase-Derivates zu einem gewissen Prozentsatz (Nilsson & von Heijne, 1990). Außerdem können zahlreiche (12) negative Ladungen (bei vorhandenen drei positiven Ladungen) mit Hilfe des Membranpotentials die Translokation eines 100 Reste langen hydrophilen N-Terminus von ProW, einem Cytoplasmamembranprotein, bewirken (Whitley *et al.*, 1995; Whitley *et al.*, 1994).

Als physikalische Grundlagen der Effekte geladener Reste wurden verschiedene Erklärungen vorgeschlagen: Positiv geladene Reste, die an eine Transmembrandomäne angrenzen, interagieren möglicherweise mit Komponenten der Sec-Translokationsmaschine (Akita *et al.*, 1990; Puziss *et al.*, 1992). Positive Reste direkt N-terminal einer Signalsequenz an Positionen von bis zu +20 können die Translokation blockieren, während negativ geladene Aminosäuren den Transportprozeß nicht oder nur wenig hemmen (Kuhn *et al.*, 1994).

Positive Reste könnten an die negativ geladenen Köpfe der Phospholipide der cytoplasmatischen Membranoberfläche binden (Gallusser & Kuhn, 1990). Dies erschwert ihre Translokation erheblich, vermittelt ihnen aber gleichzeitig die Funktion als "Ankerelemente" innerhalb cytoplasmatischer Domänen, die ihrerseits Transmembrandomänen verbinden und stabilisieren. Man nimmt an, daß auf diese Weise auch die Effizienz von Signalsequenzen erhöht wird (von Heijne, 1990b).

Die Hydrophobizität der Membran blockt die Insertion geladener Reste. Für die Durchquerung der Membran müssen diese Reste neutralisiert werden, was ihre Translokation energetisch aufwendig gestaltet (Summers *et al.*, 1989). Der pKa-Wert der geladenen Aminosäuren gibt ein Maß dafür an, wie energetisch aufwendig eine Neutralisation ist (die ungefähren pKa-Werte geladener Aminosäuren sind: D: 4,7; E: 4,7; K: 10,2; R: 12).

Das Membranpotential oder elektrochemische Potential μ_{H^+} an der bakteriellen Cytoplasmamembran beeinflusst die Membraninsertion positiver und negativer Ladungen. Es besteht aus einem Protonengradienten ΔpH und einem elektrischen Potential $\Delta \psi$. Auf der periplasmatischen Membranseite findet sich demzufolge eine höhere Nettokonzentration an Protonen (ΔpH) und eine positive Nettoladung ($\Delta \psi$) (Geller, 1991). Eine direkte Auswirkung des elektrischen Potentials $\Delta \psi$ ist der Transport negativ geladener Reste mit dem Potentialgradienten, der diese anzieht, während positive Reste gegen den Potentialgradienten bewegt werden müssen (Geller *et al.*, 1993; von Heijne, 1986a). Eine direkte Auswirkung des Protonengradienten ΔpH könnte eine Erleichterung der Deprotonierung positiver Ladungen vor und ihre Protonierung nach der Translokation sein (Wickner *et al.*, 1991). Eine indirekte Auswirkung des Membranpotentials auf die Insertion eines Membranproteins könnte durch die Beeinflussung des Translokationsapparates gegeben sein (Geller, 1991). Mit Derivaten der Leader Peptidase konnte eine stimulierende Wirkung des elektrochemischen Potentials auf die Translokation von Aminosäuresequenzabschnitten mit negativen Ladungen gezeigt werden. Positive Reste scheinen in Abwesenheit eines Potentials besser transloziert zu werden (Andersson & von Heijne, 1994).

Der Aspekt des elektrochemischen Potentials ist für Eukaryoten nicht relevant, da am rauen endoplasmatischen Retikulum, wo die Proteintranslokation stattfindet, kein generelles Membranpotential existiert.

Thermodynamisch formuliert bedeuten geladene Reste eine Einschränkung der Kinetik des Insertionsprozesses. Das Protein wird in einem Stadium eines lokalen Minimums an Freier Energie eingefangen, das durch die positiven Ladungen bestimmt wird.

Eine neue Determinante der Topologie von Membranproteinen wurde beim Chemorezeptor für Serin (Tsr) bei *E. coli* entdeckt (Seligman & Manoil, 1994). Es ist eine elf Aminosäurereste lange cytoplasmatische Sequenz, die in α -helicaler Struktur stark amphipatisch ist. Sie verankert die unmittelbar N-terminale Stop-Transfer-Sequenz (TM 2) in der Membran. Ihre Wirkung könnte auf der Wechselwirkung der hydrophoben Helixseite mit der Membran beruhen. Eine Alternative ist die Interaktion mit einem anderen Teil des Proteins. Für letztere Möglichkeit spricht die Konservierung der hydrophoben Seite der amphipathischen Sequenz, da die Oberflächenreste integraler Membranproteine mit Lipidkontakt dazu tendieren, variabel zu sein (Rees *et al.*, 1989a; Rees *et al.*, 1989b). Eine vergleichbare amphipathische Sequenz ist auch bei anderen Chemorezeptoren an derselben Stelle C-terminal von TM 2 zu finden (Seligman & Manoil, 1994).

2.5 Topologiebestimmung integraler Membranproteine

Ziel der Topologiebestimmung ist es, herauszufinden, welche Proteinteile auf welcher Seite der Membran liegen und welche Teile darin eingebettet sind. Ein topologisches Modell liefert einige strukturelle Information eines Proteins, da es die große Anzahl möglicher dreidimensionaler Strukturen stark einschränkt.

2.5.1 Methoden der Topologiebestimmung integraler Membranproteine

Ist die Aminosäuresequenz eines Proteins bekannt, können Hydropathie-Analysen der Sequenz erste Versionen der Topologie liefern. Diese Methode setzt voraus, daß Transmembransegmente vorwiegend aus

hydrophoben Aminosäuren bestehen. Eine Hydrophathieanalyse untersucht eine Sequenz im allgemeinen dadurch, daß ein 'Fenster' von ca. zwanzig Aminosäuren durch die Sequenz wandert. Die Hydrophobizitätswerte aller Fenster (Summierung der Einzelwerte der Aminosäuren eines Fensters) werden in einem Plot nebeneinander gesetzt. Die Hydrophobizitätswerte für Aminosäuren stammen meistens aus gemessenen oder berechneten Werten der freien Energie des Aminosäuretransfers aus einer nichtpolaren Phase in die Wasserphase (Engelman *et al.*, 1986; Kyte & Doolittle, 1982). Verbesserungen der Vorhersage der Transmembrandomänen konnte beispielsweise durch die Einbeziehung der Verteilung positiv geladener Aminosäuren gemäß der 'positive inside'-Regel (von Heijne, 1992) oder durch die Verwendung statistischer Daten bekannter Topologien (z.B. Wahrscheinlichkeit des Auftretens bestimmter Aminosäuren an bestimmten Positionen in der Sequenz) (Jones *et al.*, 1994a) erzielt werden.

Experimentelle biochemische Analysen der Topologie können mit Proteolyseexperimenten oder Verwendung von monoklonalen Antikörpern im "epitope mapping" ausgeführt werden. Die Anwendung der Proteolyse erfordert das Vorhandensein oder Einführung spezifischer Schnittstellen in das Protein für selten schneidende Protease wie z.B. Trypsin. Ein Beispiel für die erfolgreiche Topologieaufklärung mit Hilfe von verschiedenen Proteasen sind die integralen Membranproteine HisQ und HisM der Histidin Permease von *Salmonella typhimurium* (Kerppola & Ames, 1992). Die Topologieanalyse durch Antikörper bedeutet Immunisierung mit synthetischen Fragmenten des zu untersuchenden Proteins oder Immunisierung mit dem intakten Protein oder Fragmenten davon. Die Bindung der gewonnenen Antikörper an das Zielprotein, die über zahlreiche Möglichkeiten durchgeführt und nachgewiesen werden kann (Cafiso, 1993), erlaubt die Lokalisierung des Epitops in Bezug auf die Membran. Verschiedene Techniken wurden beispielsweise am Acetylcholinrezeptor (nAChR) (Pedersen *et al.*, 1990) und an LamB-Mutanten angewandt (Molla *et al.*, 1989).

Eine experimentelle molekularbiologische Analyse kann durch die Genfusionsmethode bzw. durch sogenannte C-terminale Deletionsfusionen durchgeführt werden. Es werden Hybridproteine konstruiert, die aus dem N-terminalen Teil eines Membranproteins und dem fusionierten C-Terminus eines Reporterproteins bestehen. Die Aktivität oder Inaktivität des Reporters zeigt seine Lokalisation und damit die des Fusionspunktes und den C-Terminus des Fusionsproteins an. Ein vorhandenes (internes) Exportsignal unmittelbar N-terminal vor dem Reporterprotein kann dieses aus dem Cytoplasma exportieren oder zumindest in die Membran einlagern (im Fall der β -Galactosidase als Reporter).

Die Reporterproteine, mit denen die Topologien zahlreicher Membranproteine in *Escherichia coli* untersucht wurden, sind alkalische Phosphatase (siehe unten), TEM β -Lactamase und β -Galactosidase.

Im Gegensatz zu alkalischer Phosphatase, die nur im Periplasma aktiv ist, faltet sich β -Lactamase sowohl im Cytoplasma, als auch im Periplasma zu einem aktiven Enzym (Broome-Smith & Spratt, 1986; Broome-Smith *et al.*, 1990). Das exportierte Enzym vermittelt Resistenz gegen β -Lactam-Antibiotika (z.B. Ampicillin). An eine periplasmatische Domäne eines Membranproteins gekoppelt, kann diese Fusion durch letale Selektion identifiziert werden. Cytoplasmatische Fusionen findet man durch ausplattieren von Zellen in hoher Dichte. Die Lyse der Zellen setzt aktive β -Lactamase cytoplasmatischer Fusionen frei, so daß an diesen Stellen Zellkolonien hochwachsen können.

β -Galactosidase ist nur im Cytoplasma aktiv. An Exportdomänen fusioniertes Enzym ist inaktiv (Froshauer *et al.*, 1988; Manoil, 1990), da die Faltung von β -Galactosidase im Cytoplasma ihren Export verhindert (Lee *et al.*, 1989) und das Enzym vielleicht in der Sec-Translokationsmaschine "steckenbleibt" (Schatz & Beckwith, 1990) oder eine Disulfidbrückenbildung von teilweise exportiertem Enzym den restlichen Exportvorgang lahmlegt (Bardwell *et al.*, 1991).

2.5.2 Topologiebestimmungen mit Alkalische Phosphatase als Reporterprotein

Die am häufigsten benutzte Genfusionsmethode ist die Fusion eines Membranproteins mit alkalischer Phosphatase (Boyd, 1993). Dieses Enzym wird ohne die eigene Signalsequenz als C-terminaler Proteinteil an das zu untersuchende Protein (-fragment) fusioniert und kann dort durch andere Exportsignale des N-terminalen Proteinteils aus dem Cytoplasma exportiert werden.

Alkalische Phosphatase (AP) ist nur nach ihrem Export ins Periplasma aktiv, wo sie sich unter nicht-reduzierenden Bedingungen falten kann. AP bildet dort zwei intramolekulare Disulfidbrücken aus (Derman & Beckwith, 1991; DuBose & Hartl, 1990), inkorporiert Zink-Ionen (Schlesinger *et al.*, 1969) und setzt sich zu einem aktiven Homodimer zusammen. Damit läßt sich das quantitative Ausmaß des Exports dieses Enzyms direkt über seine Aktivität messen (Traxler *et al.*, 1992).

Die Aktivität wird durch die Phosphatabspaltung an dem Farbstoff 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat (XP) gemessen. Bakterienkolonien auf festen Medien mit XP zeigen bei AP-Aktivität dunkelblaue Kolonien, während bei schwacher oder keiner AP-Aktivität die Kolonien hellblau oder weiß sind. Genaue AP-Aktivität wird durch einen Enzym-Assay festgestellt (Manoil, 1991).

2.5.3 Die Topologie von MalF und MalG

Eine erste Topologiebestimmung von MalF wurde durchgeführt, als die DNA-Sequenz des Proteins bestimmt wurde (Froshauer & Beckwith, 1984). Das Protein (mit der aus der Sequenz abgeleiteten MG von 56,947 kDa) zeigte in einer Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte-Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) drei mögliche hydrophobe Transmembrandomänen (TMs) im N-Terminus, die durch eine ca. 181 Aminosäuren große, zentralen hydrophilen Domäne von fünf weiteren hydrophoben, wahrscheinlichen TMs im C-Terminus getrennt sind. Fusionen mit β -Galactosidase (LacZ) an verschiedenen Positionen in MalF zeigten, daß das Hybridprotein mit sechs bzw. sieben TMs in der Membran verankert vorliegt. Später zeigte sich, daß schon die ersten zwei TMs ausreichen, ein MalF-LacZ-Hybrid in der Cytoplasmamembran zu verankern (Froshauer *et al.*, 1988). Das Topologiemodell der Hydropathieanalyse wurde schließlich durch die Konstruktion und Analyse von achtzehn MalF-AP-Fusionsproteinen bestätigt (Boyd *et al.*, 1987), später auch durch Daten von MalF- β -Lactamase-Fusionen (Prinz & Beckwith, 1994). In allen cytoplasmatischen und periplasmatischen Domänen lag mindestens ein Fusionspunkt. Dieses heute aktuelle Modell weist acht TMs auf (Abbildung 2). N- und C-Terminus liegen im Cytoplasma. Die hydrophoben Sequenzen der Transmembrandomänen drei, vier und sieben sind mit ca. 30 Aminosäuren relativ lang im Vergleich zu den übrigen. Die tatsächlichen Grenzen der Domänen sind nicht eindeutig festzustellen; zumindest aber kann ein zentraler Abschnitt festgelegt werden.

Die Topologie von MalG wurde von zwei verschiedenen Gruppen etwa zur gleichen Zeit mit Hilfe von alkalischer Phosphatase-Fusionen bestimmt (Boyd *et al.*, 1993; Dassa & Muir, 1993). MalG besitzt danach sechs Transmembrandomänen, C- und N-Terminus des Proteins liegen im Cytoplasma. Nach den Modellen variiert die Länge der TMs zwischen achtzehn und dreiundzwanzig Aminosäuren. Der cytoplasmatische Loop mit der konservierten EAA-X₃-G-X₉-I-X-LP-Consensus Sequenz liegt zwischen TM 4 und TM 5.

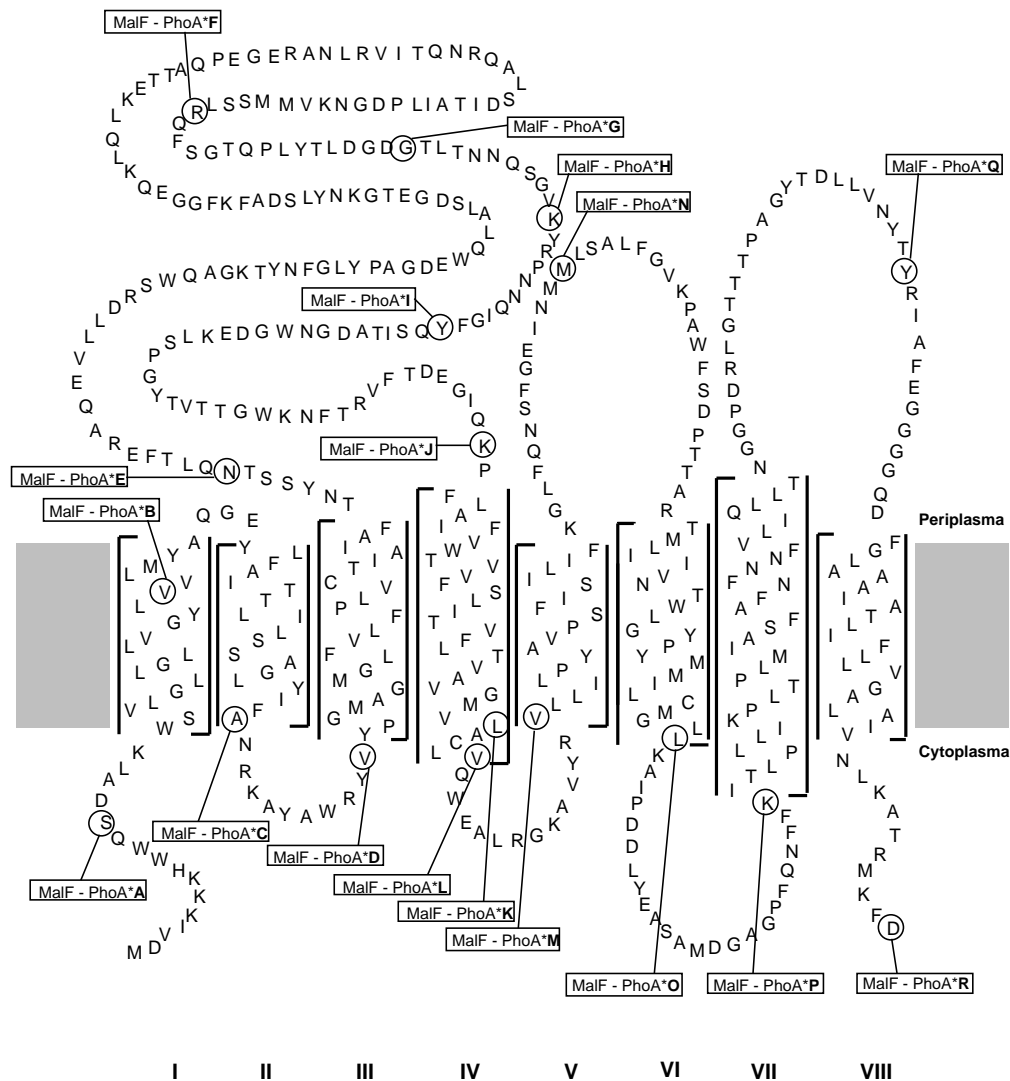


Abbildung 2. Topologiemodell von MalF (Boyd *et al.*, 1987; Froshauer & Beckwith, 1984).

Angegeben sind die Aminosäuren von MalF im Einbuchstabencode. Die Transmembransegmente sind in Rechtecke eingefasst, die eingebettet in der Cytoplasmamembran liegen. Es sind acht Transmembransegmente mit mutmaßlich α -heliciler Struktur vorhanden. C- und N-Terminus befinden sich im Cytoplasma. Die Fusionspositionen zwischen MalF und alkalischer Phosphatase (PhoA), über die das Modell bestätigt wurde, sind durch das Einkreisen der jeweils letzten C-terminalen Aminosäure von MalF angegeben. Der exakte Beginn und das exakte Ende der Transmembrandomänen (TMs) ist nicht bekannt. Vor allem bei TM 4 und TM 7 sind die möglichen Transmembransequenzen im Vergleich relativ lang.

MalF besitzt 514 Aminosäuren und ein abgeleitetes Molekulargewicht von 56,947 kDa (Im PAA-Gel: 40 kDa). Der große periplasmatische Loop zwischen TM 3 und TM 4 umfaßt 181 Aminosäuren. Die bei BPD-Transportern stark konservierte EAA-X₃-G-X₉-I-X-LP Consensus Sequenz liegt in der vierten cytoplasmatischen Domäne.

2.6 Die Faltung polytopter Membranproteine

Die Faltung polytopter Membranproteine kann unter biophysikalischen Gesichtspunkten nach dem 'Zwei-Stufen-Modell' von Popot und Engelman beschrieben werden (Popot & Engelman, 1990; Popot *et al.*, 1987). In der ersten Stufe werden unabhängige, stabile α -Helices ausgebildet, die in die Membran inserieren. Diese Transmembranhelices werden als autonome Faltungsdomänen betrachtet. In der zweiten Stufe

interagieren diese Helices miteinander, um ein funktionelles, globuläres Membranprotein zu bilden. Helixinteraktionen gleicher Art sind gegebenenfalls daran beteiligt, Membranproteinoligomere hervorzu- bringen. Stufe 1 und Stufe 2 sind energetisch klar voneinander unterscheidbar.

Das Zwei-Stufen-Modell schließt dabei Transmembransegmente aus, die nicht individuell stabil sind. Die H-Brückenbildung der Aminosäureseitenketten entlang der 'main chain' der α -Helix formt die Helix zu einer sehr stabilen Struktur im Lipid. Der Austritt der Helix aus der Membran ins wäßrige Medium wird durch den "Hydrophoben Effekt" stark erschwert: die hydrophobe Helix wird durch die H-Brücken-Bindungen der Wassermoleküle untereinander "zurückgeworfen". Ein Energieaufwand von ca. 30-40 kcal/mol wäre nötig, um eine Helix aus der Membran herauszulösen.

Helixinteraktionen müssen die Entropie, welche die Trennung von Helices durch Dissoziation mit ca. 1-10 kcal/mol fördert, überwinden. Solche Interaktionen zwischen Helices können durch H-Brücken-Bindungen, Ionenpaare, elektrostatische Wechselwirkungen von Helixdipolen oder Interaktionen mit prosthetischen Gruppen gegeben sein. Verschiedene Beispiele experimenteller Befunde hierzu finden sich beim Photosynthesereaktionszentrum (Yeates *et al.*, 1987), Bacteriorhodopsin (Popot *et al.*, 1989) und der Lactose-Permease (LacY) (Carrasco *et al.*, 1986). Auch äußere Bedingungen wie eine kurze Looplänge oder angelagerte Strukturen von Untereinheiten oder die Art der Packung von Lipidmolekülen könnten wesentlich beteiligt sein. Für die endgültige enge Zusammenlagerung und das dichte Zusammenpacken der Seitenreste der Helices sind höchstwahrscheinlich van der Waals-Kräfte verantwortlich.

2.7 Die Membraninsertion und Ausbildung der Topologie am Beispiel von MalF

Die bis jetzt bekannte Beteiligung des Sec-Translokationsapparates an der Membraninsertion von MalF ist unter II.2.3 beschrieben.

Die Membraninsertion von MalF geschieht insgesamt sehr schnell und effizient. Eine zeitliche Auflösung durch Pulse chase Experimente für verschiedene cytoplasmatische MalF-AP-Fusionen ist nicht möglich gewesen. Proteasesensitivität von inseriertem Protein ist bereits zum Pulszeitpunkt gegeben (Traxler *et al.*, 1992). Einzelne Transmembrandomänen (TMs) agieren als Exportsignale für C-terminale periplasmatische Domänen. Die Installation dieser Domänen geschieht unterschiedlich schnell und könnte von der Hydrophobizität der vorangehenden TM abhängen. Die Translokation einer hydrophilen Domäne durch die in MalF am wenigsten hydrophobe TM 7 ("Q-Fusion") geschieht im Vergleich mit TM 5 und TM 3 am langsamsten und am unvollständigsten (Traxler *et al.*, 1992). Ungeklärt ist, ob C-terminale Proteinteile im nativen Protein, z.B. eine Coinsertion von TM 8 mit TM 7, die Kinetik der Topologieausbildung verändern würde.

Durch Sandwichfusionen konnte gezeigt werden, daß der C-Terminus von MalF eine nicht stabile Insertion von TM 4 stabilisiert, deren nachfolgende dritte cytoplasmatische Ankerdomäne fehlt (MalF-AP-Fusionen K und L mit hohen AP-Aktivitäten). Diese Stabilisation beruht mutmaßlich auf der Ankerfunktion der vierten und fünften cytoplasmatischen Domäne bzw. deren positiven Aminosäurereste (Ehrmann *et al.*, 1990).

2.8 Die Zusammenlagerung von MalF zur quartären Struktur mit MalG und MalK

Die Stöchiometrie des Transportkomplexes ist: MalFGK₂ (Davidson & Nikaido, 1990). Der Zusammenbau zu diesem Komplex kann durch die sich ändernde Proteasesensitivität von pulsmarkiertem MalF mit ³⁵S-Methionin verfolgt werden (Traxler & Beckwith, 1992). Im MalFGK₂-Komplex ist MalF proteaseresistent.

Wird MalF ohne die Proteine MalG oder MalK oder MalG/MalK exprimiert, inseriert es in die Membran und bleibt proteasesensitiv. Wird nach der Expression von MalF zusätzlich MalG exprimiert (durch die Induktion eines amber-Suppressors gegen eine *malG* amber-Mutation), wandelt sich der proteasesensitive Zustand von MalF um in einen proteaseresistenten Zustand.

Folgende Ergebnisse werden davon abgeleitet: 1. MalF inseriert unabhängig von seinen Transportkomplex-Partnern in die Membran. 2. MalF und MalG diffundieren im Anschluß an Ihre Insertion in der Membran und lagern sich mit MalK zum Transportkomplex zusammen. Die Zusammensetzung des Komplexes findet somit nicht im Cytoplasma statt. 3. Die proteasesensitiven Regionen von MalF, vermutlich zumindest die zweite, dritte und vierte periplasmatische Domäne, erfahren dabei eine Konformationsänderung zu einer quartären Struktur oder werden alternativ zum Teil oder ganz verdeckt.

Für die Erreichung des proteaseresistenten Zustands von MalF ist die N-terminale Hälfte von MalG ausreichend. In Abwesenheit einer funktionellen Untereinheit von MalG bildet außerdem auch MalK einen stabilen Komplex mit MalF (Panagiotidis *et al.*, 1993).

Diese Ergebnisse stimmen mit dem postulierten 'Zwei-Stufen-Modell' von Popot und Engelman (siehe oben unter II.2.6) überein. Die Zusammenlagerung von MalF und MalG entspricht dabei der zweiten "Stufe" des Modells. (Traxler & Beckwith, 1992).

2.9 Der Transportvorgang am MalFGK₂-Komplex

Das MBP ist so gefaltet, daß zwei globuläre Domänen entstehen (Spurlino *et al.*, 1991; Spurlino *et al.*, 1992). In dem Spalt zwischen diesen beiden "Lappen" befindet sich die Substratbindestelle. Bei der Bindung und Einschließung des Substrates geschieht eine Konformationsänderung: Diese "Lappen" bewegen sich um einen Winkel von 35° mit einer seitlichen Drehung von 8° an der 'Scharnier'-Region aufeinander zu (Sharff *et al.*, 1992). Diese Form des MBP wird vermutlich von den integralen Cytoplasmamembranproteinen MalF und MalG erkannt, an welche MBP das Substrat für den Transportvorgang ins Cytoplasma überträgt (Davidson *et al.*, 1992). Dabei bindet wahrscheinlich der N-terminale Lappen an MalG und der C-terminale Lappen an MalF (Hor & Shuman, 1993).

Das im folgenden beschriebene Modell des Transportmechanismus geht zurück auf Treptow und Shuman und auf das 'Drei-Stufen-Modell' von Hor und Shuman (Hor & Shuman, 1993; Treptow & Shuman, 1988). Die reversible, niedrig affine Bindung des mit einem Liganden versehenen MBP in der ersten Stufe löst an MalF und MalG eine oder mehrere Konformationsänderungen in rascher Folge aus. Das bedeutet für die zweite Stufe eine feste Bindung des geschlossenen, substratbeladenen MBP. Dabei wird eine Substraterkennungsstelle in den Membranproteinen zugänglich. Zusätzlich löst das mit Substrat beladene MBP ein Transmembransignal aus, welches die dritte, irreversible Stufe des Transportes einleitet. ATP wird gebunden und hydrolysiert, das Substrat durch die Membran gepumpt, ins Cytoplasma entlassen und das Substrat-freie MBP löst sich von den Membranproteinen ab.

Der maximale, wildtypische Transport (V_{\max}) von Maltose für ganze Zellen wurde mit 2 nmol/min $\times 10^8$ Zellen bestimmt, der K_m des Systems beträgt dabei 1 μ M (Szmelcman *et al.*, 1976).

2.10 Substratspezifische Mutationen in MalG

An MalG wurde eine Linker Insertions-Mutagenese durchgeführt, um Mutanten mit funktionell wichtigen und unwichtigen Regionen in MalG zu identifizieren (Dassa, 1993). Dabei zeigte sich, daß Linker-Insertionen und Deletionen von bis zu 17 Aminosäuren im C-terminalen Bereich der ersten Transmembrandomäne (TM) und N-terminal des nachfolgenden ersten periplasmatischen Loops die maximale Transportrate (V_{\max}) des Maltosetransportes höchstens halbieren. Eine Insertion am N-terminalen Bereich von TM 4 zeigt ein wildtypgleiches Phänotyp. Diese Bereiche sind folglich für die Funktion von MalG und des ganzen Transporterkomplexes vermutlich nicht von wesentlicher Bedeutung.

Dagegen bewirkt eine Insertion direkt N-terminal von TM 6 ein $\text{Mal}^{+/-}\text{Dex}^{-}$ Phänotyp, d.h. Maltose wird nur noch in geringem Ausmaß transportiert, Dextrin überhaupt nicht mehr. Weitere drei verschiedene Deletionen C-terminal von TM 5 verursachen ein Mal^{-} -Phänotyp. Dies zeigt, daß der C-Terminus des Proteins funktionell wichtig ist und vielleicht sogar eine Rolle in der Substraterkennung spielen könnte.

2.11 Maltosebindeprotein-unabhängiger Transport von Maltose

Das Maltosebindeprotein ist *in vivo* essentiell für das Wachstum auf Maltose als einziger C-Quelle, denn *E. coli*-Mutanten mit einer Deletion in *malE* zeigen kein Wachstum auf Maltose mehr (Shuman, 1982). Es konnten jedoch Mutanten isoliert werden, die Maltose in Abwesenheit von MBP stereospezifisch transportieren (Treptow & Shuman, 1985). Diese Mutationen liegen entweder in *malF* oder *malG* und sind dabei gehäuft in diskreten Regionen zu finden. In *MalF* sind dies die "p" (proximale)-Region zwischen den Aminosäureresten 334-338 am C-terminalen Ende der Transmembrandomäne 5 und die "d" (distale)-Region in den Transmembrandomänen 6-8 (Covitz *et al.*, 1994). Mit einer Ausnahme sind in allen Fällen zwei Punktmutationen für MBP-unabhängigen Transport nötig. Die zwei Mutationen, die in verschiedenen Regionen von *MalF* oder *MalG* liegen, zeigen dabei ein synthetisches Phänotyp, der verschieden von dem der jeweiligen Einzelmutationen ist.

Die V_{\max} -Werte der MBP-unabhängigen Mutanten sind verschieden, sie weisen aber alle einen K_M -Wert von ca. 2 mM (WT: 1 μM) auf.

Diese Befunde weisen auf eine Substrat-Erkennungsstelle hin, die in Abwesenheit von MBP geschlossen ist. Substratbeladenes MBP löst vermutlich im wildtypischen Transportsystem die Öffnung dieser Stelle aus (Reyes *et al.*, 1986). Wahrscheinlich lösen die jeweiligen Mutationen Konformationsveränderungen im MalFGK_2 -Komplex aus, die der Bindung von MBP entsprechen, so daß die Substraterkennungsstelle vom Periplasma aus zugänglich wird. Interessanterweise zeigen von 8 verschiedenen MBP-unabhängigen Mutanten 6 ein $\text{Mal}^{+}\text{Dex}^{-}$ -Phänotyp und 2 ein $\text{Mal}^{+}\text{Dex}^{\text{reduziert}}$ -Phänotyp (Treptow & Shuman, 1988). Dies ist vielleicht ein Hinweis für ein enges Zusammenspiel von Substraterkennungspositionen und den Positionen, die MBP-Unabhängigkeit hervorrufen.

Zwei weitere Fähigkeiten zeichnen diese Mutanten aus. Zum einen ist die ATPase-Aktivität erhöht und konstitutiv (Davidson *et al.*, 1992). Das Wachstum der Mutanten auf Maltose entspricht dabei direkt der Erhöhung der ATPase-Aktivität. Zum anderen inhibiert wildtypisches MBP in diesen Mutanten die Transportaktivität (dominant negativ). Das weist auf eine Interaktion des MBP mit *MalF/MalG* in der Stufe 1 des Transportvorgangs hin. Das Andocken von MBP als auslösendem Faktor für den wildtypischen Transport verdeckt möglicherweise in diesem Fall die putative, geöffnete Substraterkennungsstelle durch eine unproduktive Interaktion.

3. Modellbildung einer 3D-Struktur integraler Membranproteine

Der Weg von der Aminosäuresequenz eines Membranproteins zu seinem 3D-Modell umfaßt etliche schematisch darstellbare Stationen.

Ohne auf die Vielzahl der durchzuführenden, experimentellen und statistischen Methoden einzugehen, können die Stationen in etwa folgendermaßen beschrieben werden:

Als erstes werden durch Hydrophobizitätsanalyse der Aminosäuresequenz eines Proteins putative Transmembranhelices identifiziert. Eine weiterführende Topologieanalyse bestimmt die Lokalisation von N- und C-Terminus und ordnet die zwischen den Transmembrandomänen liegenden Loops dem Periplasma oder Cytoplasma zu. Danach können die mutmaßlich α -helicalen Transmembrandomänen genauer analysiert werden: Ihre Hydrophobizität und Amphiphilizität können Aufschluß über das Ausmaß ihrer Exposition gegenüber Lipid und Proteininnerem geben. Dem Proteininneren zugewandte und die dem Lipid zugewandte Helixseiten sind zu identifizieren und abzugrenzen. Die nächste wichtige Frage ist die der Positionierung der Helices relativ zueinander, unter Berücksichtigung der Analyse der Helixseiten. Schließlich folgt die Detailarbeit des Modellierens. Es sind dies die Bestimmung von Achsenabständen und Neigungswinkel von Helices, die Feinabstimmung der Rotation von Helixachsen, Berücksichtigung von Deformationen des Proteinrückgrats der Helices wie z.B. Knicke oder andere Abweichungen von einer idealen Helix und ganz zum Schluß die Positionierung der Seitenketten der Aminosäuren.

Ein Beispiel für eine einfache Modellbildung gibt das allgemeine Transportermodell für die Mitglieder der "major facilitator superfamily" (MFS) (Goswitz & Brooker, 1995), die Uniport, Symport und Antiport katalysieren (Marger & Saier, 1993), und zu denen die Lactose Permease (LacY) gehört.

Es konnte durch die folgenden Kriterien aufgestellt werden: Die durchschnittliche Hydrophobizität und Amphiphilizität von identifizierten Transmembranhelices von 65 Mitgliedern der Gruppe wurde berechnet und dadurch sogenannte "channel-lining" Helices für die ganze Proteinfamilie bestimmt. Sie lassen sich von den restlichen Helices durch niedrigere Hydrophobizität und höhere Amphiphilizitätsmomente unterscheiden. Helices, die durch kurze hydrophile Loops bis ca. elf Aminosäuren verbunden sind, wurden als benachbart angesehen. Die experimentellen Daten zu helicalen Interaktionen von LacY spezifizierten die Anordnung der Helices zueinander. Das Arrangement der Helices ergibt außerdem eine Rotationssymmetrie von 180° , wie sie beim Photosynthesereaktionszentrum zu finden ist (Deisenhofer & Michel, 1989b).

4. Fragestellungen und methodische Ansätze dieser Arbeit

Bisher war nur sehr wenig über die molekularen Grundlagen des Maltosetransports durch die kanalbildenden Transmembrankomponenten MalF und MalG bekannt. Welche Teile des Transporters legen seine Funktion fest und welche Teile sind für wichtige strukturelle Gegebenheiten verantwortlich?

Beispielsweise könnte es bestimmte Regionen in den Membranproteinen geben, die eine wichtige funktionelle Rolle spielen. Unbekannt war, ob es Aminosäuren gibt, die direkt am Substrattransport oder an einer hypothetischen Substraterkennung beteiligt sind und, falls dies der Fall ist, in welcher Art und Weise sie involviert sind.

Aminosäuren bzw. ihre Positionen, die maßgeblich am Aufbau der wildtypischen Struktur von MalF beteiligt sind, waren bis auf die Mutationen, die Bindeprotein-unabhängige Transporter hervorrufen, nicht bekannt. Solche Aminosäuren bestimmen beispielsweise intra- oder intermolekulare Interaktionen von Transmembranhelices, die etwa bei dem Assemblyprozeß, einer "molekularen Flexibilität" des Transportvorgangs (Öffnen und Schließen des Kanals), einem transmembranen Signalprozeß und anderen Vorgängen von Bedeutung sein könnten.

Der C-Terminus von MalF erschien für diese Arbeit aus folgenden Gründen als der interessanteste Proteinteil: Bei allen periplasmatischen Bindeprotein-abhängigen Transportern ist der C-Terminus gegenüber dem N-Terminus deutlicher konserviert. Die umfangreichste Konservierung der Sequenz zwischen MalF und MalG liegt gleichfalls in der C-terminalen Hälfte der beiden Proteine. Außerdem enthält der C-Terminus von MalF die stärker konservierte, funktionell und strukturell bedeutende EAA-X₃-G-X₉-I-X-LP Consensus Sequenz, die hypothetisch vielleicht mit der Nukleotidbindestelle der MalK-Untereinheit interagiert oder alternativ an der Signaltransduktion zwischen den integralen Membrankomponenten und der MalK-Untereinheit beteiligt ist (Kerppola & Ames, 1992).

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Untersuchung der Transmembrandomänen von MalF wichtige Regionen und einzelne Aminosäuren zu identifizieren, die eine Bedeutung für die Funktion und Struktur von MalF und den kompletten Transportkomplex besitzen.

Die Anzahl der zu untersuchenden Transmembrandomänen (TMs) wurde für diese Arbeit auf die sechste und achte TM im C-Terminus beschränkt. (Die Untersuchung der siebten TM wurde von einer Kollegin vorgenommen (Pick, 1995)).

1. Durch eine spezifische Mutagenese unter Verwendung degenerierter Oligonukleotide sollten die Aminosäuren der Transmembrandomänen systematisch substituiert werden.
2. Alle identifizierten, isolierten Mutanten, die den Maltosetransport in irgend einer Weise beeinträchtigen, sollten phänotypisch charakterisiert werden.
3. Strukturelle Änderungen durch Mutationen in MalF sollten durch einen geeigneten Proteaseassay aufgezeigt werden.
4. Die Eigenschaften der Membraninsertion mutierter Transmembrandomänen sollte durch geeignete Konstruktionen von Fusionsproteinen mit einem Reporterprotein untersucht werden.
5. Die experimentell gewonnenen Daten sollten in ein zu entwerfendes Modell von MalF eingehen.

III. Material und Methoden

1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure(n)
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxydisulfat
BCIP	5-Bromo-4 Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Cam	Chloramphenicol
ddNTP	Didesoxynucleotid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	double stranded, Doppelstrang (-DNA)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Dinatriumsalz)
EtOH	Ethanol
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani-Broth
log-Phase	logarithmische Wachstumsphase
MBP	Maltosebindeprotein
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MMA	Minimalmedium A
M9	Minimalmedium 9
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ONPG	2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
OD _x	Optische Dichte (bei einer Wellenlänge von x nm)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
pNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
RT	Raumtemperatur
ss	single stranded, Einzelstrang(-DNA)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TB	Terrific broth
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin

Tris	Trishydroxymethylaminmethan
rpm	Umdrehungen pro Minute
U	Unit
ÜN	Über Nacht
XG	Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
XP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
wt/WT	wildtypisch/Wildtyp

2. Labormaterial, Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Labormaterialien, die im folgenden nicht aufgeführt sind, wurden von den Herstellern Boehringer Mannheim (Mannheim), Greiner Labortechnik, Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Selze), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) bezogen.

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Agarose (Seaplaque; LMP-Agarose)	FMC Bioproducts, Rockland, USA
Aminosäuren	Merck, Fluka
Ampicillin	United States Biochemicals, USB, Cleveland, USA
APS	Merck
Aqualuma (Szintillationscocktail)	Canberra Packard International, S.A., Zürich
Autoradiographiefilme	Fuji Medical X-ray, Allmedt GmbH, Essen
BCIP	Boehringer
Bromphenolblau	Merck
Chloramphenicol	Serva
DMSO	Merck
DNA-Längenmarker -DNA-BstEII	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
DTT	Serva
Ethidiumbromid	Serva
Immobilon-P-PVDF-Transfermembran	Millipore, Molsheim
Kanamycin	Serva
Maltose (Monohydrat)	Merck
[¹⁴ C] Maltose	Amersham UK
Medien und Medienzusätze	Difco Laboratories, Detroit, USA
Membranfilter	Millipore, Schleicher und Schuell
NBT	Boehringer
ddNTP	Boehringer
Oligonukleotide (Primer)	MWG-BIOTECH, Ebersberg
Quiagen Plasmid Preparation Kit	Diagen GmbH, Hilden
QIAwell- (Plasmid Preparation Kit)	Diagen GmbH
PAGE-Apparatur (Mini-Protean II)	BioRad, Hercules, USA
Proteinase K	Boehringer
Proteaseinhibitoren	Boehringer

Proteinmolekulargewichtsmarker	BioRad
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, AGS, Promega/Serva
SDS	Serva
Sekundärer Antikörper (Anti-Rabbit IgG, AP-Konjugat)	Sigma
Sequenase Kit Version 2,0	USB/Amersham
TCA	Roth
TEMED	Merck
Tetrazyklin	Sigma
T4-Gen 32 Protein	Boehringer
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Boehringer
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs

Molekulargewichtsmarker:

Prestained SDS-PAGE Standard (low range):

Phosphorylase B	112 kD
BSA	84,0 kD
Ovalbumin	53,2 kD
Carboanhydrase	34,9 kD
Sojabohnentrypsininhibitor	28,7 kD
Lysozym	20,5 kD

-DNA-BstEII Längenmarker für Agarosegele:

Fragmentgröße in kb: 14,138; 8,454; 7,242; 6,369; 5,686; 4,822; 4,324; 3,675; 2,323; 1,929; 1,371; 1,264; 0,702.

3. BakterienstämmeTabelle 1: *E. coli*-Stämme

Stamm (<i>E. coli</i>)	Genotyp ^a	Referenz/Herkunft
DHB4	F' <i>lacI^H pro/araD139 (ara-leu)7697 lacX74 phoA-PvuII phoR malF3 galE galK thi rpsL</i>	D. Boyd <i>et al.</i> , 1987
DHB4 <i>mutS</i>	DHB4 <i>mutS::Tn10</i>	Laborsammlung
DHB24	DHB4 <i>pcnB zad::Tn10</i>	D. Boyd <i>et al.</i> , 1987
DHB32	DHB4 pDHB32	D. Boyd <i>et al.</i> , 1987
JB3018-2	MC4100 <i>malE+malT^c-1</i>	J. M. Brass Stammsammlung Boos
KS272	MC1000 <i>leu⁺ara⁺ phoA-PvuII</i>	K. L. Strauch, 1987
KU8	DHB4 <i>serB⁻ trxB::Kan^R Serin⁻ Tet^S</i> (gebochnert)	K. Uhland, 1994

MC1000	F ⁻ <i>araD139 (ara-leu)7697 lacX74 galU galK rpsL thi</i>	Silhavy, 1984
MC4100	F ⁻ (<i>argF-lac</i>) U169 <i>rpsL150 deoC1 relA1 ptsF25 flbB5301 rbsR</i>	Casadaban, 1976
ME347	MC4100 (<i>malK-lacZ</i>)347(<i>placMu55</i>)	Laborsammlung
RE10	DHB4 <i>malT</i> (Con)	diese Arbeit
RE11	DHB4 <i>malT</i> (Con) <i>malK-lacZ</i>	diese Arbeit
RIM90	<i>araD139 flbB5301 ptsF25 rbsR relA1 rpsL150 treA (argF-lac)</i> U169 <i>malT::Tn10</i>	Martina Rimmele, 1993

^a Alle Bakterienstämme sind Derivate von *Escherichia coli* K-12. Die Beschreibung erfolgt nach der Nomenklatur von Bachmann (1990).

4. Plasmide

Tabelle 2: Plasmide

Plasmid	Eigenschaften/Genotyp	Resistenz	Referenz/Herkunft
pACYC184	Vektor mit niedriger Kopienzahl (ca. 20/Zelle)	Cam	Chang <i>et al.</i> , 1978
pBR322	Vektor mit mittlerer Kopienzahl (ca. 50-100/Zelle)	Amp	Bolivar <i>et al.</i> , 1977
pDHB32	pBR322-Derivat mit <i>malF</i> und einem <i>malG</i> -Fragment unter Kontrolle von P _{lac}	Amp	D. Boyd <i>et al.</i> , 1987
pSWFII	<i>phoA</i> ohne Signalsequenz	Amp	Ehrmann <i>et al.</i> , 1990
pDHB32 #Q III	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Q-Fusion III	Amp	McGovern <i>et al.</i> , 1991
pRE647	pDHB32-Derivat mit <i>malF647</i> (<i>malF647</i> : M ₃₇₁ I; ATG->ATA)	Amp	Diese Arbeit
pRE616	pDHB32-Derivat mit <i>malF616</i> (<i>malF616</i> : L ₃₇₂ R; CTA->CGA)	Amp	Diese Arbeit
pRE651	pDHB32-Derivat mit <i>malF651</i> (<i>malF651</i> : I ₃₇₄ T; ATC->ACC)	Amp	Diese Arbeit
pRE64	pDHB32-Derivat mit <i>malF64</i> (<i>malF64</i> : N ₃₇₆ K; AAT->AAG)	Amp	Diese Arbeit
pRE641	pDHB32-Derivat mit <i>malF641</i> (<i>malF641</i> : N ₃₇₆ H; ATT->CAT)	Amp	Diese Arbeit
pRE6190	pDHB32-Derivat mit <i>malF6190</i> (<i>malF6190</i> : L ₃₇₉ Q; CTG->CAG)	Amp	Diese Arbeit
pRE623	pDHB32-Derivat mit <i>malF623</i> (<i>malF623</i> : G ₃₈₀ D; GGT->GAT)	Amp	Diese Arbeit
pRE615	pDHB32-Derivat mit <i>malF615</i> (<i>malF615</i> : G ₃₈₀ C; GGT->TGT)	Amp	Diese Arbeit
pRE620	pDHB32-Derivat mit <i>malF620</i> (<i>malF620</i> : G ₃₈₀ S; GGT->AGT)	Amp	Diese Arbeit
pRE666	pDHB32-Derivat mit <i>malF666</i> (<i>malF666</i> : Y ₃₈₃ S; TAC->TCC)	Amp	Diese Arbeit

pRE621	pDHB32-Derivat mit <i>malF621</i> (<i>malF621</i> : L ₃₈₇ P; CTC->CCC)	Amp	Diese Arbeit
p652	pDHB32-Derivat mit <i>malF652</i> (<i>malF652</i> : N ₃₇₆ T; AAT->ACT)	Amp	Laborsammlung
p611	pDHB32-Derivat mit <i>malF611</i> (<i>malF611</i> : W ₃₇₈ R; TGG->AGG)	Amp	Laborsammlung
p66	pDHB32-Derivat mit <i>malF66</i> (<i>malF66</i> : L ₃₈₇ A; CTC->CAC)	Amp	Laborsammlung
pRE644	pDHB32-Derivat mit <i>malF644</i> (<i>malF644</i> : L ₃₇₂ R/V ₃₇₅ D; CTA->CGA/GTC->GAC)	Amp	Diese Arbeit
pRE619	pDHB32-Derivat mit <i>malF619</i> (<i>malF619</i> : L ₃₇₉ Q/G ₃₈₀ V; CTG->CAG/GGT->GTT)	Amp	Diese Arbeit
pRE665	pDHB32-Derivat mit <i>malF665</i> (<i>malF665</i> : Y ₃₈₁ N/G ₃₉₀ C; TAT->AAT/GGC->TGC)	Amp	Diese Arbeit
pRE648	pDHB32-Derivat mit <i>malF648</i> (<i>malF648</i> : P ₃₈₂ L/T ₃₈₃ H; CCG->CTG/TAC->CAG)	Amp	Diese Arbeit
pRE626	pDHB32-Derivat mit <i>malF626</i> (<i>malF626</i> : T ₃₈₃ H/M ₃₈₉ R; TAC->CAG/ATG->AGG)	Amp	Diese Arbeit
pRE660	pDHB32-Derivat mit <i>malF660</i> (<i>malF660</i> : I ₃₈₆ N/L ₃₈₇ H; ATC->AAC/CTC->CAC)	Amp	Diese Arbeit
pRE624	pDHB32-Derivat mit <i>malF624</i> (<i>malF624</i> : Y ₃₈₃ C/L ₃₈₇ F/M ₃₈₉ L; TAC->TGC/CTC->TTC/ATG->CTG)	Amp	Diese Arbeit
pRE831	pDHB32-Derivat mit <i>malF831</i> (<i>malF831</i> : G ₄₈₅ V; GGT->GTT)	Amp	Diese Arbeit
pRE816	pDHB32-Derivat mit <i>malF816</i> (<i>malF816</i> : L ₄₈₆ P; CTG->CCG)	Amp	Diese Arbeit
pRE842	pDHB32-Derivat mit <i>malF842</i> (<i>malF842</i> : A ₄₈₈ P; GCA->CCA)	Amp	Diese Arbeit
pRE8033	pDHB32-Derivat mit <i>malF8033</i> (<i>malF8033</i> : A ₄₉₁ D; GCC->GAC)	Amp	Diese Arbeit
pRE843	pDHB32-Derivat mit <i>malF843</i> (<i>malF843</i> : T ₄₉₂ R; ACG->AGG)	Amp	Diese Arbeit
pRE846	pDHB32-Derivat mit <i>malF846</i> (<i>malF846</i> : I ₄₉₄ N; ATC->AAC)	Amp	Diese Arbeit
pRE860	pDHB32-Derivat mit <i>malF860</i> (<i>malF860</i> : I ₄₉₄ L; ATC->AAC)	Amp	Diese Arbeit
pRE84	pDHB32-Derivat mit <i>malF84</i> (<i>malF84</i> : F ₄₉₅ L; TTC->TTG)	Amp	Diese Arbeit
pRE811	pDHB32-Derivat mit <i>malF811</i> (<i>malF811</i> : L ₄₉₆ P; CTG->CCG)	Amp	Diese Arbeit
p62281	pDHB32-Derivat mit <i>malF62281</i> (<i>malF62281</i> : L ₄₉₆ V; CTG->GTG)	Amp	Laborsammlung

pRE827	pDHB32-Derivat mit <i>malF827</i> (<i>malF827</i> : L497R; CTG->CGG)	Amp	Diese Arbeit
p62284	pDHB32-Derivat mit <i>malF62284</i> (<i>malF62284</i> : L497Q; CTG->CAG)	Amp	Laborsammlung
pRE853	pDHB32-Derivat mit <i>malF853</i> (<i>malF853</i> : V498M; GTG->ATG)	Amp	Diese Arbeit
pRE836	pDHB32-Derivat mit <i>malF836</i> (<i>malF836</i> : L486V/A500V; CTG->GTG/GCG->GTG)	Amp	Diese Arbeit
pRE847	pDHB32-Derivat mit <i>malF847</i> (<i>malF847</i> : L486P/V504L; CTG->CCG/GTG->CTG)	Amp	Diese Arbeit
pRE834	pDHB32-Derivat mit <i>malF834</i> (<i>malF834</i> : I494T/F495Y; ATC->ACC/TTC->TAC)	Amp	Diese Arbeit
pRE838	pDHB32-Derivat mit <i>malF838</i> (<i>malF838</i> : F495S/G499R; TTC->TCC/GGT->CGT)	Amp	Diese Arbeit
p8330	pDHB32-Derivat mit <i>malF8330</i> (<i>malF8330</i> : L497W/G499D; CTG->TGG/GGT->GAT)	Amp	Laborsammlung
p8337	pDHB32-Derivat mit <i>malF8337</i> (<i>malF8337</i> : L497Q/G499D; CTG->CAG/GGT->GAT)	Amp	Laborsammlung
pRE826	pDHB32-Derivat mit <i>malF826</i> (<i>malF826</i> : F484L/I490T/F495I; TTC->CTC/ATT->ACT/TTC->ATC)	Amp	Diese Arbeit
pRE89	pDHB32-Derivat mit <i>malF89</i> (<i>malF89</i> : G485V/L486Q/I490N; GGT->GTT/CTG->CAG/ATT->AAT)	Amp	Diese Arbeit
pRE855	pDHB32-Derivat mit <i>malF855</i> (<i>malF855</i> : I490N/I494N/I503R; ATT->AAT/ATC->AAC/ATA->AGA)	Amp	Diese Arbeit
pRE815	pDHB32-Derivat mit <i>malF815</i> (<i>malF815</i> : G485R/L496R/L497Q/A502S; GGT->CGT/CTG->CGG/CTG->CAG/ GCG->TCG)	Amp	Diese Arbeit
pRETM6AP	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion	Amp	Diese Arbeit
pRETM6AP III	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion TM 3 von <i>malF</i>	Amp	Diese Arbeit
pRE647AP	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion	Amp	Diese Arbeit
pRE647AP III	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion TM 3 von <i>malF</i>	Amp	Diese Arbeit
pRE616AP	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion	Amp	Diese Arbeit
pRE616AP III	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion TM 3 von <i>malF</i>	Amp	Diese Arbeit
pRE64AP	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion	Amp	Diese Arbeit
pRE64AP III	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion TM 3 von <i>malF</i>	Amp	Diese Arbeit

pRE652AP	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion	Amp	Diese Arbeit
pRE652AP III	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion TM 3 von <i>malF</i>	Amp	Diese Arbeit
pRE611AP	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion	Amp	Diese Arbeit
pRE611AP III	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion TM 3 von <i>malF</i>	Amp	Diese Arbeit
pRE6190AP	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion	Amp	Diese Arbeit
pRE6190AP III	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion TM 3 von <i>malF</i>	Amp	Diese Arbeit
pRE623AP	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion	Amp	Diese Arbeit
pRE623AP III	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion TM 3 von <i>malF</i>	Amp	Diese Arbeit
pRE615AP	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion	Amp	Diese Arbeit
pRE615AP III	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion TM 3 von <i>malF</i>	Amp	Diese Arbeit
pRE644AP	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion	Amp	Diese Arbeit
pRE644AP III	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion TM 3 von <i>malF</i>	Amp	Diese Arbeit
pRE626AP	pDHB32 <i>malF-phoA</i> -Fusion	Amp	Diese Arbeit

5. Bakteriophagen

Tabelle 3: Bakteriophagen

Bakteriophage	Referenz/Herkunft
fIR408	Russel <i>et al.</i> , 1986
P1 _{vir}	Laborsammlung

6. Flüssigmedien, Agarplatten und Medienzusätze

Alle Lösungen, die nach dem Autoklavieren zugegeben werden, sind entweder selbst autoklaviert oder sterilfiltriert.

LB-Medium:

10g Bacto Tryptone

5g Hefeextrakt

5g NaCl

H₂O ad 1,0 l

Agarplatten: vor dem Autoklavieren gibt man 15,0 g Agar zu.

NZA-Medium:

10g NZAmine (Casein-Hydrolysat)
5g Hefeextrakt
7,5 g NaCl
H₂O ad 1,0 l

Agarplatten: vor dem Autoklavieren gibt man 17,0 g Agar zu.

SOP-Medium:

20,0 g Bacto Tryptone
10,0 g Hefeextrakt
5,0 g NaCl
2,5 g K₂HPO₄
1,0 g MgSO₄·7H₂O
H₂O ad 1,0 l

Agarplatten: vor dem Autoklavieren gibt man 18,0 g Agar zu.

MMA-Medium (10 x Stammlösung):

150 g K₂HPO₄
45 g KH₂PO₄
4 g NaCitrat
1,02 g MgSO₄
10 g (NH₄)₂SO₄
H₂O ad 1,0 l

Agarplatten: 900 ml H₂O mit 18 g Agar autoklavieren, danach 100 ml Stammlösung zugeben.

M9-Medium (10 x Stammlösung):

76 g Na₂HPO₄·2 H₂O
30 g KH₂PO₄
5 g NaCl
10 g NH₄Cl
H₂O ad 1,0 l

Bei der Herstellung der 1 x Lösung wird (nach dem Autoklavieren) 1 mM MgSO₄ und 0,1 mM CaCl₂ zugesetzt. Agarplatten: 900 ml H₂O mit 18 g Agar autoklavieren, danach die restlichen Lösungen zugeben.

TB-Medium:

10 g Tryptone
8 g NaCl
H₂O ad 1,0 l

Nach dem Autoklavieren wird 10 mM MgSO₄-Lösung zugegeben.

MacConkey Maltose-Platten:

40 g MacConkey Agar Base

Nach dem Autoklavieren wird Maltose (aus einer 20%igen Stammlösung) bis zur Endkonzentration von 1 % zugegeben.

MacConkey-Platten:

50 g MacConkey Agar

2,0 g Spanagar

H₂O ad 1,0 l

(MacConkey Agar enthält als zusätzliche Kohlenstoffquelle Lactose)

Medienzusätze:

Alle im folgenden aufgeführten Antibiotika und sonstigen Zusätze wurden als Stammlösungen angesetzt und durch Sterilfiltration bzw. Autoklavieren sterilisiert. Die angegebenen Endkonzentrationen für Antibiotika beziehen sich auf Vollmedien. Für Minimalmedien wurde die Hälfte dieser Konzentration eingesetzt.

Tabelle 4: Antibiotika und Medienzusätze

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	200 mg/ml in H ₂ O	200 µg/ml
Casaminoacids	20% in H ₂ O	0,2%
Choloramphenicol	30 mg/ml in 70% EtOH	30 µg/ml
Glyzerin	80% in H ₂ O	0,2%
ILV (Isoleucin, Leucin, Valin)	4 mg/ml in H ₂ O	40 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Maltose, Glucose	20% in H ₂ O	0,2% oder 1%
Natriumcitrat	2 M in H ₂ O	20 mM
Tetracyclin	50 mg/ml in 70% EtOH	5 µg/ml

7. Mikrobiologische Methoden

7.1 Wachstumsbedingungen

Kulturen auf Agarplatten wurden in Brutschränken bei 28°C, 37°C bzw. 42°C inkubiert. Die Inkubation von Flüssigkulturen bis 10 ml geschah im Reagenzglasroller, größere Volumina in Erlenmeyerkolben auf einem Schütteltisch oder im Wasserbad, jeweils bei den benötigten Temperaturen.

Um exponentionell wachsende Kulturen zu erhalten, wurde ein frisches Vollmedium mit ÜN-Kulturen im Verhältnis 50:1 - 100:1 und Minimalmedien im Verhältnis 20:1 angeimpft.

7.2 Aufbewahren von Stämmen

Eine längere Lagerung von Kulturen erfolgte durch Einfrieren mit Glycerin oder DMSO bei -20°C oder -70°C.

Über Nacht angezogene Stämme wurden mit 7% DMSO bzw. 16% Glycerin (Endkonzentration) versetzt, gemischt und dann eingefroren.

7.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Dichte einer Zellkultur wurde durch die Messung ihrer optischen Dichte mit Hilfe eines Photometers bei 578 nm bestimmt. Nach Miller (Miller, 1972) entspricht eine OD_{578} von 1 ungefähr 10^9 $\mu\text{g/ml}$ Protein. Die Zellzahl beträgt dann ca. 10^9 Zellen.

7.4 MacConkey-Plattentests

Die Farbreaktion auf McConkey-Platten beruht auf dem zugegebenen pH-Indikator Neutralrot, der in dem nur schwach gepufferten Medium bei Ansäuerung zu einer tiefroten Farbe umschlägt.

Der MacConkey-Maltose-Plattentest diente dazu, qualitative Aussagen über die Fähigkeit einer Kultur machen zu können, Maltose zu transportieren und zu verstoffwechseln. Im anaeroben Inneren von Kolonien auf einer Platte wird der Zucker vergoren und die dabei entstehende Säure (Milch- und Essigsäure) läßt den im Medium enthaltenen Farbstoff zu mehr oder weniger kräftigem Rot (entsprechend der transportierten und vergorenen Zuckermenge) umschlagen.

Der McConkey-Lactose-Plattentest diente dazu, bei den verwendeten Stämmen das Lactosetransportsystem nachzuweisen.

Lactose wird in dem Bakterienstamm, der es verwerten kann, unter teilweise anaeroben Bedingungen, wie sie im Inneren von Bakterienkolonien auf Platte herrschen, vergoren, wobei saure Gärungsprodukte wie Milch- und Essigsäure entstehen. Diese Säuren färben das umgebende Medium rot an (analoger Vorgang wie bei der Maltoseverwertung).

Beispielsweise wurde der verwendete *E. coli*-Stamm DHB4*recA*: immer wieder auf den Besitz des F-Faktors (= F'; low copy self transmissible Plasmid) mit *lacI^q lacZ⁺Y⁺ proA⁺B⁺* überprüft (LacI wurde als Repressor für den P_{tac} -Promotor des verwendeten Plasmid pDHB32 mit *malF* benötigt). Das Lactosetransportsystem ist mit diesen Genen komplett. Lactose wird also aufgenommen und verstoffwechselt.

8. Molekularbiologische Methoden

8.1 Herstellung eines Phagen-Stammlysates (M13 Helferphage f₁R408)

Prinzip der Methode: Der *E. coli*-Phage f₁ gehört zusammen mit den *E. coli*-Phagen fd und M13 zu der M13-Klasse der filamentösen Phagen (sie besitzen ein einzelsträngiges, zirkuläres DNA-Genom). Plasmid-DNA mit einer intergenen Region von f₁ machen nach Infektion der Zelle mit dem Helferphagen den f₁-Replikationszyklus durch. Die entstehende Einzelstrang-DNA wird mit hoher Effizienz in Phagenpartikel verpackt und aus den Zellen ausgeschleust.

Frisches LB-Medium (50 ml) wird mit einer ÜN-Kultur des gewünschten Stammes 1:100 angeimpft und bis zu einer OD_{578} von 0,3 bei 37°C inkubiert. Dann werden 50 μl einer bisherigen Stammlösung (mit dem Titer von 10^{10} - 10^{11} Phagen/ml) zugegeben und die infizierte Kultur ca. 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Schluß wird die Kultur 20 min mit 10000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit den Phagen vorsichtig abgenommen.

Phagenfällung zur Überprüfung der Phagen-DNA Menge: Zu 1 ml Lysat werden 50 µl Essigsäure zugegeben und 1-2 Stunden auf Eis inkubiert, 15 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das getrocknete Pellet mit 10 µl H₂O aufgenommen. Die DNA kann nun auf ein Agarosegel aufgetragen und nach dem Fahren des Gels die DNA-Menge abgeschätzt werden.

8.2 Präparation von Plasmid-DNA

8.2.1 Präparation von Plasmid-Einzelstrang-DNA

Von einem Stamm mit dem gewünschten Plasmid wird eine ÜN-Kultur hergestellt. Damit werden 50 ml LB 1:100 angeimpft und die Kultur bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6 bei 37°C wachsen gelassen. Dann werden 2,5 ml Stammlysate (hier: f₁R408) zugegeben und die infizierte Kultur bei 37°C über Nacht inkubiert. Daraufhin wird die Kultur mit 10000 rpm (z.B. SS34-Rotor) abzentrifugiert und der Überstand mit den Phagen vorsichtig abgenommen.

Für die Präparation der Einzelstrang-DNA aus dem Überstand wurde der QIAprep 8 M13 Kit der Firma Qiagen verwendet und entsprechend den Herstellerangaben verfahren.

8.2.2 Präparation von Plasmid-Doppelstrang-DNA

Für routinemäßige Präparationen von Plasmid-Doppelstrang-DNA (dsDNA) wurden Standardmethoden verwendet (Sambrook *et al.*, 1989; Silhavy *et al.*, 1984).

Für die Präparation hochreiner dsDNA für Sequenzreaktionen wurde der QIAwell-8-Kit (Minipräps) der Firma Qiagen verwendet. Die Präparation erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die getrocknete DNA einer Einzelpräparation wurde abschließend in 20 µl H₂O aufgenommen.

8.3 Agarosegelelektrophorese

In der Regel wurden 0,8%ige Gele in TAE-Puffer hergestellt und in Kammern gefahren, die durch Eigenarbeit der Laborwerkstätten hergestellt wurden.

50xTAE-Puffer: 242,0 g Tris
 57,1 ml Essigsäure
 100,0 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

Gelladepuffer: 0,25% Bromphenolblau
 0,25% Xylen Xyanol FF
 30,0% Glycerin in H₂O

Längenmarker: -DNA-BstEII (Fragmentgrößen siehe oben)

8.4 Transformation

8.4.1 TSS-Transformation

Diese Transformation wurde nach Chung (Chung *et al.*, 1989) durchgeführt. LB-Medium wird mit einer frischen Vorkultur des gewünschten Stammes angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3-0,4 inkubiert. Für einen Transformationsansatz werden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl eiskaltes 2x TSS gemischt und 1-5 µl Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wird 20 min auf Eis inkubiert, danach für die phänotypische Expression für 30-60 min bei 37°C inkubiert und dann auf Selektionsplatten ausplattiert.

2X TSS (in LB gelöst):	20% (w/v)	PEG-6000
	10% (v/v)	DMSO
	100 mM	MgSO ₄

8.4.2 Transformation mit CaCl₂ behandelten Zellen

Herstellung kompetenter Zellen (CaCl₂):

Eine ÜN-Kultur des gewünschten Bakterienstammes wird zum Animpfen einer neuen Kultur (hier: 250 ml NZA) verwendet und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1-0,2 wachsen gelassen, danach sofort in eiskalte Zentrifugenröhrchen (z.B. GSA, 250 ml) gefüllt und bei 5000 rpm 5-10 min, 4°C, abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird vorsichtig in 1/2 Vol. eiskaltem 50 mM CaCl₂/10 mM PIPES pH 6,6 resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert. Danach wird es 5-10 min bei 4°C inkubiert und bei 3000-4000 rpm abzentrifugiert.

Das Pellet wird in 1/20 des Ausgangsvolumen in 50 mM CaCl₂/10 mM PIPES (pH 6,6)/15 % Glycerin resuspendiert. Die Zellen werden nun in Aliquots (z.B. à 200 µl) abgefüllt, die Zellen bleiben dabei 30 min auf Eis inkubiert. Schließlich werden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Transformation:

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut, danach wird die gewünschte DNA-Menge dazugegeben (1-10 µl) und dann der Ansatz weitere 12 min auf Eis inkubiert. Der folgende Hitzeschock geschieht für 2 min bei 42°C, danach folgt wieder eine kurze Inkubation auf Eis (2-10 min). Abschließend erfolgt die phänotypische Expression mit der Zugabe von 1 ml LB, der Inkubation des Ansatzes von 30-60 min bei 37°C und dem Ausplattieren auf Selektionsplatten.

8.4.3 Elektrotransformation

Vorbereitung der Zellen (*Escherichia coli*) für die Elektrotransformation:

Frisches Medium (z.B. SOP-Medium) wird mit Zellen aus einer ÜN-Kultur 1:100 angeimpft. Man läßt die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 wachsen, inkubiert sie dann für 15-30 min auf Eis und zentrifugiert sie danach in einem kalten Rotor (4°C) mit 4000-6000 rpm ab. Das Zellpellet wird in einem Volumen eiskaltem, destillierten Wasser resuspendiert und erneut wie oben abzentrifugiert. Das Zellpellet wird wiederum resuspendiert, diesmal in 1/2 Volumen Wasser, abzentrifugiert, in 1/50 Volumen 10% Glycerin/H₂O resuspendiert, abzentrifugiert, das Pellet in 1/500 Vol 10% Glycerin/H₂O resuspendiert und

abschließend in Aliquots von 40 µl abgefüllt. Die gewaschenen Zellen können nun direkt für eine Transformation verwendet oder bei -70°C eingefroren und gelagert werden.

Elektrotransformation:

Eingefrorene Zellaliquots werden auf Eis aufgetaut. Danach wird DNA (1 µl) zugegeben und das Gemisch in eiskalte Elektroporationsküvetten eingefüllt. Diese werden in die Pulschammer des Elektroporationsgerätes gestellt und dann der Elektroporationsvorgang durchgeführt (verwendete Gerätewerte: 25 µF Kapazität; 1,5 oder 2,5 kV Spannung je nach verwendeten Küvetten; 200 Widerstand am Pulscontroller). Die Küvetten werden nach dem Pulsen sofort dem Gerät entnommen und 1 ml Medium (z.B. LB, SOP) zugegeben. Die Zellsuspension wird dann in ein Eppendorfreaktionsgefäß oder Glasröhrchen eingefüllt und für die phänotypische Expression für eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Danach wird der Ansatz auf einer Selektionsagarplatte ausplattiert.

8.5 M13-Einzelstrang-DNA Mutagenese

Für die Oligomutagenese der 6. und 8. Transmembrandomäne wurden degenerierte Oligonukleotide eingesetzt. Die Oligomutageneseprimer wurden so synthetisiert, daß pro Syntheseschritt 98% wildtypisches Nukleotid mit jeweils 0,7% der nicht-wildtypischen Nukleotide gemischt und eingesetzt wurden. Die Oligomutageneseprimer enthalten somit eine zu ca. 2% degenerierte Sequenz. Die meisten dieser Oligonukleotide besitzen folglich die WT-Sequenz und die Mehrheit der veränderten Nukleotide nur einen einzigen Basenaustausch, der zum Triplet einer anderen Aminosäure führen kann.

Oligonukleotide:

Die wildtypische DNA-Sequenz für die sechste Transmembrandomäne (bp 1107-1176) lautet:

5'-CACGATGCTAATTATCGTCAATACCTGGCTGGGTTATCCGTACATGATGATCCTCTG
CATGGGCTTGCTG-3'

Die wildtypische DNA-Sequenz für die achte Transmembrandomäne (bp 1447-1515) lautet:

5'-GACTTCGGTCTGGCGGCAGCAATTGCCACGCTGATCTTCCTGCTGGTGGGTGCGCTG
GCGATAGTGAAC-3'

Oligomutagenese:

Durchführung der Annealing-Reaktion:

- 75 ng Mutagenese-Oligonukleotid
- 10 ml ssDNA (M13 Helferphage f1R408 mit pDHB32)
- 2 µl Annealing Puffer
- H₂O ad 20 µl

Der Ansatz wird für 2 min bei 85°C erhitzt, danach in einem größeren Volumen langsam auf 37°C abgekühlt. (hier: ca. 1 l 85°C warmes Wasser in ein 2 l Becherglas füllen).

Durchführung der Auffüllreaktion und Herstellung eines Nukleotidmix:

Pro Annealing-Reaktionsmix (20 µl) werden 50 µl Oligonukleotidmix zugegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Der restliche Nucleotidmix wird verworfen. Nach der Inkubation bei 37 °C kann die Mischung der Auffüllreaktion eingefroren werden.

Nucleotidmix:

20 µl dATP	(10 mM)
20 µl dCTP	(10 mM)
20 µl dGTP	(10 mM)
20 µl dTTP	(10 mM)
6 µl ATP	(100 mM)
60 µl KL32 Puffer	(10x Puffer)
1 µl T4 Ligase	(4 U/µl)
3 µl DNA-Polymerase Klenow	(5 U/µl)
3,0 µl T4 Gen32 Protein	(5 mg/ µl)
H ₂ O ad 600 µl.	

Anschließend geschieht die Hitzeinaktivierung der Ligase und DNA-Polymerase, falls eine Elektrotransformation durchgeführt werden soll. Die Mischung der Auffüllreaktion wird dabei für 10 min bei 75°C inkubiert.

Von der Auffüllreaktion wird 1 µl via Elektrotransformation in den *E. coli*-Stamm DHB4*mutS* transformiert.

Falls eine Konzentrierung der DNA der Auffüllreaktion gewünscht wird, muß deren Fällung durchgeführt werden. Man gibt zu:

10 µl 3M NaAcetat
300 µl Ethanol

Der Ansatz wird 30 min bei -70°C inkubiert, 15 min zentrifugiert, das getrocknete Pellet in gewünschtem Volumen H₂O (z.B. 10-20 µl) aufgenommen.

1x Annealing Puffer:

50 mM Tris pH 8,0
20 mM KCL
7 mM MgCl ₂

10x KL32 Puffer:

330 mM Tris-Acetat pH 7,8
100 mM Mg-Acetat
50 mM DTT

8.6 Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Das Prinzip der hier angewandten Dideoxy-Methode geht zurück auf Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977).

Benötigt wird eine saubere (proteinfreie), RNA- freie doppelsträngige (ds) Plasmid-DNA, 2-5 µg. Die Qualität und Quantität einer Plasmidpräparation mit dem QIAwell-8-Kit (Minipräps) der Firma Diagen ist ausreichend.

a) Denaturierung der ds-DNA:

2-5 µg DNA (hier: 8 µl einer Miniprep. mit 20 µl Endvolumen) werden mit 3 µl 2 M NaOH versetzt und 5-10 min bei RT inkubiert.

b) DNA-Fällung: Es werden 9 μ l 3 M NaAc pH 4,8 und 150 μ l 100 % EtOH zugegeben; bei -70°C (flüssiger Stickstoff) wird für 30 min inkubiert, das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und getrocknet.

c) Annealing-Reaktion des Primers:

Das getrocknete DNA-Pellet wird folgendermaßen aufgenommen:

2 μ l Primer
2 μ l Sequenase-Puffer
6 μ l H₂O

d) Hybridisierungsreaktion:

Die Proben werden bei 37°C inkubiert (Hybridisierung). Die Abkühlung der Proben auf eine Temperatur unter 30°C soll mindestens 30 min dauern.

e) Sequenase-Reaktion:

Der folgende Reaktionsmix zur DNA-Synthese wird zusammengestellt (am besten in dreifacher Menge herstellen, für je 3 Annealing-Reaktionen. Die Sequenase erst dazugeben, wenn der Mix zu einem Annealing Ansatz zugegeben wird) :

1 μ l 0,1 M DTT
0,4 μ l Labeling Mix
0,5 μ l 35SdATP
0,25 μ l Sequenase
3,5 μ l H₂O
(= 5,65 ml)

Pro Annealing-Ansatz werden 5,5 ml des Sequenase-Reaktionsmixes zugeben und 2-5 min bei RT inkubiert.

f) Stoppreaktion:

Auf 2,5 ml vorgewärmte ddNTP's (2-5 min bei 37°C) werden 3,5 ml des Sequenziermixes gegeben und 3-5 min bei 37°C inkubiert.

Pro Reaktion werden 4,5 ml Stopsolution gegeben. Die Proben können nun eingefroren werden. Sie sind 1-2 Monate haltbar.

Vor dem Auftragen der Proben auf ein Sequenziergel diese wenigstens 3 min auf 75°C erhitzen (Reduktion von Sekundärstrukturen der synthetisierten DNA). (Gegebenenfalls vor dem Erhitzen ein Loch in den Deckel des Eppendorfreaktionsgefäßes stechen).

8.7 Sequenziergele

Für ein 4 %iges Sequenziergel (4 % Acrylamid) gibt man zusammen:

31,5 g Harnstoff
33,75 ml H₂O
7,5 ml 10 x TBE
7,5 ml Acrylamid (40 %)

Den Harnstoff lösen, den Ansatz durch einen Faltenfilter filtrieren. Diese Gellösung reicht für ein einziges Gel und entspricht einer ca. 4 % Acrylamid-Endkonzentration. Danach Zugabe von APS und TEMED (siehe unten).

Ist bereits eine 4 %ige Stammlösung Acrylamid/Bisacrylamid angesetzt, gibt man zusammen:

60 ml Stammlösung (4 %)
600 ml 10 % APS
60 ml TEMED

Die Polymerisation des Sequenziergels soll mindestens 30 min dauern.

Gellauf (LKB-Pharmacia-System):

Vor dem Auftragen der Proben das Gel 30 min bei einer Spannung von 2000 V warmlaufen lassen (Pumpe für die Thermoplatte: 2000 W, 55°C). Nach dem Gellauf wird die Glasplatte mit dem Gel abgenommen und 15-30 min in 10 % Essigsäure inkubiert (schütteln), danach 15-30 min in H₂O inkubiert (schütteln). Das Gel wird anschließend im Trockenschrank (ca. 75 °C) 1/2 - 1 h getrocknet. Für die Autoradiographie wird das Gel samt Glasplatte und einem Röntgenfilm zwischen zwei Spanplatten in der Dunkelkammer eingespannt und über Nacht im Dunkeln liegengelassen.

8.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

Für Klonierungen wurden Standardmethoden verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Restriktionsansätze, Ligierung und sonstige enzymatische Reaktionen wurden nach den Empfehlungen der Hersteller (siehe unter Labormaterial, Chemikalien und Enzyme) der jeweiligen Restriktionsenzyme, Ligasen und sonstigen Enzyme durchgeführt.

8.8.1 Konstruktion der *malF-phoA*-Fusionen

Um die Membraninsertion der Transmembrandomäne 6 von MalF zu untersuchen, wurden MalF-PhoA-Fusionsproteine hergestellt. Der Fusionspunkt der beiden Proteine liegt C-terminal von TM 6 in *malF* in pDHB32 an der BspEI-Schnittstelle. Hier wurde pDHB32 linearisiert und die überstehenden Enden aufgefüllt. Aus pSWFII wurde das Gen der signalsequenzlosen Alkalischen Phosphatase mit SmaI und EcoRV ausgeschnitten (blunt ends) und in die BspEI-Stelle eingesetzt (Abbildung 1). Die ligierten Plasmide wurden in DHB4*recA* transformiert und die korrekten Produkte durch Blaufärbung auf XP-Platten identifiziert. Die betreffenden Stämme wurden gereinigt, die Plasmide präpariert und sequenziert. Dabei wurde überprüft, ob die gewünschte TM 6-Sequenz vorhanden war und ob der Fusionspunkt und das Leseraster in Ordnung waren. Dies war bei allen ausgewählten und weiter untersuchten Fusionen der Fall.

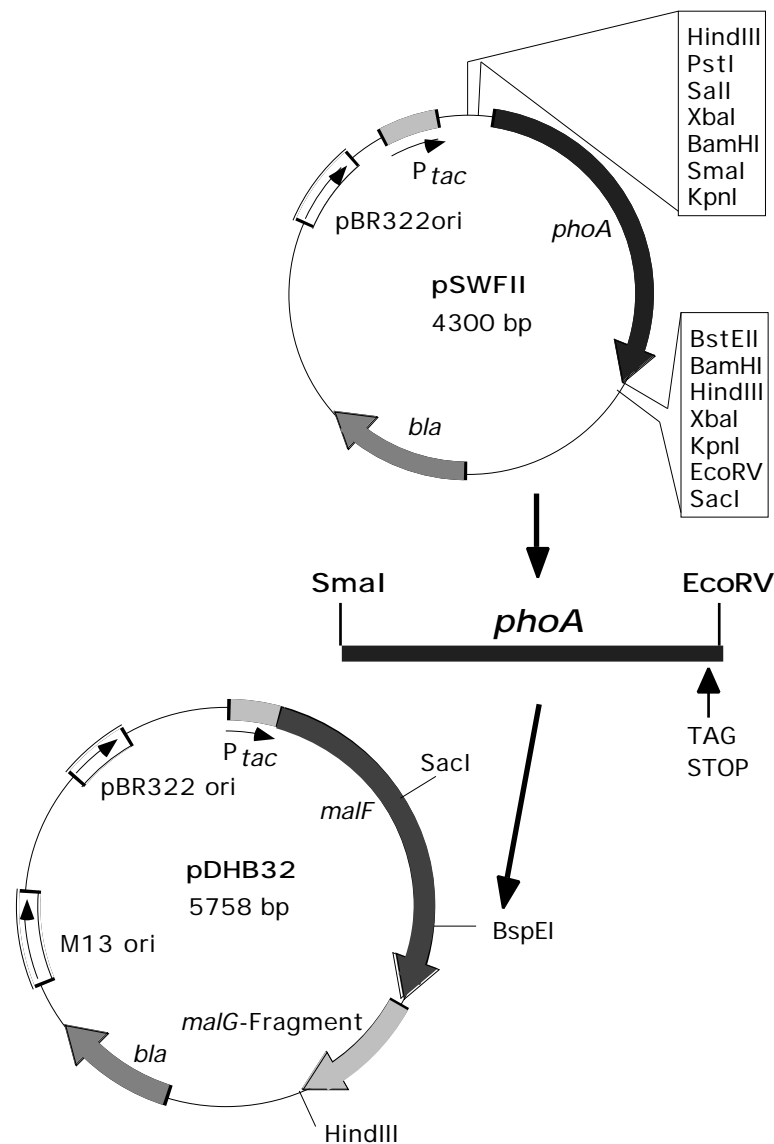


Abbildung 3. Konstruktion von *malF-phoA*-Fusionen

Das Plasmid pSWFII trägt *phoA* unter Kontrolle des P_{tac} -Promotors. Das Plasmid pDHB32 trägt *malF* unter Kontrolle des P_{tac} -Promotors. Wichtige Merkmale der Plasmide sind eingezeichnet.

Zur Konstruktion der *malF-phoA*-Fusionen siehe Text.

8.8.2 Konstruktion der *malF III-phoA*-Fusionen

Für die Herstellung dieser Fusionen wurden die unter 9.8.1 beschriebenen Fusionen verwendet. Die Deletion der Transmembrandomäne 3 (= III) wurde aus einer anderen Fusion durch Klonierung übernommen. Dies war die MalF-PhoA-Fusion Q III auf pDHB32, hergestellt und beschrieben in McGovern *et al.*, 1991. Aus dieser Fusion wurde das SacI-HindIII-Fragment mit der Deletion von TM 3 herausgeschnitten und gegen das SacI-HindIII-Fragment der unter 9.8.1 beschriebenen Fusionen ausgetauscht (vergl. Abb. 1) Die richtigen

Konstrukte wurden aufgrund der erhöhten Blaufärbung von DHB4*recA*-Kolonien auf XP-Platten und durch Restriktionsanalyse identifiziert und isoliert.

8.9 Stammkonstruktion durch Transduktion mit dem Bakteriophagen P1

8.9.1 Herstellung eines P1-Lysats

Die zur Herstellung von P1-Lysaten und von P1-Transduktionen verwendete Methode stammt von Silhavy *et al.* (Silhavy *et al.*, 1984).

Die ÜN-Kultur eines gewünschten Donorstamms wird verwendet um 3 mal 5 ml frisches LB-Medium 1:100 anzupflanzen. Wenn die wachsende Kultur die OD₅₇₈ von 0,3-0,5 erreicht hat, werden jeweils 100 µl 1M CaCl₂ mit einmal 10 µl und einmal 100 µl eines P1_{vir}-Starterlysats versetzt (auf MC4100 vermehrt) und eine Kontrolle ohne Phagen verwendet. Die Kulturen werden weiter bei 37°C inkubiert, bis die Lyse der Zellen eingetreten ist (4-6 Stunden), mindestens aber 1 Stunde. Zum Lysat werden einige Tropfen (ca. 15) Chloroform zugegeben, dann wird gründlich gevortext. Die Zelltrümmer werden durch abzentrifugieren bei 6000-7000 rpm in 15 min pelletiert, der Überstand anschließend in ein Schraubdeckelröhrchen überführt, einige Tropfen Chloroform dazugegeben und bei 4°C aufbewahrt.

8.9.2 P1-Transduktion

Aus einer ÜN-Kultur des Rezipientenstammes wird frisches LB-Medium 1:100 angeimpft und die neue Kultur bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4-0,5 bei 37°C wachsen gelassen. Je 1 ml dieser Kultur wird mit 7,5 µl 1 M CaCl₂, 10 µl 1 M MgSO₄ und außerdem mit 1, 10 oder 100 µl P1-Lysat oder ohne P1-Lysat (als Kontrolle) (als weitere Kontrolle können nur 100 µl P1-Lysat ohne Zellen weiterbehandelt werden) versetzt, gemischt und 20 min bei RT stengelassen (Adsorption der Phagen an die Lipopolysaccharide der bakteriellen Außenmembran). Danach gibt man 100 µl 1M NaCitrat zu (welches die weitere Infektion stoppt), vortext und inkubiert die Zellen für die phänotypische Expression bei 37°C für 1 Stunde. Schließlich folgt das Ausplattieren auf Selektionsagarplatten.

8.9.3 Stammkonstruktionen

RE10 wurde folgendermaßen konstruiert: Ein P1-Lysat aus RIM90 (*malT*::Tn10) wurde in den *E. coli*-Stamm DHB4 transduziert und anschließend auf Tetracyclin selektiert. Die ausgewählte Kolonie wurde auf die Anwesenheit von F'*lacI* getestet und mit einem P1-Lysat aus JB3018-2 (*malT*^c-1) behandelt. Um Tet-sensitive Transduktanten zu identifizieren, wurden die Zellen nach dieser Transduktion Replika-plattiert. Die ausgewählte Kolonie (RE10) war Tet-sensitiv, F'*lacI*⁺ und nach Transformation mit pDHB32 (*bla*, *malF*) Mal⁺ Amp^r.

RE11 wurde konstruiert, indem ein P1-Lysat aus ME347 (*malK-lacZ*; Kan-Resistenz) in den Stamm RE10 transduziert und auf Tetracyclin und Kanamycin selektiert wurde. Die ausgewählte Kolonie wurde wiederum auf die Anwesenheit von F'*lacI* getestet.

9. Biochemische Methoden

9.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im wesentlichen wurde die Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970) angewandt. Die verwendeten Ganzzellproben wurden aus ÜN-Kulturen hergestellt. Dabei wurde die Probe einer Kultur gegebenenfalls auf eine bestimmte OD₅₇₈ eingestellt und mit 2x Proteinprobenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt. Sollte das Membranprotein MalF gezeigt werden, wurden die Proben nicht wie üblich bei 95°C erhitzt und dann auf das Gel aufgetragen, sondern die Zellen nur durch Einfrieren und Auftauen lysiert, die DNA durch Zugabe von Benzonase bei RT auf dem Schüttler verdaut. In der Regel wurden diese Gele durch Western Blotting weiter analysiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mit 10%igen SDS-Minigelen (Mini-ProteanII-System der Firma Biorad).

1x SDS-Probenpuffer: 60 mM TRIS-HCl pH 6,8; 2% SDS, 10% Glycerin, 4% DTT, 0,1% Bromphenolblau.

9.2 "Westernblotting" (Immunoblotanalyse)

Zum immunologischen Nachweis hauptsächlich von MalF und MalF-PhoA-Konstrukten wurden SDS-Polyacrylamidgele nach einem Protokoll von Towbin (Towbin *et al.*, 1979) auf eine Polyvinyliden-Difluorid (PVDF-) -Membran (Immobilon; 0,45 µm Porengröße; Fa. Millipore) übertragen. Das Blotting und die Entwicklung des Blots wurde entsprechend eines Protokolls von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Für den Nachweis von MalF wurden polyklonale Antikörper gegen MalF (Traxler & Beckwith, 1992) in einer Verdünnung von 1:20000 oder (im Anschluß an Proteolyseexperimente) 1:5000 gegen MalF eingesetzt. Dieser primäre Antikörper wurde durch eine Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase eines sekundären Antikörpers, einem "anti-rabbit" IgG-AP-Konjugat, nachgewiesen. Als "blocking"-Puffer und als Puffer, in welchem die Antikörper verdünnt und angewendet wurden, wurde TBST verwendet.

TBST-Puffer: 20 mM TRIS-HCl pH 7,5
150 mM NaCl
0,1% Tween-20

9.3 Bestimmung der Alkalische Phosphatase-Aktivität

Durch diesen Enzymtest wird die Aktivität exprimierter, aktiver Alkalische Phosphatase (AP) in *E. coli*-Zellen quantitativ bestimmt. Im Prinzip werden Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase oder aus einer ÜN-Kultur permeabilisiert, gewaschen und dann die Hydrolyse-Rate des zugegebenen para-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu para-Nitrophenol photometrisch gemessen. Der Alkalische Phosphatase-Test wurde dabei entsprechend dem Protokoll von Michaelis *et al.* (Michaelis *et al.*, 1983) durchgeführt.

Die AP-Aktivität wird in Units angegeben und besagt, wieviel µmol pNPP pro min und mg Gesamtzellprotein hydrolysiert wurden.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel: AP-Aktivität [Units] = $OD_{420} \times 1000 / (t \times OD_{600} \times V_Z)$

OD₄₂₀: Optische Dichte von pNPP bei 420 nm
OD₆₀₀: Optische Dichte der verwendeten Zellkultur bei 600 nm
t: Reaktionszeit der Alkalischen Phosphatase in min
V_Z: Volumen der eingesetzten Zellsuspension in ml (hier: 0,1 ml)

Die Messungen der in dieser Arbeit konstruierten und vorgestellten MalF-AP- und MalF-AP III-Fusionen wurden pro Fusion drei bis acht mal durchgeführt. Unterschiede zwischen den Derivaten bezüglich der AP-Aktivität bei ÜN-Kulturen oder log-Kulturen wurden nicht festgestellt.

9.4 Maltose-Transporttest

Der Transporttest wurde mit ganzen Zellen ausgeführt, die über Nacht in MMA-Medium mit 0,2% Glycerin und 0,2% Maltose (zur Induktion der *mal*-Gene) als Kohlenstoffquellen gewachsen waren. Die Zellen wurden dreimal in MMA-Medium gewaschen und auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt. Der Transporttest mit ¹⁴C-Maltose wurde bei einer Endkonzentration von 2 µM Maltose durchgeführt; ansonsten war die Verfahrensweise wie bei Brass *et al.* (Brass *et al.*, 1983) beschrieben. Alle Transporttests bei Mutanten mit mehr als 2% der Transportrate des WT (Hintergrund 2%) wurden mindestens 3 mal durchgeführt und davon der Mittelwert berechnet.

9.5 Proteolyse von MalF in Sphäroplasten

Die Proteolyse von MalF-Mutanten in Sphäroplasten mit Proteinase K wurde im Stammhintergrund RE10 durchgeführt. In diesem Stamm wird das auf pDHB32 codierte MalF auf dem Niveau des chromosomal codierten MalF des *E. coli*-Stammes KS272 exprimiert (ohne die Induktion durch IPTG).

Über Nacht werden Vorkulturen in LB mit 0,4% Maltose und den entsprechenden Antibiotika bei 37°C und 42°C angezogen. Damit wurden die für die Tests verwendeten Kulturen (dasselbe Medium) auf eine OD₅₇₈ von 0,05 angeimpft und bei denselben Temperaturen 37°C bzw. 42°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 inkubiert. Dann werden Proben von jeweils 1 ml Zellen abzentrifugiert, einmal in 1 ml eiskaltem TMK-Puffer gewaschen und in 500 µl eiskaltem TMK/40% Sucrose-Puffer resuspendiert. Die Sphäroplasten werden hergestellt durch die Zugabe von 5 µl EDTA (0,5 M) und 50 µl Lysozym (1 mg/ml) und einer 30 min-Inkubation auf Eis. Danach wird bis auf die Kontrollansätze Proteinase K zugegeben (Enkonzentration: 100 µg/ml) und für weitere 1,5 Stunden auf Eis inkubiert. Die Proben werden schließlich mit einem Volumen 20%igem, eiskaltem TCA versetzt, gevortext, 15 min auf Eis inkubiert und ca. 30 sec. abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 1 Volumen eiskaltem Aceton zweimal gewaschen, dann kurz (5 min) getrocknet und in 100 µl Proteinprobenpuffer resuspendiert. Die Proben werden anschließend durch ein 10%iges SDS-PAA-Gel aufgetrennt und dieses durch einen Western-Immunoblot analysiert.

TMK-Puffer: 33 mM TRIS-HCl pH 8,0
100 mM KCl
5 mM MgSO₄

IV. Ergebnisse

1. Identifizierung und Charakterisierung funktionell wichtiger Aminosäuren in MalF

1.1 Die Suche nach Mutationen

1.1.1 Mutagenese der Transmembrandomäne 6 und 8 von MalF

Die vorliegende Arbeit verfolgte hauptsächlich zwei Ziele: Zum einen sollten vermutete wichtige Aminosäuren und Sequenzbereiche im C-Terminus von MalF gefunden werden, die für die Funktion und Konformation dieses Proteins und damit auch für den Maltose- und Maltodextrintransporter eine essentielle Bedeutung besitzen. Zum anderen sollte die tatsächliche funktionelle Bedeutung solcher Aminosäurepositionen durch verschiedene Fragestellungen mit entsprechenden experimentellen Ansätzen (siehe unten) genauer definiert werden.

In dieser Arbeit wurden daher die C-terminalen Transmembrandomänen (TMs) 6 und 8 von MalF genauer untersucht (TM 7 wurde parallel dazu von einer Kollegin analysiert).

Über Aminosäuresubstitutionen durch spezifische Mutagenese der TMs sollten diese essentiellen Positionen identifiziert werden. Gesucht wurde nach Mutanten, die einen reduzierten bis überhaupt keinen Maltosetransport mehr aufweisen.

Durch die Verwendung einer Mischung degenerierter Oligonukleotide wurden die Sequenzabschnitte der 6. (As 370-392) und der 8. (As 484-504) Transmembrandomäne von *malF* auf pDHB32 mutagenisiert. Die mutagenisierten Plasmide wurden in den *malF*⁻-Stamm DHB4*recA* transformiert und auf MacConkey/Maltose-Agarplatten über Nacht bei 28°C, 37°C und 42°C inkubiert. Das Wachstum bei 28°C bzw. 42°C sollte kältesensitiv bzw. temperatursensitiv transportierende Kolonien aufspüren. Alle Kolonien, die nicht die wildtypische dunkelrote Farbe aufwiesen, sondern von einem hellrot über rosa bis hin zu weiß variierten, wurden ausgewählt und durch das Ausstreichen auf Einzelkolonien gereinigt. Die Plasmid-DNA dieser Kolonien wurde isoliert und der mutagenisierte *malF*-Abschnitt sequenziert.

Durch diesen Plattentest konnten insgesamt 14 Punktmutanten, 6 Doppel(-Punkt)mutanten und 1 Dreifach(-Punkt)mutante in der 6. Transmembrandomäne von MalF isoliert werden (Tabelle 5).

In der 8. Transmembrandomäne wurden insgesamt 13 Punktmutanten, 6 Doppel(-Punkt)mutanten, 3 Dreifach(-Punkt)mutanten und 1 Vierfach(-Punkt)mutante gefunden (Tabelle 6).

Einige Mutationen wurden mehrfach und unabhängig voneinander isoliert.

Die folgenden Mutationen habe ich nicht selbst isoliert, sondern wurden mir für meine Untersuchungen zur Verfügung gestellt:

Transmembrandomäne 6: *malF652*, *malF611*, *malF66*

Transmembrandomäne 8: *malF62281*, *malF62284*, *malF8330*, *malF8337*

Tabelle 5: Mutationen in der 6. Transmembrandomäne von MalF^a

malF Allel	370	375	380	385	390																		
TM 6	ACG	ATG	CTA	ATT	ATC	GTC	AAT	ACC	TGG	CTG	GGT	TAT	CCG	TAC	ATG	ATG	ATC	CTC	TGC	ATG	GGC	TTG	CTG
Wildtyp	Thr	Met	Leu	Ile	Ile	Val	Asn	Thr	Trp	Leu	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Met	Met	Ile	Leu	Cys	Met	Gly	Leu	Leu
647	...	ATA
		Ile																					
616	CGA
(4x)			Arg																				
651	ACC
(2x)					Thr																		
64	AAG
(3x)						Lys																	
641	CAT
						His																	
652	ACT
						Thr																	
611	AGG
							Arg																
6190	CAG
								Gln															
623	GAT
									Asp														
615	TGT
									Cys														
620	AGT
									Ser														
666	TCC
										Ser													
621	CCC
																		Pro					
66	CAC
																		His					
Doppelmutationen																							
644	...	CGA	ATA	...	GAC
		Arg(Ile)	Asp																				
619	CAG	GTT
							Gln	Val															
665	AAT	TGC
								Asn										Cys					
648	CTG	CAG
(2x)								Leu	His														
626	CAG	AGG
									His									Arg					
660	AAC	CAC
																		Asn	His				
Dreifachmutation																							
624	TGC	TTC	...	CTG
										Cys								Phe		Leu			

^a Die oberste Zeile der Tabelle gibt die wildtypische DNA- und Aminosäuresequenz an. Das bei einer Mutante veränderte Codon (Fettdruck des veränderten Nukleotids) der DNA-Sequenz ist aufgeführt, darunter die resultierende Aminosäure. Die Anzahl mehrfach gefundener Allele ist in Klammern angegeben.

Tabelle 6: Mutationen in der 8. Transmembrandomäne von MalF^a

<i>malF</i> Allel	485	490	495	500
TM 8	TTC GGT CTG GCG GCA GCA ATT GCC ACG CTG ATC TTC CTG CTG GTG GGT GCG CTG GCG ATA GTG			
Wildtyp	Phe Gly Leu Ala Ala Ala Ile Ala Thr Leu Ile Phe Leu Leu Val Gly Ala Leu Ala Ile Val			
831	... GTT ...			
(6x)	Val			
816 CCG ...			
(2x)	Pro			
842 CCA ...			
(3x)	Pro			
8033 GAC ...			
	Asp			
843 AGG ...			
	Arg			
846 AAC ...			
	Asn			
860 CTC ...			
(2x)	Leu			
84 TTG ...			
(2x)	Leu			
811 CCG ...			
(2x)	Pro			
62281 GTG ...			
	Val			
827 CGG ...			
(2x)	Arg			
62284 CAG ...			
	Gln			
853 ATG ...			
	Met			
Doppelmutationen				
836 GTG ...			GTG ...
	Val			Val
847 CCG ...			CTG ...
	Pro			Leu
834 ACC TAC ...			
	Thr Tyr			
838 TCC ...			CGT ...
	Ser			Arg
8330 TGG ...			GAT ...
	Trp			Asp
8337 CAG ...			GAT ...
	Gln			Asp
Dreifachmutationen				
826	CTC ...	ACT ...	ATC ...	
	Leu	Thr	Ile	
89	... GTT CAG ...	AAT ...		
	Val Gln	Asn		
855 AAT ...	AAC ...		AGA ...
	Asn	Asn		Arg
Vierfachmutation				
815	... CGT ...		CGG CAG ...	TCG ...
	Arg		Arg Gln	Ser

^a Die oberste Zeile gibt die wildtypische DNA- und Aminosäuresequenz an. Das bei einer Mutante veränderte Codon (Fettdruck des veränderten Nukleotids) der DNA-Sequenz ist aufgeführt, darunter die resultierende Aminosäure. Die Anzahl mehrfach gefundener Allele ist in Klammern angegeben.

1.1.2 Umkehrmutagenese

Um auszuschließen, daß nach der Mutagenese Mutationen in anderen Bereichen von *malF* entstanden waren, wurde mit Mutanten, die eine gut sichtbare Reduktion des Maltosetransports auf MacConkey/Maltose aufwiesen, eine weitere Mutagenese (Umkehrmutagenese) mit denselben Oligonukleotiden durchgeführt. Die verwendete Mischung der degenerierten Oligonukleotide enthält zu über 90% die Nukleotidsequenz des Wildtyps. Deshalb wurde erwartet, daß durch die Umkehrmutagenese mit entsprechender Frequenz wieder die wildtypische *malF*-Sequenz entsteht. Bei Mutanten, die bereits einen relativ roten Phänotyp auf MacConkey/Maltose besitzen, konnte der wildtypische Phänotyp nicht ausreichend von dem vorliegenden Phänotyp unterschieden werden. Eine Umkehrmutagenese für diese Mutanten wurde daher nicht durchgeführt. Alle untersuchten *malF*-Mutanten erlangten in der kalkulierten Frequenz (ca. 10-25%) durch die Umkehrmutagenese den wildtypischen (WT) Phänotyp zurück. Es waren dies für die 6. Transmembrandomäne die Allele *malF616*, *malF64*, *malF641*, *malF611*, *malF623*, *malF615*, *malF620*, *malF666*, und für die 8. Transmembrandomäne *malF831*, *malF816*, *malF842*, *malF843*, *malF827*, *malF838*, *malF855*, *malF815*.

Die Ergebnisse der Umkehrmutagenese mit diesen *malF*-Allelen zeigen, daß die durch die Sequenzanalyse identifizierten Mutationen auch die beobachteten Phänotypen verursachen.

Da weder bei Mutanten der 6. und 8. Transmembrandomäne (TM) noch bei der Umkehrmutagenese von Mutanten der TM 7 zusätzliche Mutationen entdeckt werden konnten (pers. Mitteilung M. Ehrmann), wurde die Wahrscheinlichkeit weiterer Mutationen in den restlichen *malF*-Allelen der 6. und 8. Transmembrandomäne von uns als sehr gering eingeschätzt.

1.2 Charakterisierung von Eigenschaften und Phänotypen der MalF-Mutanten

Die Hauptaufgabe nach der Isolierung der Mutanten war es, herauszubekommen, was an dem mutierten Protein nicht mehr funktioniert und warum.

Deshalb wurden verschiedene Auswirkungen der einzelnen isolierten Mutationen untersucht. Dazu gehörten zunächst die Expression der Mutanten, das Wachstum auf Maltose und Dextrin und der spezifische Maltosetransport.

1.2.1 Konservative und nicht konservative Aminosäuresubstitutionen in der Transmembrandomäne 6 und 8

Die Einteilung der Aminosäuren in konservative Gruppen wurde nach Creighton vorgenommen (Creighton, 1993). Sie beruht auf Vergleichen von Aminosäuresequenzen homologer, intakter Proteine und der empirischen Feststellung vorwiegend ausgetauschter Aminosäuren dieser vergleichbaren Wildtypsequenzen.

Es ist festzustellen, daß bei beiden Domänen mit großer Mehrheit nicht konservative Aminosäuresubstitutionen durch die Mutationen stattgefunden haben. In TM 6 sind 93% der Aminosäureaustausche nicht-konservativ und in TM 8 beträgt dieser Wert 77%. Die jeweils restlichen Austausche in TM 6 und TM 8 sind als konservativ zu bezeichnen.

1.2.2 MalF-Mutanten mit einer Instabilität *in vivo*

Als erstes wurde festgestellt, ob die mutierten Proteine stabil exprimiert werden.

Von allen *malF*-Mutanten auf pDHB32 in DHB4*recA* wurden Übernachtskulturen bei 37°C in NZA-Medium hergestellt. Aus diesen wurde das MalF-Protein über Ganzzellextraktproben durch PAGE und Westernblotting nachgewiesen.

Diese Westernblots zeigten, daß bei einigen Mutationen in der 6. und 8. Transmembrandomäne nur eine "partielle" Stabilität von MalF gegeben ist. "Partiell" bedeutet, daß die Proteinbande eines MalF-Derivats in wildtypischer Größe im Vergleich zum Wildtyp-MalF schwächer vorliegt und gleichzeitig Fragmente geringerer Molekulargewichtsgröße zu sehen sind. Die betreffenden Mutanten sind: *malF616*, *malF644* in TM 6 und *malF843*, *malF827*, *malF838*, *malF855* und *malF815* in TM 8 (Tabellen 8 und 9). Die genannten Westernblots werden hier nicht gezeigt (vergleiche aber unter IV.1.3.2 die Daten/Bilder der Proteasetests in den Abbildungen 7 und 8 (Proben ohne Proteasezugabe)).

Die partielle Stabilität könnte bedeuten, daß die betreffenden MalF-Derivate *in vivo* instabil sind, von zelluläre Proteasen als Substrat erkannt und abgebaut werden. Eine Möglichkeit für die Instabilität *in vivo* von MalF könnte eine veränderte/verschlechterte Membraninsertion der betreffenden Domäne oder des ganzen Proteins sein. Denkbar ist aber auch, daß die Zusammenlagerung von MalF mit MalG und MalK zum Transportkomplex nicht korrekt funktioniert. Diesen beiden Möglichkeiten wird unter IV.2. und IV.1.3 nachgegangen.

1.2.3 Maltosetransportaktivität der MalF-Mutanten

Um die Auswirkung der Mutationen auf den Maltosetransport zu quantifizieren, wurden Transporttests (bei Raumtemperatur) durchgeführt (siehe Material und Methoden) und mit dem wildtypischen Maltosetransport verglichen (Tabellen 8 und 9).

1.2.3.1 Maltosetransportraten

Es wurde mit der angewandten Methode keine Mutante entdeckt, die Maltose mit derselben hohen Transportrate wie der Wildtyp transportiert. Dieser Befund stimmt auch überein mit den zwar dunkelroten Färbungen der MacConkey-Phänotypen für sehr guten Maltosetransport, die aber alle etwas verschieden ausfielen und vom Wildtyp deutlich zu unterscheiden waren. Gleichwohl aber gibt es einige Mutanten mit einer dem WT vergleichbaren Transportrate. Wachstum und Transportraten korrelieren gut bei allen Mutanten (Tabellen 8 und 9).

Die Mutanten können nach dem Grad ihrer Transportbeeinträchtigung in drei Gruppen eingeteilt werden.

Die Mutanten der Gruppe 1 transportieren Maltose in dem quantitativen Bereich des Wildtyps (80-100%). Hierzu gehören die Mutanten in der TM 8 *malF846* (95% der WT-Rate), *malF62281* (87%), *malF62284* (82%) und die Doppelmutante *malF834* (95%).

Die in Gruppe 2 eingeordneten Mutanten besitzen Transportraten zwischen rund 20% und 80% der Wildtyprate. Es sind dies die Punktmutanten *malF647*, *malF651*, *malF652*, *malF6190* und *malF66* in TM 6 und *malF8033*, *malF860*, *malF84*, *malF811* und *malF853* in TM 8. Dazu gehören noch drei Doppelmutanten in TM 8: *malF836*, *malF8330* und *malF8337*.

Die Mutanten der Gruppe 3 transportieren weniger als 10% Maltose im Vergleich zum Wildtyp. Bei einigen dieser Mutanten konnte mit der angewandten Methode kein Maltosetransport mehr festgestellt werden, zum Teil aber noch geringfügiges Wachstum auf MMA-Maltose.

Folgende Punktmutanten wurden in Gruppe 3 eingeordnet: *malF616*, *malF64*, *malF641*, *malF611*, *malF623*, *malF615*, *malF620*, *malF666* und *malF621* in TM 6 und *malF831*, *malF816*, *malF842*, *malF843* und *malF827*. Außerdem befinden sich in dieser Gruppe alle Mehrfachmutanten von TM 6 und alle restlichen Mehrfachmutanten von TM 8, siehe Tabellen 8 und 9.

1.2.3.2 Vergleich der Transmembrandomänen 6 und 8 anhand des Maltosetransports der MalF-Mutanten

Interessant ist nun der Vergleich der beiden Transmembrandomänen 6 und 8 unter dem Gesichtspunkt der Maltosetransportaktivität (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich des Maltosetransports der Mutanten von TM 6 und TM 8^a

	Maltosetransport im Vergleich zum Wildtyp			
	Punktmutanten		Doppelmutanten	
	< 10%	> 50%	< 10%	> 50%
TM 6				
Menge d. Mutanten in %	64	7	100	0
TM 8				
Menge d. Mutanten in %	38	62	33	67

^a Die Tabelle zeigt die Menge der Mutanten (in %), die weniger als 10% oder mehr als 50% der Maltosetransportrate im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Es zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Transmembrandomänen 6 und 8 bzw. ihrer Mutanten (siehe Text).

Auffallend ist die durchschnittlich deutlich größere Beeinträchtigung des Maltosetransports durch die isolierten Mutationen in TM 6 gegenüber den auf die gleiche Weise isolierten Mutationen in TM 8. Im Gegensatz zu TM 8 mit 62% Mutanten mit einem Maltosetransport von über 50% wurde in TM 6 nur eine einzige solche Punktmutante (=7%) gefunden. Auch wurde in TM 6 keine einzige Mehrfachmutante isoliert, die einen Maltosetransport von über 10% gestattet, während in TM 8 immerhin noch rund zwei Drittel der Doppelmutanten eine Transportaktivität von mehr als 50% im Vergleich zum Wildtyp besitzen.

Diese Beobachtung wird durch die Maltose/MacConkey-Phänotypen aller Mutanten bestätigt. Den Mutanten der TM 8 mit hellroten und rosa Phänotypen für "gut sichtbare" Maltoseverwertung stehen nur rund halbsoviel Mutanten mit denselben Phänotypen in TM 6 gegenüber. (Der Standard für diesen Plattentest ist das Wachstum der jeweiligen Kolonien von zwei Tagen bei 37°C. Die Daten werden hier nicht gezeigt).

1.2.3.3 V_{\max} -Werte und K_m -Werte des Maltosetransports der isolierten Mutanten

Bei allen Mutanten der Maltosetransportgruppen 1-3 (mit meßbarem Maltosetransport) wurde der K_m -Wert für Maltose bestimmt. Es zeigte sich, daß die K_m -Werte der Mutanten alle in derselben Größenordnung von 0,9 μ M bis 10 μ M liegen und daß somit keine nennenswerten K_m -Defekte vorliegen (Daten werden nicht gezeigt).

Die Veränderungen im Maltosetransport der Mutanten bewirken hingegen eine Abnahme der maximalen Transportgeschwindigkeit V_{\max} von Maltose. Der niedrigste V_{\max} -Wert von noch meßbar transportierenden Mutanten war gegenüber dem Wildtyp um das ca. 60-fache herabgesetzt (Daten werden nicht gezeigt).

1.2.4 Phänotypen von MalF-Mutanten auf Minimal-Maltose-Platten

Die spezifische Maltosetransportrate charakterisiert eine Mutante in einem eingegrenzten, genauen experimentellen System. Darüber hinaus wurde das Wachstumsverhalten der Mutanten auf Minimal-Maltose-Platten (mit 0,2% Maltose als einziger Kohlenstoffquelle) über mehrere Tage hinweg untersucht. Denn Wachstum könnte unter diesen Bedingungen noch möglich sein, da die Transporttests einen sehr schwachen Transport möglicherweise nicht mehr erfassen. Außerdem wurden das Wachstum bei den Temperaturen von 28°C, 37°C und 42°C getestet. Denn es ist möglich, daß das Wachstumsverhalten bei unterschiedlichen Temperaturen variiert (siehe unter IV.1.2.8). Das jeweilige Wachstumsverhalten der Mutantenkolonien wurde mit dem des Wildtyps verglichen. Das "Wachstum in einem Tag" (Tabellen 8 und 9) entspricht einer Generationszeit von 102 min beim Wildtyp und 108 min bis 150 min bei Mutanten. Wachstum nach 2 Tagen bedeutet eine Generationszeit zwischen 170 min und 210 min. Konnte das Wachstum nach 4 Tagen nicht eindeutig als positiv beurteilt werden, wurde es als negativ (-) bewertet.

Von insgesamt 44 isolierten und getesteten Mutanten der TM 6 und TM 8 weisen 12 Mutanten das gleiche Wachstumsverhalten auf MMA-Maltose auf wie der Wildtyp. Es sind dies die Mutanten *malF647*, *malF6190* und *malF66* in TM 6 und *malF846*, *malF860*, *malF84*, *malF62281*, *malF62284*, *malF853*, *malF836*, *malF834* und *malF8330* in TM 8.

Kein Wachstum unter diesen Bedingungen zeigen die Mutanten *malF64*, *malF641*, *malF623*, *malF615*, *malF620*, *malF644*, *malF619*, *malF665*, *malF648*, *malF660* in TM 6 und in TM 8 *malF816*, *malF843*, *malF827*, *malF847*, *malF815*.

Übereinstimmend mit den Wachstumsdaten konnte bei diesen Mutanten auch kein Maltosetransport festgestellt werden. Bei einem Teil der Mutanten ist das Nichtwachstum auf instabiles MalF zurückzuführen (siehe unter IV.1.2.2), bei anderen Mal⁻-Mutanten ist MalF stabil.

Alle übrigen Mutanten von TM 6 und TM 8 weisen wenigstens bei einer der getesteten Temperaturen ein reduziertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp auf.

Die Mutanten mit dem dem Wildtyp gleichenden Wachstum von 1d (28°C), 1d (37°C) und 2d (42°C) auf Platten mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle besitzen Maltosetransportraten zwischen 95% (*malF846*) und 22% (*malF853*) der Wildtyprate. Für den wildtypischen Phänotyp auf MMA-Maltose reicht somit ungefähr ein fünftel des wildtypischen Transportes von Maltose aus.

1.2.5 Phänotypen von Mutanten auf Minimal-Dextrin-Platten und generelle Kategorien von Substratphänotypen

Der Plattentest mit Maltoheptaose als einziger Kohlenstoffquelle wurde verwendet, um unter den isolierten Mutanten veränderte Dextrin-Phänotypen im Vergleich zum Wildtyp ausfindig zu machen. Es stellte sich außerdem die Frage, ob eine gegebene Mutation den Maltosetransport in gleicher Weise beeinträchtigt wie den Dextrintransport. Sind Maltose- und Dextrintransport überhaupt voneinander unterscheidbare Vorgänge? Gibt es einen Transport von entweder Maltose oder Dextrin bei gleichzeitigem Fehlen der Transportfähigkeit des anderen Zuckers? Gibt es demnach eine (oder mehrere?) Substraterkennungsstelle in MalF/MalG wie von H. Shuman (Shuman, 1982) postuliert?

Wenn dem so wäre, könnten bei Wachstumstests mit Maltose und Dextrin generell fünf Kategorien verschiedener substratspezifischer Mutanten-Phänotypen möglich sein:

Kategorie I: Mal⁺Dex⁺. Eine gegebene Mutation hat keine Auswirkung auf den Substratphänotyp.

Kategorie II: Mal^{reduziert}Dex^{reduziert}.

Die Wachstumsfähigkeit auf Maltose oder Dextrin als einzige Kohlenstoffquellen ist jeweils in gleichem Maße vorhanden bzw. reduziert.

Kategorie III: Mal⁻Dex⁻.

Wachstum auf Maltose oder Dextrin als einzige Kohlenstoffquellen findet nicht statt.

Kategorie IV: Mal⁺Dex⁻. Abstufungen: Mal⁺Dex^{+/-} und Mal^{+/-}Dex⁻.

Das Wachstum auf Dextrin ist in dieser Kategorie immer stärker reduziert als das Wachstum auf Maltose.

Kategorie V: Mal⁻Dex⁺. Abstufungen: Mal⁻Dex^{+/-} und Mal^{+/-}Dex⁺.

Das Wachstum auf Maltose ist in dieser Kategorie deutlich schwächer oder wenigstens erkennbar schwächer als das Wachstum auf Dextrin.

In die Kategorien I - III sind Mutationen einzuordnen, die sich bezüglich Maltosetransport genauso verhalten wie im Hinblick auf den Dextrintransport. Den Kategorien IV und V dagegen sind Mutationen zuzuordnen, bei denen zwischen Maltosetransport und Dextrintransport differenziert werden kann.

Die in dieser Arbeit isolierten und untersuchten *malF*-Mutanten konnten alle in die Substratphänotypkategorien II-V eingeordnet werden (vergleiche Tabellen 8 und 9):

Kategorie I: Eine Mutation dieser Kategorie wurde nicht isoliert. Nach diesem Phänotyp wurde nicht gesucht.

Von allen untersuchten Mal- und Dex-Phänotypen sind die der Mutation *malF647* den wildtypischen am ähnlichsten. Die vorhandene Abweichung liegt im Wachstum auf Dextrin bei 28°C von 2d anstelle von 1d des Wildtyps. Allerdings beträgt der spezifische Maltosetransport dieser Mutante nur ca. 50% des Wildtyps, außerdem ist dieses MalF-Protein proteasesensitiv bei 42°C (siehe unten).

Kategorie II: in TM 6 *malF647*, *malF651* und *malF626*.

Kategorie III: in TM 6 *malF623*, *malF644*, *malF619*, *malF665*, *malF648*, *malF660* und in TM 8 *malF816*, *malF843*, *malF827*, *malF847*, und *malF815*.

Kategorie IV: in TM 6 *malF616*, *malF611*, *malF6190*, *malF621*, *malF624* und in TM 8 *malF831*, *malF842*, *malF8033*, *malF846*, *malF860*, *malF84*, *malF811*, *malF62281*, *malF62284* ; *malF853*, *malF836*, *malF834*, *malF838*, *malF8330*, *malF8337*, *malF826*, *malF89* und *malF855*.

Kategorie V: *malF64*, *malF641*, *malF652*, *malF615*, *malF620*, *malF666* und keine Mutante in TM 8.

Bisher unbekannt waren Mutationen der Kategorie V. Mutationen der Kategorie IV wurden bereits durch MBP-unabhängige Mutationen (Treptow & Shuman, 1988) und in MalG isoliert (Dassa, 1993). Die Existenz dieser beiden Kategorien läßt auf das Vorkommen einer Art Substraterkennungs- oder Bindestelle im MalF/MalG-Transmembranbereich des Transporters schließen.

Die Existenz der Substratphänotypen der Kategorie IV und V weist außerdem darauf hin, daß Maltose- und Dextrintransport (Maltoheptaose) voneinander unterscheidbare Transportvorgänge sein könnten. Die Substrate Maltose und Maltodextrin stellen zumindest teilweise unterschiedliche "Anforderungen" an das Transportsystem.

1.2.6 Spezifische Substrat-dominant negative Phänotypen

Maltose-Phänotypen und Dextrin-Phänotypen (Maltoheptaose) von MalF-Mutanten wurden zunächst getrennt untersucht. Die meisten Mutanten wachsen auf einer der beiden C-Quellen besser als auf der anderen. Aber welcher Phänotyp würde sich durchsetzen, wenn Maltose und Dextrin gleichzeitig vorhanden wären? Die Vermutung lag nahe, daß die beste Verfügbarkeit eines Substrates, d.h. das am besten zu transportierende Substrat bei einer gegebenen Mutation den Phänotyp bestimmt.

Der Wachstumstest auf MMA-Maltose/Maltodextrin-Platten zeigte, daß bei den meisten Mutanten von TM 6 und TM 8 diese Vermutung zutrifft.

Aber es gibt folgende interessante Ausnahmen (Tabellen 8 und 9): Es sind dies in TM 6 die Punktmutante *malF616* und in TM 8 die Dreifachmutante *malF89*, die einen Dextrin-dominant negativen Phänotyp besitzen. Das Wachstum dieser Mutanten, das mit Maltose gerade noch möglich ist, wird bei gleichzeitiger Anwesenheit von Maltoheptaose blockiert.

In den folgenden weiteren Mutanten ist das ansonsten "gute" Wachstum auf Maltose erheblich reduziert, wenn gleichzeitig Dextrin vorhanden ist: in TM 6 in *malF66* und in TM 8 in *malF831*, *malF8337* und *malF826*. Das schlechtere Wachstum auf Dextrin dominiert hier partiell über ein sonst wesentlich besseres Wachstum mit Maltose und erzeugt ein "neues" Wachstumsverhalten, das bezüglich der Größenordnung zwischen dem liegt, das von Maltose und Dextrin als alleinige Kohlenstoffquellen bewirkt wird.

Dieser Phänotyp war bisher unbekannt.

1.2.7 Vergleich der Transmembrandomänen 6 und 8 anhand der verschiedenen Substratphänotypen der *malF*-Mutanten

Ein Mal⁺Dex⁺-Phänotyp des Maltosetransporters war bisher unbekannt. Er wurde bei dieser Arbeit ausschließlich bei insgesamt sechs Mutanten mit verschiedenen quantitativen Abstufungen an den Positionen Y383, N376 und G380 im zentralen Bereich von TM 6 bei MalF gefunden. Außerdem lösen vier Mutanten in TM 6 Mal⁺Dex⁻-Phänotypen aus. Alle isolierten Mutanten der TM 8 bis auf die, die keinen Transport

und kein Wachstum aufweisen, zeigen Phänotypen der Mal⁺Dex⁻-Kategorie in verschiedener Ausprägung. Das könnte bedeuten, daß TM 8 hauptsächlich an der "Erkennung" langer Dextrine beteiligt und bei deren Transport involviert ist. Die TM 6 und die TM 8 von MalF unterscheiden sich also nicht nur in der Mutantenstatistik bezüglich des spezifischen Maltosetransports (siehe oben). Die TM 6 leistet offenbar einen sehr hohen Beitrag zum Maltosetransport, bei der TM 8 könnte dies dagegen auf den Dextrintransport zutreffen.

1.2.8 Temperatursensitivität und Kältesensitivität von *malF*-Mutanten

Die hier isolierten Mutationen in MalF beeinflussen vermutlich Funktion und/oder die Struktur/Konformation des Transporters. Beeinträchtigungen der Konformation könnten zu einer konditionalen Phänotypveränderung der MalF (MalF/MalG)-Funktion führen. Die isolierten Mutanten wurden deshalb auf die Kälte- und Temperatursensitivität (T^S) ihres Wachstums auf MMA-Maltose-Platten und MMA-Maltoheptaose-Platten untersucht. Dabei stellte sich auch die Frage, ob eine gegebene Sensitivität den Transport bzw. das Wachstum auf beiden Substraten, Maltose und Dextrin, gleichermaßen betrifft oder jeweils nur eines von ihnen.

Der Wildtyp-Stamm, DHB4*recA* mit pDHB32 war bei 28°C und 37°C jeweils nach einem Tag gewachsen, benötigte aber bei 42°C zwei Tage zu vollem Wachstum auf einer MMA-Maltose-Platte. Dieses etwas geringere Wachstum bei 42°C wurde bei der Interpretation der Daten zur Temperatursensitivität berücksichtigt.

Kältesensitivität, also deutlich geringeres Wachstum bei 28°C, wurde bei keiner der isolierten Mutanten entdeckt.

Bei insgesamt 11 Mutanten in TM 6 und TM 8 konnte ein temperatursensitives Wachstum (T^S) festgestellt werden, was auf eine Reduktion der MalF- (MalF/MalG-) Funktion bei zunehmender Temperatur hindeutet.

T^S auf Maltose bei gleichzeitig negativem Wachstum auf Dextrin fand sich in TM 6 und TM 8. Hierzu gehören in TM 6 die Mutanten *malF616*, *malF611*, *malF624* und in TM 8 *malF831*, *malF842*, *malF89* und *malF855*.

T^S auf Maltose bei gleichzeitig vollem Wachstum auf Dextrin wurde nur in TM 6 gefunden: Es sind die Mutanten *malF652* und *malF666*.

T^S auf Dextrin bei gleichzeitig vollem Wachstum auf Maltose wurde nur in TM 8 gefunden: Es sind die Mutanten *malF811* und *malF8330*.

T^S auf gleichzeitig Maltose und Dextrin wurde in zwei Doppelmutanten entdeckt: In TM 6 bei *malF626* und in TM 8 bei *malF838*.

Nicht entdeckt wurde temperatursensitives Wachstum auf Dextrin bei gleichzeitig reduziertem oder negativem Wachstum auf Maltose.

T^S und gleichzeitige Instabilität *in vivo* kommen nur bei zwei Mehrfachmutanten in TM 8 vor: *malF838* (Doppelmutante) und *malF855* (Dreifachmutante). Alle anderen T^S-Mutanten zeigten stabile Proteine im Westernblot (ÜN-Kultur bei 37°C).

Tabelle 8: Vergleichende Darstellung von Wachstumsverhalten, Transportaktivität und MalF-Expression der MalF-Mutanten der 6. Transmembrandomäne

MalF-Allel in DHB4 recA	MalF- Expres- sion (ÜN- Kultur)	Wachstum ^a auf MMA-Maltose [d]			Wachstum ^a auf MMA-Dextrin [d]			Wachstum ^a auf MMA- Dextrin+ Maltose [d]			Maltose- transport ^b in % der Wildtyprate	charakter- istischer Phänotyp ^c bzgl. WT
		28	37	42°C	28	37	42°C	28	37	42°C		
malF Wildtyp	+	1	1	2	1	1	2	1	1	1	100	Mal ⁺ Dex ⁺
Punktmutanten												
647 M ₃₇₁ I	+	1	1	2	2	1	2	1	1	2	47	Mal ⁺ Dex ⁺
616 L ₃₇₂ R	+	3	4	-	-	-	-	-	-	-	1	Mal ⁺ / ⁻ Dex ⁻ Dex ^{dom} neg T ^S
651 I ₃₇₄ T	+/-	3	2	3	3	3	3	3	2	3	21	MalF:Instabil in vivo
64 N ₃₇₆ K	+	-	-	-	2	2	3	2	2	2	1	Mal ⁻ Dex ⁺
641 N ₃₇₆ H	+	-	-	-	1	1	2	1	1	2	1	Mal ⁻ Dex ⁺
652 N ₃₇₆ T	+	2	2	4	1	1	2	1	1	2	22	Mal ⁺ / ⁻ Dex ⁺ T ^S
611 W ₃₇₈ R	+	3	3	-	-	-	-	3	3	-	2	Mal ⁺ / ⁻ Dex ⁻ T ^S
6190 L ₃₇₉ Q	+	1	1	2	2	1	3	2	1	2	78	Mal ⁺ Dex ⁺ / ⁻
623 G ₃₈₀ D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	Mal ⁻ Dex ⁻
615 G ₃₈₀ C	+	-	-	-	1	1	2	2	1	2	< 1	Mal ⁻ Dex ⁺
620 G ₃₈₀ S	+	-	-	-	1	1	2	2	1	2	2	Mal ⁻ Dex ⁺
666 Y ₃₈₃ S	+	3	3	-	2	1	2	2	1	2	1	Mal ⁺ / ⁻ Dex ⁺ T ^S
621 L ₃₈₇ P	+	2	2	3	-	-	-	3	2	3	8	Mal ⁺ Dex ⁻
66 L ₃₈₇ H	+	1	1	2	3	3	3	2	2	2	29	Mal ⁺ Dex ⁺ / ⁻ Dex ^{dom} +/-
Doppelmutanten												
644 L ₃₇₂ R/V ₃₇₅ D	(+)/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 1	MalF:Instabil in vivo
619 L ₃₇₉ Q/G ₃₈₀ V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 1	Mal ⁻ Dex ⁻
665 Y ₃₈₁ N/G ₃₉₀ C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 1	Mal ⁻ Dex ⁻
648 P ₃₈₂ L/Y ₃₈₃ H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	Mal ⁻ Dex ⁻
626 Y ₃₈₃ H/M ₃₈₉ R	+	3	3	-	3	3	-	3	3	-	1	Mal ⁺ / ⁻ Dex ⁺ / ⁻ T ^S
660 I ₃₈₆ N/L ₃₈₇ H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	Mal ⁻ Dex ⁻
Dreifachmutante												
624 Y ₃₈₃ C/L ₃₈₇ F/ M ₃₈₉ L	+	2	2	4	-	-	-	2	2	4	7	Mal ⁺ / ⁻ Dex ⁻ T ^S

^a Das Wachstum der Stämme auf den jeweiligen Kohlenstoffquellen ist in Tagen [d] angegeben.

^b Die Maltosetransportrate von 100% sind 1139 pmol Maltose/(min * 10⁹ Zellen) mit der Standardabweichung von ±12%. Hintergrundaktivität: 2% des WT-Transportes.

^c Die Abkürzungen für die Phänotypen bedeuten: Mal: Maltose; Dex: Dextrin; Dex^{dom}: Dextrin dominanter Phänotyp, d.h. das Wachstum einer Mutante ist schlechter bei gleichzeitiger Gabe der Kohlenstoffquellen Maltose und Dextrin als nur bei Maltose allein; Dex^{dom} neg: dominant negativer Dex-Phänotyp, d.h. kein Wachstum mehr bei gleichzeitiger Gabe der Kohlenstoffquellen Maltose und Dextrin; T^S: temperatursensitiv.

Tabelle 9: Vergleichende Darstellung von Wachstumsverhalten, Transportaktivität und MalF-Expression der MalF-Mutanten der 8. Transmembrandomäne

MalF-Allel in DHB4 recA	MalF- Expres- sion (ÜN- Kultur)	Wachstum ^a auf MMA-Maltose [d]			Wachstum ^a auf MMA-Dextrin [d]			Wachstum ^a auf MMA- Dextrin+ Maltose [d]			Maltose- transport ^b in % der Wildtyprate	charakter- istischer Phänotyp ^c bzgl. WT
		28	37	42°C	28	37	42°C	28	37	42°C		
malF Wildtyp	+	1	1	2	1	1	2	1	1	2	100	Mal ⁺ Dex ⁺
Punktmutanten												
831 G485 ^V	+	2	2	4	-	-	-	3	3	-	2	Mal ⁺ / _{Dex^{dom+/-}} Dex ⁻ T ^S
816 L486 ^P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	Mal ⁻ Dex ⁻
842 A488 ^P	+	2	2	4	-	-	-	3	2	3	7	Mal ⁺ / _{T^S} Dex ⁻
8033 A491 ^D	+	2	2	3	-	-	-	2	2	2	34	Mal ⁺ Dex ⁻
843 T492 ^R	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	MalF:Instabil <i>in vivo</i>
846 I494 ^N	+	1	1	2	2	2	3	2	1	2	95	Mal ⁺ Dex ^{+/-}
860 I494 ^L	+	1	1	2	3	3	3	2	1	2	39	Mal ⁺ Dex ^{+/-}
84 F495 ^L	+	1	1	2	3	2	3	1	1	2	36	Mal ⁺ Dex ^{+/-}
811 L496 ^P	+	2	1	2	3	3	-	2	2	2	52	Mal ⁺ Dex ^{+/-} T ^S bzgl. Dex
62281 L496 ^V	+	1	1	2	2	2	3	1	1	2	87	Mal ⁺ Dex ^{+/-}
827 L497 ^R	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 1	MalF:Instabil <i>in vivo</i>
62284 L497 ^Q	+	1	1	2	2	2	3	2	1	2	82	Mal ⁺ Dex ^{+/-}
853 V498 ^M	+	1	1	2	2	2	3	2	1	2	22	Mal ⁺ Dex ^{+/-}
Doppelmutanten												
836 L486 ^V /A500 ^V	+	1	1	2	3	2	4	2	1	2	51	Mal ⁺ Dex ^{+/-}
847 L486 ^P /V504 ^L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 1	Mal ⁻ Dex ⁻
834 I494 ^T /F495 ^Y	+	1	1	2	3	2	3	1	1	2	95	Mal ⁺ Dex ^{+/-}
838 F495 ^S /G499 ^R	(+)/-	3	3	-	3	4	-	3	3	-	< 1	MalF:Instabil <i>in vivo</i> T ^S
8330 L497 ^W /G499 ^D	+	1	1	2	3	3	-	2	1	2	65	Mal ⁺ Dex ^{+/-} T ^S bzgl. Dex
8337 L497 ^Q /G499 ^D	+	2	2	3	-	-	-	3	3	-	52	Mal ⁺ Dex ⁻ Dex _{dom+/-}
Dreifachmutanten												
826 F484 ^L /I490 ^T / F495 ^I	+	2	1	2	-	-	-	4	4	4	7	Mal ⁺ / _{Dex^{dom+/-}} Dex ⁻
89 G485 ^V /L486 ^Q / I490 ^N	+	3	3	-	-	-	-	-	-	-	< 1	Mal ⁺ / _{Dex^{dom neg}} Dex ⁻ T ^S
855 I490 ^N /I494 ^N / I503 ^R	+/-	2	2	-	-	-	-	2	2	-	< 1	Mal ⁺ / _{Dex⁻} T ^S MalF: instabil <i>in vivo</i>
Vierfachmutante												
815 G485 ^R /L496 ^R / L497 ^Q /A502 ^S	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	Mal ⁻ Dex ⁻ MalF: instabil <i>in vivo</i>

a und b und c: siehe Tabelle 8

Temperatursensitives Wachstum (ohne Berücksichtigung eines bestimmten Substrates) kommt ungefähr gleich häufig in TM 6 und in TM 8 vor. Sowohl Punktmutanten als auch Doppel- und Dreifachmutanten lösen die Temperatursensitivität aus.

Die Temperatursensitivität könnte mit dem spezifischen Substrattransport in einem Zusammenhang stehen: Maltose-T^S-Wachstum ist gekoppelt mit wildtypischem Wachstum auf Dextrin (*malF652*) und kommt nur in TM 6 vor. Dextrin-T^S-Wachstum ist gekoppelt mit wildtypischem Wachstum auf Maltose (*malF8330*) und kommt nur in TM 8 vor. Gleichzeitig ist T^S in TM 8 bei Mehrfachmutanten mit einer Instabilität des Proteins gekoppelt.

Diese Befunde unterstreichen die funktionelle/strukturelle Bedeutung der TM 6 für den Maltosetransport, vielleicht sogar für eine Art der "Maltoseerkennung" und die funktionelle, aber auch erkennbar strukturelle Bedeutung der TM 8 für den Dextrintransport, möglicherweise auch für die "Dextrinerkennung".

1.2.9 Die Position der Aminosäureaustausche in einer Helixgrafik

Die Transmembrandomänen von MalF besitzen wahrscheinlich eine helicale Sekundärstruktur. Dafür sprechen beispielsweise die relativ gleichmäßig hohe Hydrophobizität dieser Segmente (im Gegensatz zu -Faltblättern) und der Vergleich mit ähnlich hydrophoben integralen Membranproteinen mit bekannten -helicalen Sekundärstrukturen wie das Bacteriorhodopsin (Henderson *et al.*, 1990). Bei der Lactose-Permease LacY zeigten zirkuläre Dichroismus Messungen eine zu mehr als 80% helicale Konformation (Foster *et al.*, 1983).

Unter dieser Annahme wurden die schematischen Positionen der Aminosäuren der Transmembranhelices 6 und 8 von MalF in einer Helixgrafik dargestellt. Die Verteilung der Positionen der Aminosäuresubstitutionen in den putativen Helices wird dadurch sichtbar.

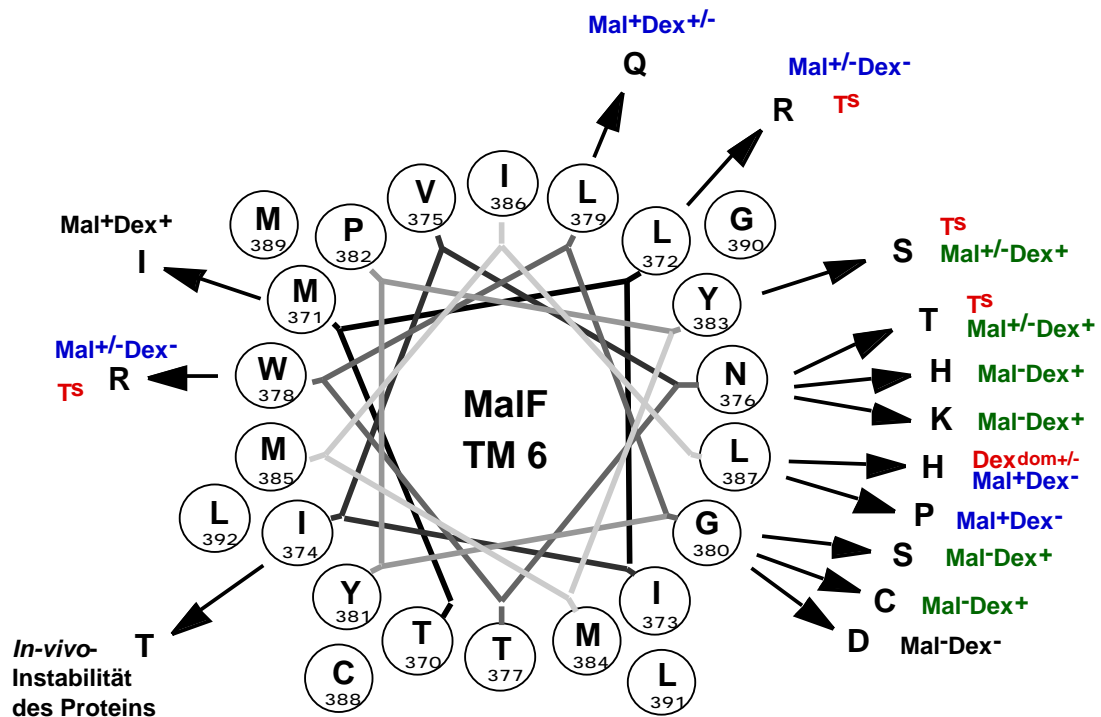


Abbildung 4. Position und wichtige Phänotypen der Punktmutationen im "helical wheel" von TM 6.

Alle Aminosäuren der Helixgrafik sind in eine Ebene senkrecht zur Helixachse projiziert. Aufeinanderfolgende Aminosäuren sind durch Linien verbunden. In einer Helixwindung liegen im Durchschnitt 3,6 Aminosäurereste. Somit sind aufeinanderfolgende Reste in der Helix durch einen Winkel von 100° getrennt. Alle Aminosäuresubstitutionen der Punktmutationen von TM 6 sind durch Pfeile gekennzeichnet. Nebenstehend angegeben sind die jeweiligen charakteristischen Phänotypen (siehe Tabelle 8). Abkürzungen:

Mal: Maltose; Dex: Dextrin; Dex^{dom}: Dextrin dominanter Phänotyp; Dex^{dom neg}: dominant negativer Dex-Phänotyp; T^S: temperatursensitiv.

Folgende Beobachtungen zum "helical wheel" der TM 6 können festgehalten werden:

1. Die meisten der in TM 6 isolierten Punktmutationen liegen im "helical wheel" auf einer Seite der Helix.
2. a) Alle Substratphänotypen der Kategorie V, Mal⁻Dex⁺ (siehe oben), liegen an einer Seite der Helix. b) Die betreffenden drei Aminosäurepositionen folgen einander direkt nach immer einer Helixwindung. c) Die betreffenden drei Positionen liegen im Zentrum der Helix.
3. Drei von vier T^S-Mutanten liegen an Aminosäurepositionen, die am helical wheel nebeneinander liegen. Diese Positionen liegen noch an der Helixseite, an der die meisten Mutanten "geclustert" liegen.
4. Eine -helicale Sekundärstruktur von TM 6 erscheint durch die Anordnung der Aminosäuresubstitutionen mit ihren Phänotypen zumindest plausibel.

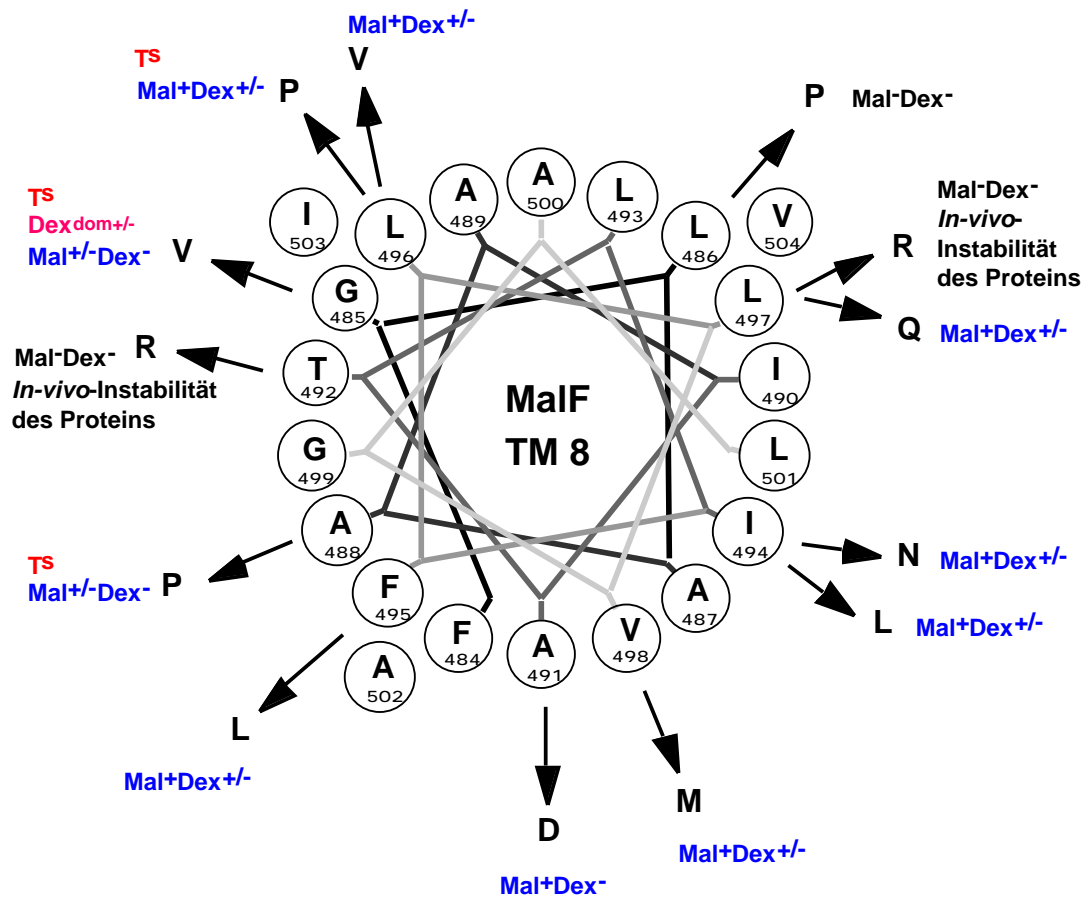


Abbildung 5. Position und wichtige Phänotypen der Punktmutationen im "helical wheel" von TM 8.

Alle Aminosäuren der Helixgrafik sind in eine Ebene senkrecht zur Helixachse projiziert. Aufeinanderfolgende Aminosäuren sind durch Linien verbunden. In einer Helixwindung liegen im Durchschnitt 3,6 Aminosäurereste. Somit sind aufeinanderfolgende Reste in der Helix durch einen Winkel von 100° getrennt. Alle Aminosäuresubstitutionen der Punktmutationen von TM 8 sind durch Pfeile gekennzeichnet. Nebenstehend angegeben sind die jeweiligen charakteristischen Phänotypen (siehe Tabelle 9). Abkürzungen:

Mal: Maltose; Dex: Dextrin; Dex^{dom}: Dextrin dominanter Phänotyp; Dex^{dom neg}: dominant negativer Dex-Phänotyp; T^S: temperatursensitiv.

Folgende Beobachtungen zum "helical wheel" der TM 8 können festgehalten werden:

1. Alle isolierten Punktmutationen sind relativ gleichmäßig am "helical wheel" verteilt. Eine Häufung von Punktmutanten an einer bestimmten Helixseite, wie dies bei TM 6 der Fall ist, ist hier nicht zu beobachten.
2. Die Positionen der Mutanten der Substratphänotypen der Kategorie IV, Mal⁺Dex⁻, sind rund um das "helical wheel" zu finden.
3. Temperatursensitivität erzeugende Punktmutationen liegen zusammen an einer Helixseite.

1.3 Strukturelle Änderungen von MalF-Derivaten

Anhand der oben beschriebenen Wachstumsexperimente auf MMA-Maltose, MMA-Maltodextrin und anhand der Transporttests mit ^{14}C -Maltose werden zum Teil einschneidende Funktionsänderungen des MalFGK₂-Komplexes sichtbar.

Es stellt sich die Frage, welche Veränderung jede einzelne Aminosäuresubstitution verursacht. Finden beispielsweise Konformationsänderungen in MalF bzw. im ganzen MalFGK₂-Komplex statt? Das Vorkommen und Ausmaß der Konformationsänderungen durch Substitutionen in MalF korreliert möglicherweise mit bestimmten Phänotypen.

Könnte es sein, daß die Temperatursensitivität durch spezielle Konformationsänderungen bedingt wird? Besitzen Mutationen, die die Substratspezifität verändern, charakteristische Konformationsänderungen oder nicht? Welches Ausmaß an Konformationsänderung zeigen Mehrfachmutanten im Vergleich zu Punktmutanten?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden mit allen Punktmutanten von TM 6 und TM 8 und mit den Doppel- und der Dreifachmutante der TM 6 Proteasetests durchgeführt.

Durch Proteasetests kann außerdem untersucht werden, ob Mutanten isoliert wurden, die sich in zwei interessante, hypothetische Gruppen unterteilen lassen:

1. Mutanten, die vermutlich korrekt gefaltet sind und so wenig Konformationsänderung zeigen, daß keine oder nur geringste Proteasesensitivität zu erkennen ist, dafür aber schlechtes Wachstum auf Dextrin und/oder Maltose bzw. wenig spezifischer Maltosetransport vorliegt. 2. Mutanten, bei denen große Konformationsänderungen und demnach beträchtliche Proteasesensitivität zu erkennen sind, die aber einen wildtypischen Maltosetransport oder wenigstens auf einem der beiden Substrate, Maltose oder Maltoheptaose wildtypisches Wachstum zeigen.

Die Mutationen der Gruppe 1 könnten an Positionen liegen, die sehr wichtig für eine bestimmte Funktion sind, so daß bereits eine konservative Substitution, die wenig Konformationsänderung herbeiführt, großen Funktionsverlust verursacht. Die Mutanten der Gruppe 2 könnten an Positionen liegen, die für die Funktion nicht von großer Bedeutung sind und wo größere strukturelle Veränderungen geschehen könnten, ohne daß die Transportfunktion direkt wesentlich beeinträchtigt wird.

1.3.1 Proteasesensitivität der MalF-Mutanten in TM 6 und TM 8

MalF ist proteasesensitiv nach seiner vollzogenen Membraninsertion, wenn entweder MalG oder MalK oder alle beide nicht coexprimiert werden. Dies wurde an Sphäroplasten von *E. coli* gezeigt, die mit den extern applizierten Proteasen Trypsin und Chymotrypsin behandelt wurden (Traxler & Beckwith, 1992). Dieser Assay zeigt an, daß MalF nach dem Zusammenbau zum Transportkomplex mit MalG und MalK in einer anderen, nicht proteasesensitiven Konformation vorliegt. Die Konformationsänderungen beim Zusammenbau geschehen wahrscheinlich in den der Protease zugänglichen periplasmatischen Domänen von MalF. Dafür kommen in Frage die große periplasmatische Domäne zwischen TM 3 und TM 4 und die ca. 30 Aminosäuren lange periplasmatische Domänen zwischen TM 5 und TM 6 und den Domänen TM 7 und TM 8 (Traxler & Beckwith, 1992).

Anhand von vier verschiedenen Punktmutationen in TM 7 (P₄₂₈E, L₄₂₉Q, L₄₂₉P, F₄₃₅L) wurde weiter gezeigt, daß diese MalF-Derivate (in Sphäroplasten) bei Behandlung mit Trypsin und Chymotrypsin nicht proteasesensitiv sind (Pick, 1995).

Die mögliche Schlußfolgerung ist die, daß der Zusammenbau von MalF-Derivaten mit einer Punktmutation in TM 7 mit MalG und MalK zum Transportkomplex stattfindet.

Für die weiteren Arbeiten wurde angenommen, daß die Mutanten von TM 6 und TM 8 ebenfalls nicht Trypsin- oder Chymotrypsin-sensitiv sind (M. Ehrmann).

Wir vermuteten aber, daß möglicherweise vorhandene weniger starke Konformationsänderungen von MalF-Mutanten im fertigen Transportkomplex dennoch mit einer weniger spezifisch schneidenden Protease wie Proteinase K aufzeigbar wären.

Mögliche Artefakte einer Überproduktion von MalF auf pDHB32 gegenüber den chromosomalen *mal*-Genen bei den Protease/Immunoassays sollten vermieden werden.

Überproduziertes MalF würde nicht mit den wildtypisch chromosomal exprimierten, geringeren MalG/MalK-Mengen im Transportkomplexe vorliegen und somit in dieser Konformation von Proteinase K gespalten werden. Eine scheinbare Proteasesensitivität wäre das Resultat. Sie könnte in Form von proteasesensitiven MalF-Abbauprodukten sichtbar werden. Deshalb wurde für diese Arbeit der Stamm DHB4*malT*(Con) (= RE10) konstruiert, um die Expression von *malG* und *malK* induziert zu halten. Zusätzlich wurde für die Tests das Plasmid pACYC184 mit *lacI^q* coexprimiert, damit die zelluläre *lac*-Repressor-Menge für den *P_{tac}*-Promotor vor *malF* auf pDHB32 ausreichend erhöht wurde. Mit diesem System konnten weitgehend gleiche Mengen an MalF, MalG und MalK exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Proteinmenge von MalF auf Westernblots war außerdem gut nachweisbar. Proteaseexperimente ohne das *malT*(Con)-System hatten zuvor zu Fehlinterpretationen von Westernblots geführt, da die sichtbare MalF-Menge zu gering war (scheinbare Proteasesensitivität).

Die Proteolyse von Wildtyp-MalF durch Proteinase K in Sphäroplasten ist von der Konzentration von Proteinase K abhängig: Bei zunehmender Proteinase K-Konzentration über 100 µg/ml wird Wildtyp-MalF (im Komplex vorliegend) zunehmend proteolysiert (Daten nicht gezeigt). Bis zu einer Grenze von 100 µg/ml Proteinase K in den Proben (Wachstum bei 37°C) können weder Abbauprodukte noch eine abnehmende MalF-Menge in Westernblots festgestellt werden.

Dagegen wird Wildtyp-MalF im MalK⁻-Stamm RE11 nach Wachstum bei 37°C zum allergrößten Teil und nach Wachstum bei 42°C vollständig proteolysiert (Abbildung 6). Wildtyp-MalF im Stamm RE10 (mit MalK und MalG) ist dagegen nicht sensitiv gegen Proteinase K bei 37°C und ganz leicht sensitiv bei 42°C. Dabei muß beachtet werden, daß die Expression von MalF bei 42°C generell etwas schwächer ausfällt als bei 37°C. Eine Bestätigung dessen kann in dem schwächeren Wachstum bei 42°C auf Platten gesehen werden (siehe bei IV.1.2.4). Ein Grund dafür ist nicht bekannt.

Dieses Ergebnis ist analog zu den Ergebnissen der Experimente mit Trypsin/Chymotrypsin von Traxler und Beckwith und zeigt die vorhandene proteasesensitive Konformation von MalF vor dem Zusammenbau zum vollständigen und funktionellen Transportkomplex an.

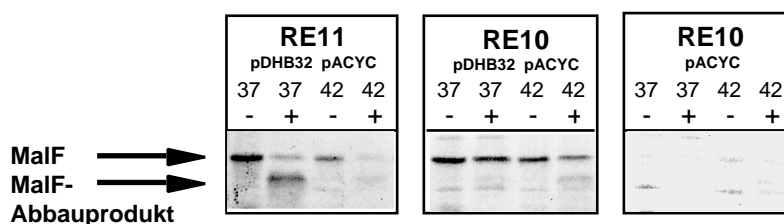


Abbildung 6. Proteinase K-Sensitivität von Wildtyp-MalF.

Das Wachstum der Stämme bzw. die Expression von MalF erfolgte bei 37°C oder 42°C wie angegeben.

Proteasekonzentration: 100 µg/ml Proteinase K in allen Proben unter "+"; keine Protease in den Proben unter "-"

RE10: DHB4 mit *malT*(Con)

RE11: DHB4 mit *malT*(Con) *malK-lacZ*

pDHB32: mit Wildtyp-*malF*

pACYC: pACYC184-Derivat mit *lacI^q*

1.3.2 Die Ergebnisse der Proteasetests von MalF-Derivaten der TM 6 und TM 8

Die Proteasetests aller MalF-Derivate auf pDHB32 wurden im Stamm RE10 mit pACYC184 durchgeführt. Das heißt, daß die zur Zusammensetzung des Transportkomplexes nötigen Proteine MalG und MalK exprimiert wurden.

Die gezeigten Westernblot-Daten (Abbildungen 7, 8, 9) der verschiedenen *malF*-Derivate wurden den jeweiligen Positionen der Aminosäureaustausche im "helical wheel" zugeordnet. Dies geschah wegen der besseren Übersicht und besserer Vergleichsmöglichkeiten der Positionen in der α -helicalen Struktur.

Die Punktmutanten in den Transmembrandomänen von TM 6 und TM 8 verursachen an MalF keine Proteasesensitivität durch Trypsin/Chymotrypsin (gezeigt bei Mutanten der TM 7; siehe oben). Sie liegen deshalb vermutlich im zusammengesetzten Komplex vor.

Bei den Tests mit der unspezifischeren Proteinase K zeigen die Westernblots zum Teil erhebliche Sensitivität einzelner Mutanten im Vergleich zum wildtypischen MalF, das unter diesen Bedingungen resistent ist. Das bedeutet, daß die Punktmutationen wahrscheinlich Konformationsänderungen verursachen, die sich zumindest bis zu den der Proteinase K zugänglichen periplasmatischen Domänen erstrecken.

Die putativen Konformationsänderungen müssen nicht unbedingt einen erheblich reduzierten Maltosetransport (nicht unter 47%) oder schlechtes Wachstum auf Dextrin (nicht unter 2d bei 37°C) zur Folge haben. Das zeigen die Punktmutanten *malF647* in TM 6 und *malF846*, *malF62284* in TM 8. Bei allen drei Mutanten ist MalF nach Wachstum bei 42°C Proteinase K-sensitiv und bei *malF846* und *malF62284* in Spuren auch bei 37°C-Wachstum.

Punktmutanten der Kategorie II (Mal^{reduziert}Dex^{reduziert}) sind proteasesensitiv bei 42°C (*malF647*) oder instabil *in vivo* (*malF651*).

Punktmutanten der Kategorie III (Mal⁻Dex⁻) sind partiell sensitiv bei 42°C (*malF623*; *malF816*), sensitiv schon bei 37°C und gleichzeitig instabil *in vivo* (*malF843*; *malF827*).

Punktmutanten der Kategorie IV (Mal⁺Dex⁻ bis Mal^{+/-}Dex⁻) decken fast alle Protease-Sensitivitäten ab: von nicht sensitiv bis stark sensitiv bei 37°C. Hier sind die am wenigsten sensitiven MalF-Mutanten zu finden.

MalF-Punktmutanten der Kategorie V (Mal⁻Dex⁺ bis Mal^{+/-}Dex⁺) in TM 6 sind alle partiell bis völlig sensitiv bei 42°C und leicht sensitiv bei 37°C (*malF666*; *malF652*; *malF64*; *malF620*; *malF615*).

Mutanten mit einem temperatursensitiven Phänotyp zeigen eine ganz unterschiedliche Proteasesensitivität: Überhaupt keine Sensitivität findet sich bei *malF842*, eine "Spur" von Sensitivität bei *malF811*, beide in TM 8. Eine Sensitivität nach Wachstum bei 42°C gibt es bei *malF611* und *malF626* (Doppelmutante) in TM 6. Sensitivität bei 42°C und leichte bis starke Sensitivität bei 37°C kommt vor bei *malF616*, *malF652*, *malF666*, *malF624* (Dreifachmutante) in TM 6 und *malF831* in TM 8.

Mutanten mit einer Instabilität *in vivo*, festgestellt an Übernachtskulturen (Tabellen 8 und 9), zeigen zumindest bei 37°C-Proben mit Proteinase K einen starken Abbau (*malF843*), oder eine nur noch schwache WT-große MalF-Bande mit weiteren unterschiedlich großen MalF-Fragmenten (*malF651*; *malF827*), dies bei Proben mit und ohne Protease.

Eine allgemeine Tendenz der untersuchten MalF-Mutanten zur Proteinase K-Sensitivität kann - mit Ausnahmen und bei vorsichtiger Betrachtung - wie folgt angegeben werden:

Mutanten mit einer Instabilität *in vivo* Dex^{dom}- mit T^S T^S und restliche Mutanten (" " bedeutet: Die Proteinase K-Sensitivität ist größer bis gleich wie bei ...).

Die untersuchten Doppel- und Dreifachmutanten von TM 6 (Abbildung 9) zeigen, daß Doppelmutationen in TM 6 tendenziell mehr Proteinase K-Sensitivität hervorrufen als Punktmutationen. Außerdem korreliert bei den untersuchten Doppel- und Dreifachmutanten ein besseres Wachstum mit einer geringeren Proteasesensitivität bei 37°C (Sensitivität bei 42°C ist bei allen untersuchten Mehrfachmutanten gegeben).

Funktionelle Defekte und verschieden stark ausgeprägte Konformationsänderungen sind miteinander verknüpft.

Es gibt keine charakteristische Proteasesensitivität für eine der Phänotypkategorien. Dafür sind die Unterschiede der Proteasesensitivitäten zwischen den einzelnen Mutationen zu groß.

Das "Verhalten" von Mutanten ist individuell. Selbst wenn Mutationen "Kategorien" zugeordnet werden können, sind innerhalb der Kategorie nicht mehr als generelle Tendenzen von Charakteristika erkennbar.

Weder in TM 6 noch in TM 8 gibt es Mutanten, die eindeutig in die oben beschriebenen Gruppen 1 und 2 (siehe IV.1.3) einzuordnen sind (Gruppe 1: keine Konformationsänderung bei schlechtestem Transport; Gruppe 2: größte Konformationsänderung bei bestem Transport). Entweder ist die Proteasesensitivität doch zu einem gewissen Ausmaß vorhanden (Gruppe 1) oder das wildtypische Wachstumsverhalten bzw. Transport ist nicht vollständig gegeben (Gruppe 2). Es werden im folgenden aber einige Mutanten aufgeführt, die den Kriterien der genannten Gruppen am nächsten kommen und deren Mutationen dadurch ansatzweise besser verstanden werden können.

Mutanten der TM 6, die der Gruppe 1 nahestehen (*malF641* und *malF66*), zeigen eine mehr oder weniger stärker ausgeprägte Proteasesensitivität bei 42°C, die aber die geringste im Vergleich aller Mutanten von TM 6 ist (außer *malF6190*). Diese beiden Mutanten bzw. ihre Positionen sind interessant: *malF641* ist vollständig Mal⁻ und zeigt wildtypisches Wachstum mit Dextrin. *malF66* zeigt den drittbesten spezifischen Maltosetransport aller Mutanten der TM 6, der zu einem wildtypgleichen Wachstumsphänotyp auf Maltose führt. Das Wachstum auf Maltoheptaose ist dagegen schlecht, dazu liegt ein Dex dominant negativer Einfluß von Maltoheptaose auf Wachstum mit Dextrin vor, wenn beide Kohlenstoffquellen gleichzeitig zur Verfügung stehen (Tabelle 8). Der Proteinase K-Assay unterstreicht die funktionelle Bedeutung dieser Mutanten bzw. ihrer Substitutionspositionen.

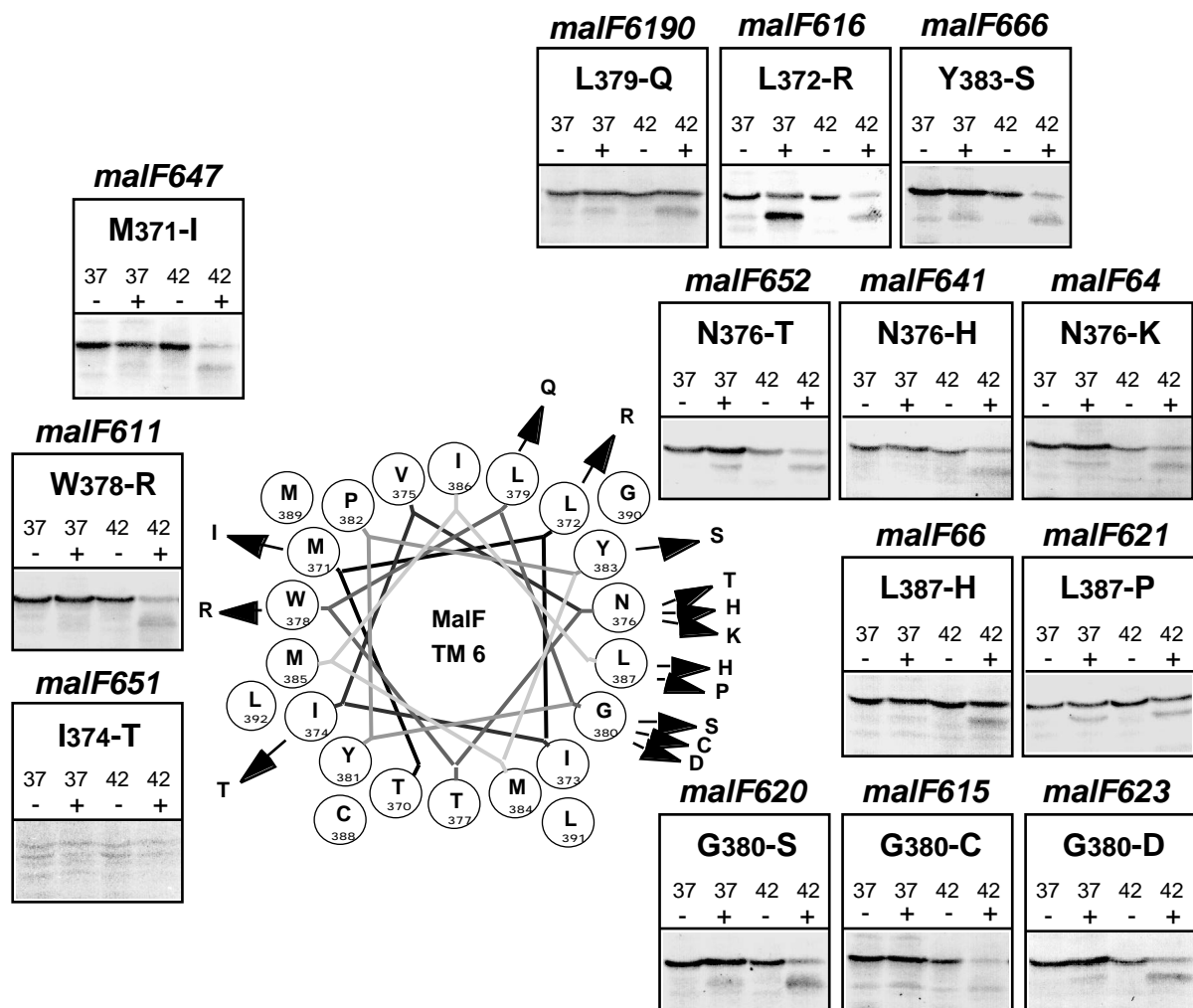


Abbildung 7. Proteinase K-Sensitivität der MalF-Punktmutanten von TM 6.

Die Expression der MalF-Derivate auf pDHB32 erfolgte im Stamm RE10 bei den Temperaturen von 37°C oder 42°C wie angegeben.

Proteasekonzentration: 100 µg/ml Proteinase K in allen Proben unter "+"; keine Protease in den Proben unter "-"

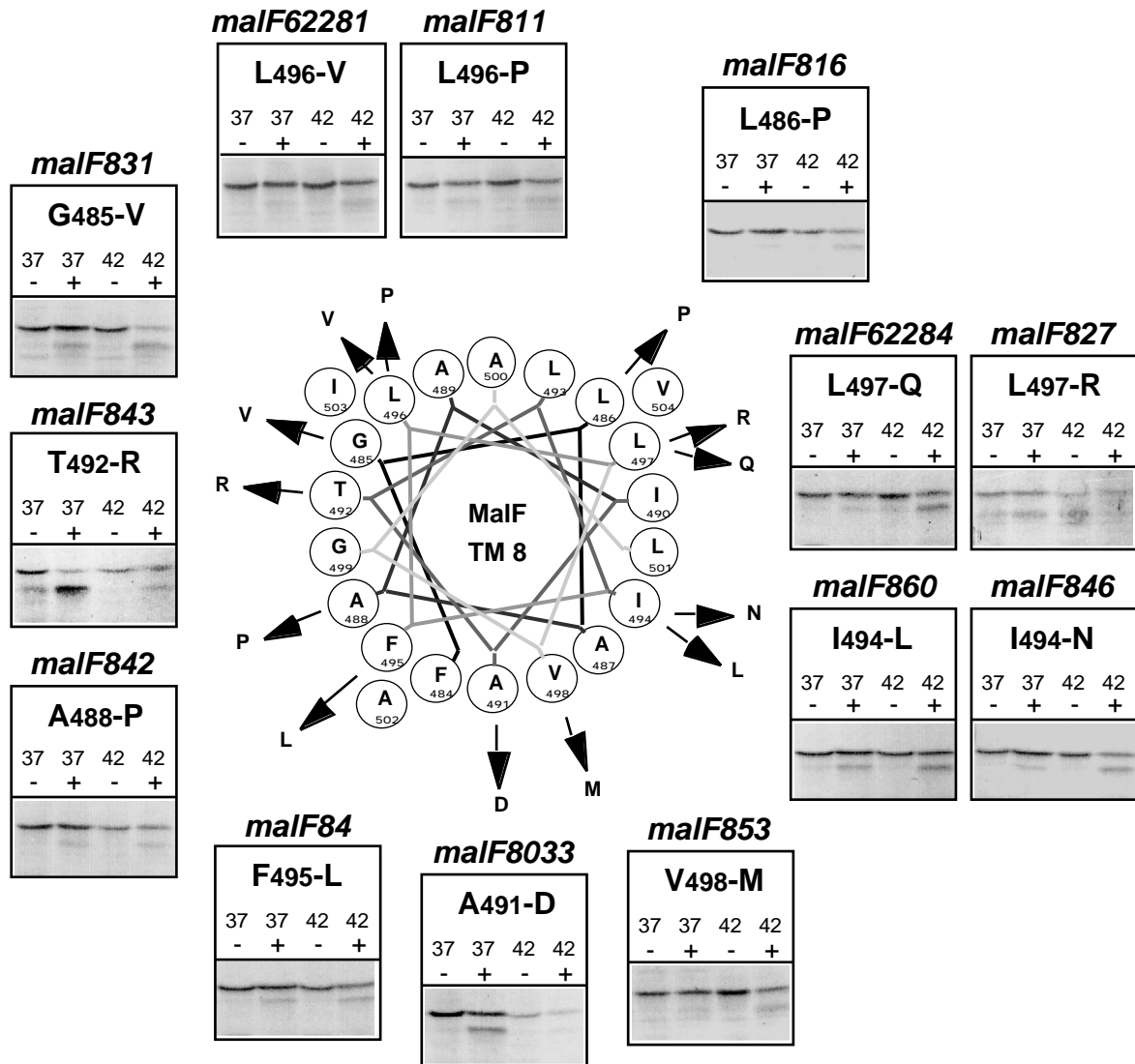
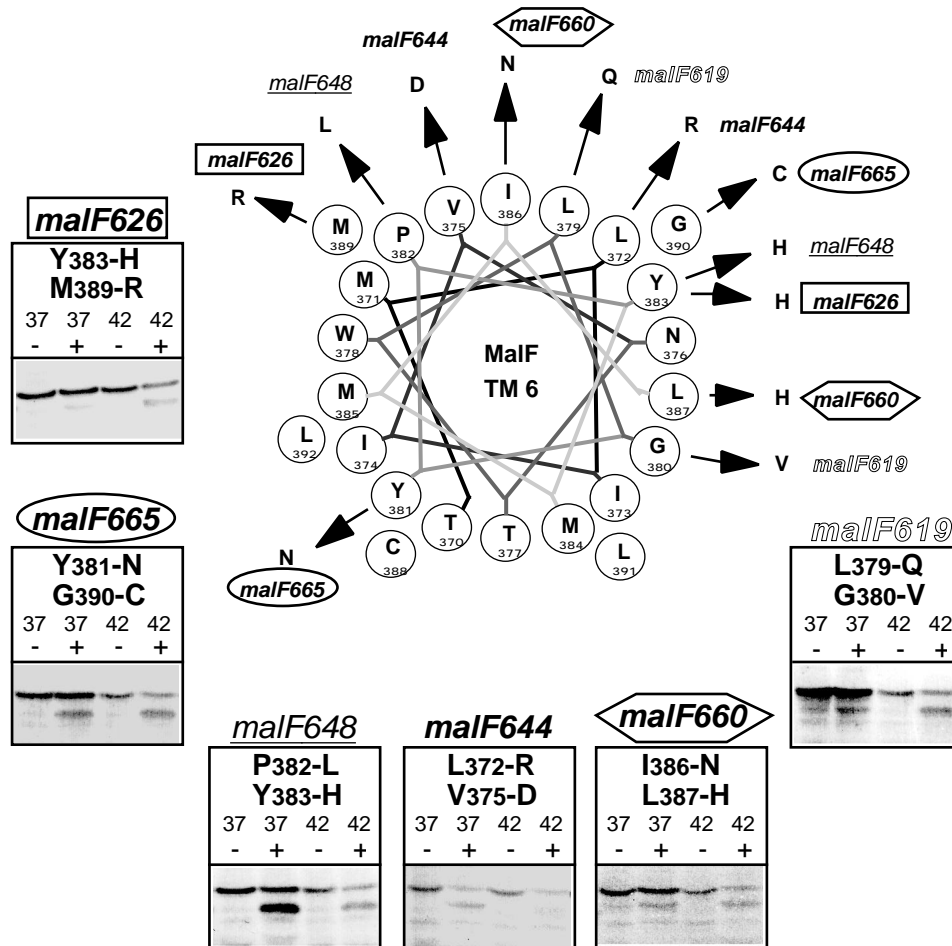


Abbildung 8. Proteinase K-Sensitivität der MalF-Punktmutanten von TM 8.
 Die Expression der MalF-Derivate auf pDHB32 erfolgte im Stamm RE10 bei den Temperaturen von 37°C oder 42°C wie angegeben.
 Proteasekonzentration: 100 µg/ml Proteinase K in allen Proben unter "+"; keine Protease in den Proben unter "-"

Doppelmutationen:



Dreifachmutation:

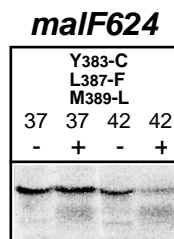


Abbildung 9. Proteinase K-Sensitivität der MalF-Doppelpunktmutanten und der Dreifachpunktmutation von TM 6.

Die Expression der MalF-Derivate auf pDHB32 erfolgte im Stamm RE10 bei den Temperaturen von 37°C oder 42°C wie angegeben. Die Allelnamen von zusammengehörenden Aminosäuresubstitutionen sind im gleichen Schreibstil dargestellt.

Proteasekonzentration: 100 µg/ml Proteinase K in allen Proben unter "+"; keine Protease in den Proben unter "-"

Mutanten der TM 8, die der Gruppe 1 am nächsten stehen, sind drei Mutanten, die die Phänotypen Mal⁻Dex⁻ (*malF816*), Mal^{+/}-Dex⁻ (*malF842*) und Mal⁺Dex^{+/}- (*malF811*) aufweisen und dabei (bis auf die Mutante *malF62281*) die geringste Proteasesensitivität aller in TM 6 und TM 8 isolierten Mutanten zeigen. Es ist aber anzunehmen, daß dennoch nicht unbeträchtliche Konformationsänderungen vorliegen: Alle drei Substitutionen sind solche mit Prolin, welches eine Helixstruktur durch Knicken verändert. Das MalF-Derivat von *malF842* zeigt eine Temperatursensitivität bei Wachstum mit Maltose und das von *malF811* eine solche bei Wachstum auf Maltoheptaose. Das steht im scheinbaren Widerspruch zu der geringen Proteasesensitivität. Eine Erklärung dafür ist, daß die vorhandenen Konformationsänderungen in einem Bereich liegen, der funktionell keine entscheidende Bedeutung hat (vergleiche Abbildung 31).

Mutanten, die der Gruppe 2 am nächsten stehen, sind *malF647* und *malF651*. Die Mutante *malF647* zeigt bei 42°C eine fast vollständige Proteinase K-Sensitivität, ist aber bei 37°C nicht sensitiv. Diese Mutante zeigt eine dem Wildtyp vergleichbare Wachstumsrate auf Maltose und Dextrin. Die Mutante *malF651* ist sehr interessant: Sie hat die stärkste Instabilität *in vivo* von allen hier isolierten Mutanten mit zusätzlicher Proteasedegradation bei 37° und 42°C. Nur sehr wenig Protein in MalF-WT-Größe ist jeweils noch feststellbar. Trotzdem ist Wachstum auf Maltose und Maltoheptaose vorhanden und ein spezifischer Maltosetransport von immerhin 21% im Vergleich mit dem WT. Die Positionen der Substitutionen in *malF647* und *malF651* könnten demnach an der Ausbildung einer TM 6-Konformation maßgeblich beteiligt sein, welche die Interaktion von Helices und ihre Zusammenlagerung zum funktionellen MalF (oder MalFGK₂) bestimmt.

In TM 8 gibt es keine Mutanten, die der Gruppe 2 nahestehen, sondern nur solche, die bei größeren Proteinase K-Sensitivitäten auch entsprechende Wachstumsdefekte wenigstens auf Dextrin aufweisen.

1.4 Gibt es eine Korrelation von Hydropathieveränderung und Phänotypen von Mutationen?

Da die Hydrophobizität der Transmembrandomänen eine ihrer grundlegenden Eigenschaften darstellt, ist es interessant festzustellen, wie sich die Hydrophobizität der TMs durch Aminosäuresubstitutionen verändert.

Es stellt sich die Frage, ob ein bestimmter Phänotyp der Mutanten von TM 6 und TM 8 immer im Zusammenhang mit einer bestimmten Hydrophobizitätsänderung, bspw. einer Senkung der Hydrophobizität, auftritt. Ist vielleicht die erhöhte Proteasesensitivität einer Mutante (siehe oben) mit einer deutlichen Senkung der Hydrophobizität der Aminosäureposition verbunden, welche die Helix in der hydrophoben Umgebung der Membran destabilisieren könnte?

Die Hydrophobizität ist zwar nur ein Faktor von vielen, die an einem Phänotyp ursächlich beteiligt sein können. Sie könnte aber hilfreich sein für eine einfache Einteilung oder Klassifizierung und erste Bewertung von Mutationen. Betrachtet werden im folgenden nur die Punktmutationen und keine Mehrfachmutanten, da über ein mögliches Wechselspiel der Auswirkungen der einzelnen Mutationen im Protein keine Aussagen gemacht werden können.

Gezeigt wird in Abbildung 10 die Auftragung der Hydropathiewerte der einzelnen Aminosäuren nach Kyte/Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982). Dabei zeigt sich deutlich, daß die wildtypische TM 6 viel weniger hydrophob und stärker mit hydrophileren Aminosäuren bestückt ist als die wildtypische TM 8. TM 6 besitzt sogar ein (relativ) hydrophiles Zentrum von acht Aminosäuren, das nur von L₃₇₉ "unterbrochen" wird.

Festzuhalten ist zunächst, daß sich bei der Mehrheit der Punktmutationen die Hydrophobizität an den jeweiligen Positionen in beiden Transmembrandomänen senkt, dargestellt in Abbildung 10 durch die nach unten zeigende Pfeile. In TM 6 ist dies bei neun von vierzehn Punktmutationen und in TM 8 bei zehn von dreizehn Punktmutationen der Fall.

Keine einheitliche Korrelation zu Hydrophobizitätserhöhung oder -senkung zeigen folgende Mutanten-Phänotypen:

- Kategorie II-Phänotypen ($\text{Mal}^{\text{reduziert}}\text{Dex}^{\text{reduziert}}$) und der T^{S} -Phänotypen in TM 6 und TM 8.
- Mal^-Dex^+ -Phänotypen, Kategorie V, in TM 6
- Mal^+Dex^- -Phänotypen, Kategorie IV, in TM 8

Mit einer Hydrophobizitätssenkung verbunden findet man die Mutanten von:

- Mal^-Dex^- -Phänotypen, Kategorie III, in TM 6 und TM 8
- Mutanten mit einer Instabilität *in vivo* in TM 6 und TM 8
- Mal^+Dex^- -Phänotypen, Kategorie IV, in TM 6
- Dex^{dom} -Phänotypen in TM 6 (dies aber nicht bei *malF831* in TM 8)

Bemerkenswert ist, daß alle Mutanten des Mal^-Dex^+ -Phänotyps, Kategorie V, in TM 6 im zentralen hydrophileren Bereich dieser Domäne liegen (Abbildung 10). Außerdem liegen sie innerhalb von zwei Helixwindungen übereinander. Die Mutation der einzigen hydrophoben Aminosäure in diesem Zentralbereich, L379Q, verursacht am wenigsten Auswirkungen auf die Proteinfunktion von allen Mutanten in TM 6.

Korreliert (erhöhte) Proteasesensitivität mit einer Hydrophobizitätssenkung oder -erhöhung?

Dieser Zusammenhang läßt sich nicht bei den Punktmutanten der TM 6 beobachten. Beispielsweise findet sich dieselbe Proteasesensitivität bei einer Hydrophobizitätssenkung (*malF647* (M371I)), bei einer Hydrophobizitätserhöhung (*malF615* (G380S), *malF647* (M371I)) und bei relativ gleicher Hydrophobizität (*malF641* (N376H)).

Zwei sehr drastische Hydrophobizitätssenkungen liegen bei *malF66* (L387H) und bei *malF6190* (L379Q) vor. Jedoch sind diese beiden MalF-Derivate die am wenigsten proteasesensitiven der ganzen TM 6. Ihr Wachstumsverhalten auf MMA-Maltose unterscheidet sich auch nicht von dem des Wildtyp-MalF. Andere deutliche Hydrophobizitätssenkungen dagegen kommen gleichzeitig mit einer Instabilität *in vivo* (*malF651* (I374T)) oder einer starken Proteasesensitivität bei 37°C und 42°C vor (*malF616* (L372R)).

Bei den isolierten Punktmutanten der TM 8 zeichnet sich insgesamt eine Tendenz ab, nach der die stärksten Abweichungen von der Hydrophobizität der Ausgangsaminosäure (Senkung und Erhöhung) gleichzeitig mit den stärksten Protease-Sensitivitäten gekoppelt sind (*malF831* (G485V), *malF843* (T492R), *malF827* (L497R), *malF62284* (L497Q), *malF846* (I494N), *malF8033* (A491D)). Die geringsten Hydrophobizitätsabweichungen sind gekoppelt mit den am wenigsten proteasesensitiven Proteinen (*malF84* (F495L), *malF62281* (L496V), *malF853* (V498M), Ausnahme: *malF860* (I494L)).

Es kann festgestellt werden, daß bei der insgesamt sehr hydrophoben TM 8 Hydrophobizitätssenkungen mit gleichzeitiger Instabilität von MalF bzw. Instabilität des Transportkomplexes sehr viel häufiger vorliegen als bei TM 6. Eine charakteristische Eigenschaft der TM 8 für die Protein- und Komplexstabilität könnte folglich in ihrer ausgeprägten Hydrophobizität liegen. Bei der ohnehin nicht so hydrophoben TM 6 hingegen spielen Hydrophobizitätsänderungen eine schlecht zu definierende Rolle als mögliche Ursache für einen resultierenden Phänotyp.

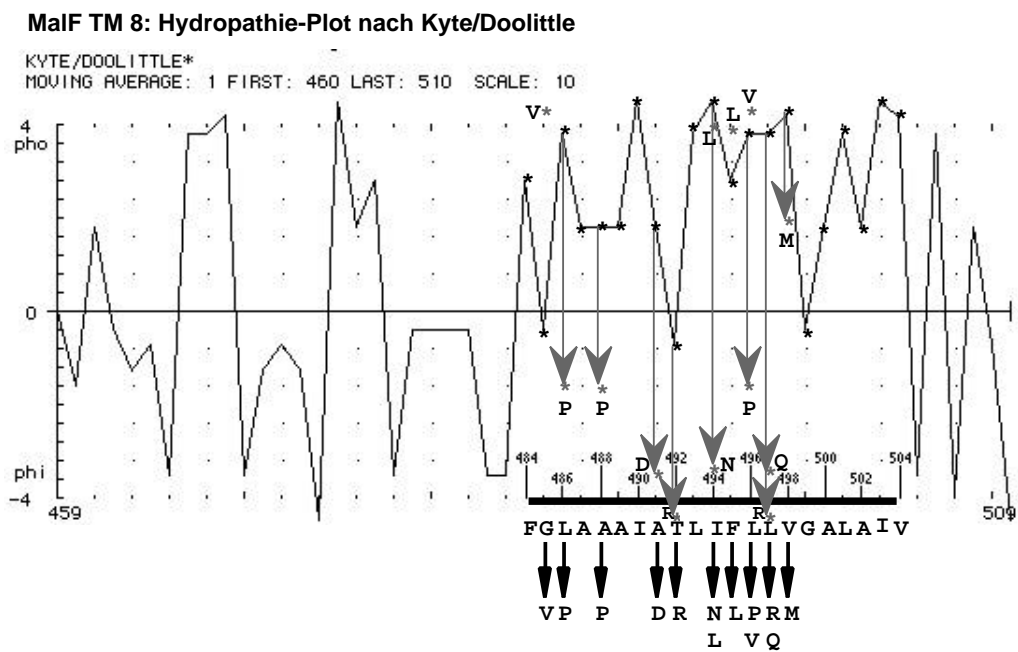
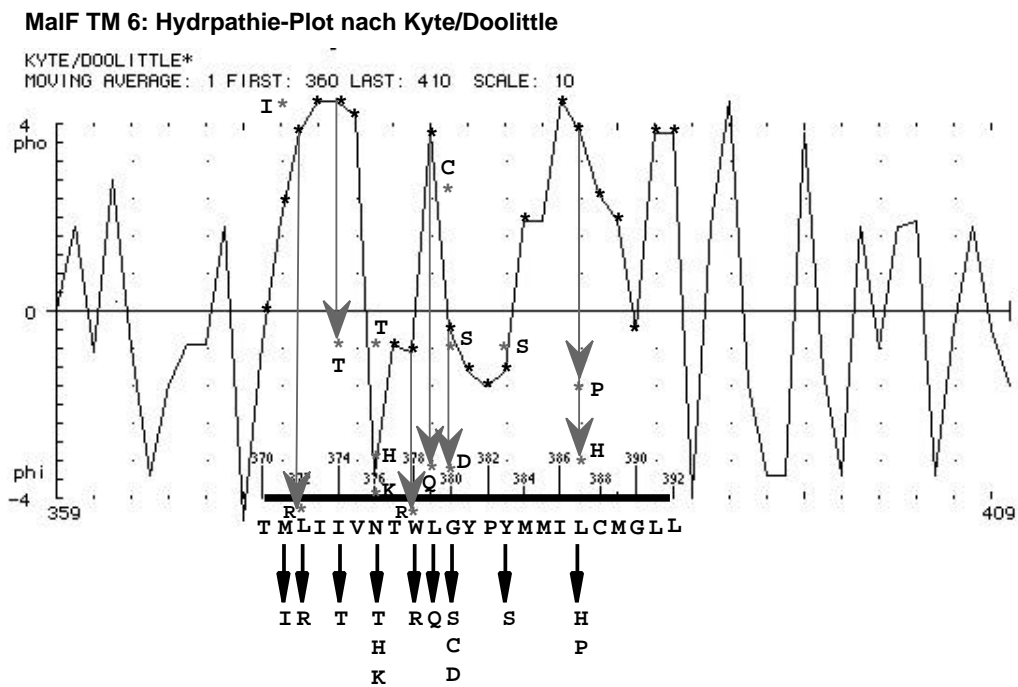


Abbildung 10. Hydrpathie-Plots der Transmembrandomänen 6 und 8 von MalF.

Dargestellt ist jeweils ein Graph der Hydrpathie-Einzelwerte (nach Kyte/Doolittle) einer 50 Aminosäuren langen Sequenz von MalF. Der Bereich der TM 6 bzw. TM 8 ist durch einen Balken gekennzeichnet, unter dem die Aminosäuren der TM im Einbuchstaben-Code aufgeführt sind. Die Aminosäuresubstitutionen der Punktmutanten werden unter der TM-Sequenz durch Pfeile angezeigt. Im Graph ist der Betrag der Senkung der Hydrophobizität gegenüber einer ursprünglichen Aminosäure durch einen Pfeil angegeben. Substitutionen mit höherer Hydrophobizität als die ursprüngliche Aminosäure sind ohne Pfeil eingezeichnet.

2. Untersuchung der Membraninsertion von MalF-PhoA-Fusionen

2.1 Geladene Aminosäuren in Transmembrandomänen beeinflussen die Membraninsertion

Der Einfluß geladener Aminosäuren auf die Signalsequenzen und Stop-Transfer-Domänen bitoper und oligotoper Membranproteine wurde vielfältig untersucht (Andersson & von Heijne, 1993a; Davis *et al.*, 1985; Kuroiwa *et al.*, 1991; Lee & Manoil, 1994; Summers *et al.*, 1989). Dagegen ist die Wirkung geladener Aminosäuren auf die Funktion von Export- und Stop-Transfer-Domänen von polytopen Membranproteinen bisher wenig systematisch untersucht worden (Calamia & Manoil, 1992). Welche Auswirkungen haben Aminosäuresubstitutionen in der C-terminalen TM eines polytopen Membranproteins auf ihre Stop-Transfer- oder Exportfunktion? Wie wirken sich hier verschiedene geladene substituierte Reste aus? Ist die Membraninsertion verändert?

Diesen Fragen wurde durch die Untersuchung der Membraninsertion von Mutanten der TM 6 von MalF nachgegangen. Dabei wurden die Eigenschaften der wildtypischen TM 6 und mutierter TM 6 zunächst als Stop-Transfer-Signal untersucht. In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde die TM 6 in ein Exportsignal umgewandelt und der Einfluß der selben Mutationen auf die Membraninsertion des Exportsignals untersucht.

Besonders interessant waren Aminosäuresubstitutionen mit den Aminosäuren Arginin und Lysin, die von allen Aminosäuren die höchsten pKa-Werte besitzen (R: pKa ~12; L: pKa ~10,2) und von denen deshalb die größten Auswirkungen auf die TM 6 zu erwarten waren.

2.1.1 Die Transmembrandomäne 6 von MalF als Stop-Transfer-Signal

Ausgewählte Mutationen der TM 6 sollten auf ihre Fähigkeit, als Stop-Transfer-Signal für C-terminale Proteinteile zu dienen, überprüft werden.

Die Kompetenz mutierter Transmembrandomänen 6 von MalF, einen C-terminalen, cytoplasmatischen Proteinteil im Cytoplasma zu halten und dort zu stabilisieren, wurde genauer untersucht. Dabei wurden folgende Fragen gestellt:

Verursachen die verschiedenen geladene Aminosäuren Arginin, Lysin, Aspartat (Glutamat wird hier nicht untersucht) unterschiedliche Auswirkungen und Effekte?

Geladene Aminosäuren unterbrechen den hydrophoben Abschnitt einer Transmembrandomäne, kürzen ihn dadurch und vermindern die Hydrophobizität der TM. Für die erfolgreiche Exportfunktion von Signalsequenzen und Transmembrandomänen mit Exportfunktion könnte aber eine Mindesthydrophobizität der Aminosäuresequenz von ca. -20 kcal/mol notwendig sein (Lee & Manoil, 1994). Beispielsweise wurde für eine gute Exportfunktion der TM 1 des Serin-Chemorezeptors Tsr für das fusionierte Enzym Alkalische Phosphatase ein Schwellenwert von -23 kcal/mol gefunden. Bei weniger Hydrophobizität konnte die AP kaum mehr exportiert werden (Lee & Manoil, 1994). [Der Energiewert in kcal/mol ist die Summe der Hydrophobizitäts-(energie)werte einzelner Aminosäuren nach der GES-Skala. Diese Energie muß aufgewendet werden, um die Seitenkette einer (mehrerer) Aminosäure(n) von Wasser in eine nicht-wäßrige Umgebung zu überführen (Engelman *et al.*, 1986).]

Gibt es nun für die TM 6 von MalF, die mit fusionierter AP nicht als Exportsignal (wie bei TM 1 von Tsr), sondern als Stop-Transfer-Signal funktioniert, ebenfalls einen kritischen Hydrophobizitätswert?

Um die Bedeutung der Positionen der geladenen Aminosäuren besser bewerten zu können, wurden weitere Mutanten ausgesucht, deren Aminosäureaustausche nicht geladen waren und die sich an derselben Position wie die jeweils geladene Aminosäure oder aber direkt benachbarten befinden. Zusätzlich wurden zwei Doppelmutanten in die Experimente mit einbezogen. Eine Doppelmutante besitzt zwei geladene Aminosäuren (R; D) am N-Terminus der TM 6, die andere eine geladene und sehr hydrophile Aminosäure (H; R) am C-Terminus (Tabelle 10).

Als "C-terminaler Proteinteil" wurde Alkalische Phosphatase (AP), PhoA, ohne Signalsequenz als Reporterprotein gewählt. Sie ist nur nach ihrem Export ins Periplasma aktiv, wo sie sich unter nicht-reduzierenden Bedingungen falten kann.

Tabelle 10: MalF-Mutanten für die Konstruktion von MalF(III)-AP-Fusionen^a

malF Allel	370	375	380	385	390
TM 6	ACG ATG CTA ATT ATC	GTC AAT ACC TGG CTG GGT TAT CCG TAC ATG ATG ATC CTC TGC ATG GGC TTG CTG			
Wildtyp	Thr Met Leu Ile Ile	Val Asn Thr Trp Leu Gly Tyr Pro Tyr Met Met Ile Leu Cys Met Gly Leu Leu			
647	... ATA
	Ile				
616	... CGA
	Arg				
64 AAG
		Lys			
652 ACT
		Thr			
611 AGG
			Arg		
6190 CAG
			Gln		
623 GAT
			Asp		
615 TGT
			Cys		
644	... CGA ATA GAC
	Arg(Ile)	Asp			
626 CAG AGG
			His	Arg	

^a Die oberste Zeile zeigt die wildtypische DNA- und Aminosäuresequenz von TM 6. Das bei einer Mutante veränderte Codon der DNA-Sequenz ist aufgeführt, darunter die resultierende Aminosäure. Mit diesen Mutanten wurden Fusionsproteine hergestellt. Alkalische Phosphatase wurde C-terminal an TM 6 fusioniert. Der genaue Fusionspunkt wird in Abbildung 11 gezeigt.

Die TM 6 eignet sich sehr gut für die Untersuchungen mit eingeführten Ladungen. Die Grenzen der TM 6 sind durch die flankierenden Aminosäuresequenzen N- und C-terminal abgesteckt: Sie sind insgesamt hydrophil und enthalten geladene Aminosäuren. Eine einfache "Verlängerung" des hydrophoben Abschnitts von TM 6 ist dadurch nicht möglich. Ein Arginin N-terminal und ein Lysin C-terminal von TM 6 legen die Enden des hydrophoben Abschnitts präzise fest (Abbildung 11).

Der Linker zwischen dem MalF-Teil und der AP (ohne Signalsequenz) darf keinen Einfluß auf die zelluläre Lokalisation von AP haben. Dies ist gegeben, da weder positive Ladungen, die eine gegebene Translokation beeinflussen würden, noch Sequenzabschnitte, die als Signalsequenz fungieren könnten, vorhanden sind (Abbildung 11).

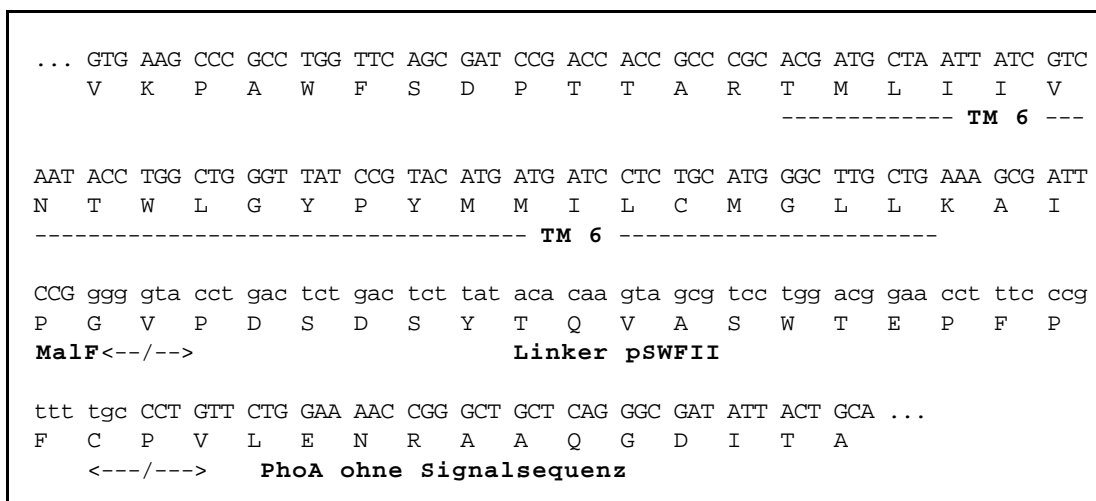


Abbildung 11. Die Sequenz der Fusionsstelle der MalF-AP-Fusionsproteine.

Gezeigt ist die DNA- und Aminosäuresequenz von MalF (pDHB32) mit der Linkersequenz und einem N-terminalen Sequenzabschnitt von PhoA eines Inserts aus pSWFII. Fusionspunkt ist der Übergang MalF/Linker pSWFII. Zur Konstruktion der Fusionen siehe unter III.8.8.1 u. II.8.8.2 .

Wenn eine mutierte TM 6 nun als funktionierendes Stop-Transfer-Signal agieren kann, so wird AP zum allergrößten Teil im Cytoplasma vorliegen. Damit ist die meßbare AP-Aktivität gemäß der dort inaktiven AP gering. Diese Situation unterscheidet sich somit nicht von der des Wildtyps (MalF-AP-Fusion mit wildtypischer TM 6 als Stop-Transfer-Signal), die in Abbildung 12A schematisch dargestellt ist. Ist eine mutierte TM 6-Domäne nicht in der Lage, stabil in die Membran zu inserieren, wird der C-Terminus des Fusionsproteins mit AP vorwiegend im Periplasma zu liegen kommen. Dies wird durch die dort aktiv werdende AP angezeigt, schematisch illustriert in Abbildung 12B.

Die Meßergebnisse im Überblick zeigen (siehe Tabelle 11), daß bis auf eine Ausnahme (626AP) alle Fusionen mit einer geladenen Aminosäure in TM 6 die gleiche (623AP) oder höhere AP-Aktivitäten als die WT-Fusion (TM6WT-AP) aufweisen. Dagegen weisen Fusionen mit ungeladenen Substitutionen geringfügig niedrigere AP-Aktivitäten als die WT-Fusion auf.

Für die Interpretation der Meßergebnisse ist es aufschlußreich, die Expression der Fusionsproteine zu betrachten (Abbildung 13).

Die Fusionsproteine wurden aus Ganzzellextrakten von ÜN-Kulturen über Westernblotting nachgewiesen. Die gezeigten Westernblots (Abbildungen 13 u. 16) wurden direkt entwickelt, d.h. nachgewiesen wurde der AP-Teil der Fusionsproteine durch die spezifische enzymatische Aktivität der AP an dem Farbstoff XP. Alle Fusionsproteine bis auf die Fusion 626AP zeigen die erwartete gleiche Größe. 626AP ist auf dem Westernblot nicht mehr zu erkennen, sehr schwach exprimiert aber noch erkennbar sind 647AP, 652AP, 611AP, 6190AP und 615AP.

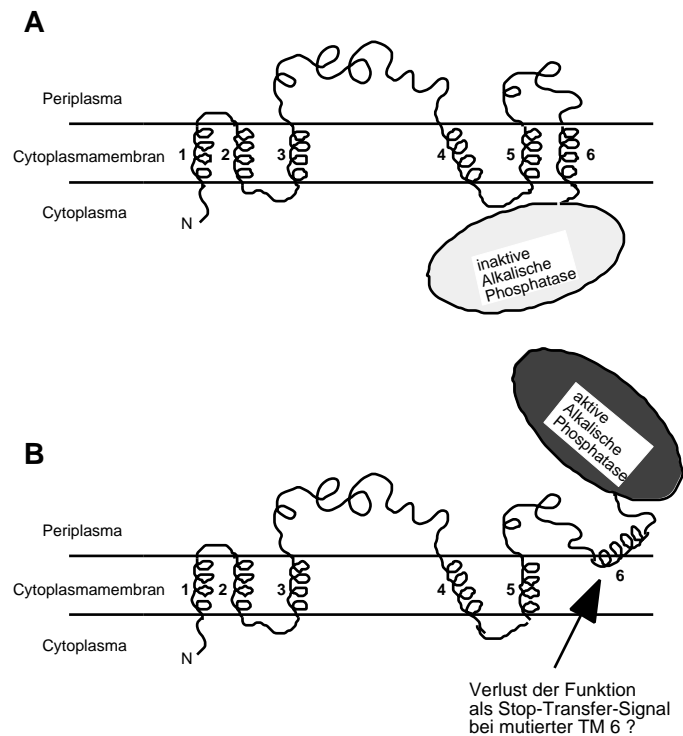


Abbildung 12. Schema einer C-terminalen Deletionsfusion MalF-AP.

Der Fusionspunkt liegt C-terminal zu TM 6 von MalF. Diese Abbildung zeigt schematisch die beiden potentiellen Topologien, die die Derivate der MalF-AP-Fusionsproteine einnehmen können.

A. Die wildtypische TM 6-Sequenz inseriert in die Membran als Stop-Transfer-Signal. Alkalische Phosphatase (AP) verbleibt dann im Cytoplasma und ist inaktiv.

B. Aufgrund einer Mutation in TM 6 wird die AP ins Periplasma transloziert und wird dort aktiv.

Tabelle 11: Aktivität der MalF-AP-Fusionen

Fusion mit geladener Aminosäure	AP-Aktivität ^a	Stop-Transfer-Funktion	Fusion mit ungeladener Aminosäure	AP-Aktivität ^a	Stop-Transfer-Funktion
616AP (L ₃₇₂ R)	16 ± 0,2	++	TM6WT-AP	11 ± 2	+++
64AP (N ₃₇₆ K)	29 ± 7	+	647AP (M ₃₇₁ I)	7 ± 4	+++
611AP (W ₃₇₈ R)	62 ± 21	+/-	652AP (N ₃₇₆ T)	5 ± 1	+++
623AP (G ₃₈₀ D)	11 ± 2	+++	6190AP (L ₃₇₉ Q)	7 ± 0,5	+++
644AP (L ₃₇₂ R; V ₃₇₅ D)	60 ± 16	+/-	615AP (G ₃₈₀ C)	8 ± 2	+++
626AP (Y ₃₈₃ H; M ₃₈₉ R)	2 ± 0,4	++++			

^a Angegeben sind Durchschnittswerte der AP-Aktivitäten und die jeweilige Standardabweichung. Die Messungen pro Fusion wurden 3 bis 8 mal durchgeführt.

Die Ursache für die unterschiedlichen AP-Mengen ist wahrscheinlich die, daß im Cytoplasma verbleibende AP durch zelluläre Proteasen abgebaut wird (Traxler *et al.*, 1992). Somit spiegelt die im Westernblot

sichtbare Proteinmenge aktive, ins Periplasma exportierte AP. Tatsächlich korrelieren die in Abbildung 13 sichtbaren Mengen der Fusionsproteine auffallend genau proportional mit der Höhe der AP-Aktivitäten (Tabelle 11) bis auf die Ausnahme MalF611AP, wo die AP-Aktivität im Vergleich zur Proteinmenge höher liegt.

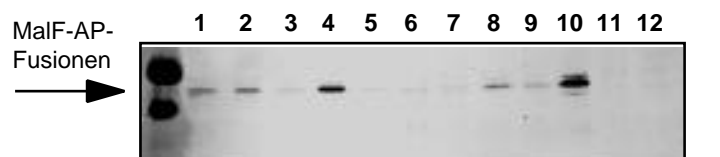


Abbildung 13. Westernblot der MalF-AP-Fusionen.

AP-Fusionen der Reihen 1-12: TM6WT, 616, 647, 64, 652, 611, 6190, 623, 615, 644, 626, DHB4*recA* mit pDHB32 (zellulärer Hintergrund).

Im Vergleich zum Wildtyp (TM6WT-AP) zeigen die drei Fusionen 616AP, 64AP und 611AP mit Arginin- bzw. Lysin-Substitutionen einen Anstieg der AP-Aktivität von einem 1,5-fachen Wert bei 616AP bis zu einem knapp 6-fachen Wert bei der Fusion 611AP (Tabelle 11). Diese Fusionen zeigen: Je weiter eine positive Ladung vom N-Terminus gegen die Mitte der hydrophoben TM-Sequenz plaziert wird, desto höher ist die AP-Aktivität und damit der Verlust der Stop-Transfer-Funktion. Die AP-Aktivität verhält sich umgekehrt proportional zur Hydrophobizität (Abbildung 14). Ein wesentlicher Unterschied zwischen Arginin und Lysin in ihrer Wirkung kann hier nicht beobachtet werden.

Eine begrenzende Länge des hydrophoben TM-Abschnitts, ab der ein Stop-Transfer-Signal noch funktioniert bzw. nicht mehr funktioniert, kann anhand der hier untersuchten Mutanten nicht festgestellt werden.

Interessanterweise zeigt die AP-Aktivität von 623AP mit einer Aspartat-Substitution keinen Unterschied zu der des Wildtyps. Zwei alternative Erklärungen sind denkbar. 1. Das Asp380 ist in der Membran positioniert und neutralisiert. Der hydrophobe TM-Abschnitt wird dadurch nicht "zweigeteilt". Die Hydrophobizität kann daher über die ganze TM ermittelt werden, nicht wie in Abbildung 14 dargestellt. Die resultierende Position von 623AP in Abbildung 14 läge dann in der Nähe des Wildtyps. 2. Asp380 unterteilt die TM 6 in zwei hydrophobe Abschnitte und ist aufgrund des elektrochemischen Gradienten an der stärker positiven periplasmatischen Membranaußenseite positioniert.

Asp375 bewirkt zusammen mit Arg372 in der Fusion 644AP eine mehr als dreifache Erhöhung der AP-Aktivität gegenüber der Fusion 616AP (ebenfalls mit der Substitution Arg372). Arg372, nur eine Helixwindung von Asp375 entfernt (falls die Helixstruktur ausgebildet ist), würde mit diesem zusammen die Nettoladung von 0 ergeben. Dennoch ist die AP-Aktivität gegenüber dem Wildtyp um das 5 bis 6-fache erhöht. Das spricht gegen eine Neutralisierung der gegensätzlichen Ladungen und deutet auf eine spezifische Funktion des negativen Aspartats hin, vielleicht in Kombination mit einer positiven Ladung (siehe auch bei 644 IIIAP und 632 IIIAP).

Die Fusion 626AP hat die niedrigste AP-Aktivität die gemessen wurde, fünf mal niedriger als die AP-Aktivität des WT. Das korreliert damit, daß dieses Fusionsprotein im Westernblot nicht zu sehen ist (Abbildung 14).

Eine Erklärung hierfür ist, daß die Stop-Transfer-Funktion bei dieser mutierten TM besser ist als bei TM6WT (insgesamt die beste überhaupt) und die AP vollständig im Cytoplasma abgebaut wird.

Eine andere Erklärung wäre die Möglichkeit des Abbaus des ganzen Fusionsproteins, weil zumindest die TM 6 (und vielleicht auch TM 5) nicht in die Membran inseriert (Instabilität durch die Mutationen His₃₈₃ und Arg₃₈₉).

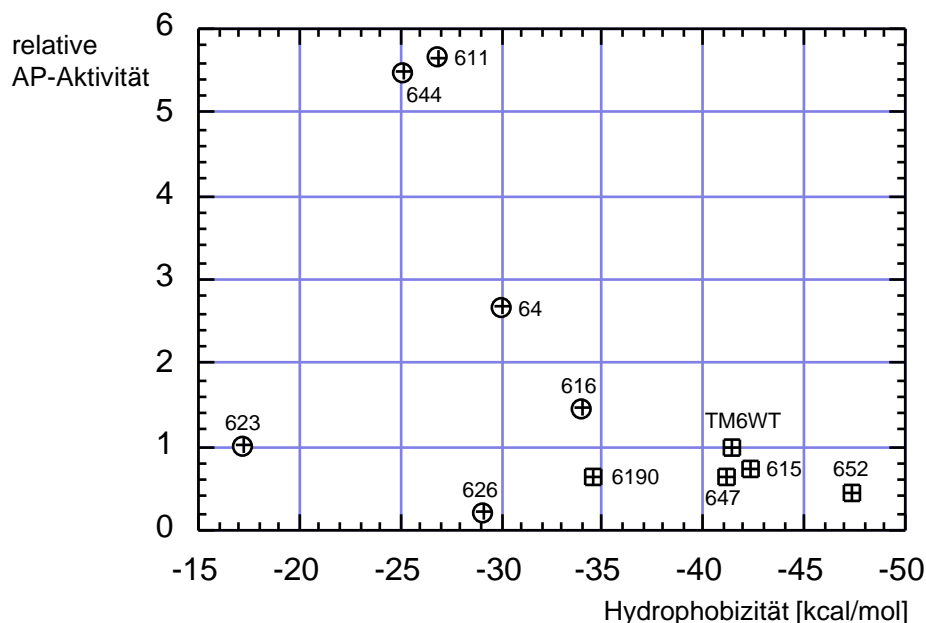


Abbildung 14. Die TM 6 von MalF-AP-Fusionen als Stop-Transfer-Signal.

Dargestellt sind die Hydrophobizitäten der TM 6 Derivate in Relation zur AP-Aktivität.

Hydrophobizität: Die Hydrophobizitätswerte der Aminosäuren (in [kcal/mol] nach der GES-Skala (Engelman *et al.*, 1986)) des hydrophoben Abschnitts einer TM 6 wurde addiert (Wildtyp: Thr₃₇₀ - Leu₃₉₂).

Teilt ein geladener Rest die TM 6 in zwei Teile, wurde die Hydrophobizität des am stärksten hydrophoben TM-Abschnitts verwendet.

Relative AP-Aktivität: Der relativen AP-Aktivität des Wildtyps (TM6WT) von 1 entsprechen 11 Units (Tabelle 11). Runde Symbole: TM 6-Derivate mit geladener Aminosäure. Quadratische Symbole: TM 6-Derivate mit ungeladenen Aminosäuren.

Die AP-Aktivitäten der Fusionen 652AP und 615AP unterscheiden sich nicht wesentlich von der Aktivität der Wildtyp-Fusion. Diese Fusionen besitzen in TM 6 Substitutionen ungeladener Aminosäuren an den selben Positionen wie die geladenen Substitutionen der Fusionen MalF64AP und MalF623AP. Die Position als solche, an der eine geladene Aminosäure eingeführt wurde oder die chemischen Eigenschaften der ursprünglichen, ungeladenen Aminosäure scheinen demnach nicht entscheidend für die Funktion der TM 6 als Stop-Transfer-Signal zu sein.

Die beiden Substitutionen der Fusionen 647AP und 6190AP in TM 6 verändern Positionen direkt neben solchen, an denen in den Fusionen 616AP und 611AP geladene Reste stehen. Ihre AP-Aktivitäten entsprechen den Werten des Wildtyps. Dies kann man dahingehend interpretieren, daß es nicht entscheidend für die Funktion der TM 6 als Stop-Transfer-Signal ist, wenn zwischen der ursprünglichen Aminosäure (die im Falle von 616AP und 611AP gegen R substituiert wurde) und einer direkt benachbarten Aminosäure (647AP und 6190AP: Substitution einer "benachbarten" Aminosäure gegen einen ungeladenen Rest), eine Wechselwirkung stattfindet.

Die Gesamt-Hydrophobizitäten der TM 6 Derivate mit ungeladenen Substitutionen liegen ca. 6-7 kcal/mol über oder unter dem Wert des Wildtyps (Abbildung 14). Innerhalb dieses Bereiches ist die Funktion des Stop-Transfer-Signals (mit -41,4 kcal/mol) nicht signifikant verändert.

Demnach haben die Hydrophobizitäten der einzelnen ungeladenen substituierten Aminosäuren keinen Einfluß auf die Funktion des Stop-Transfer-Signals (im Vergleich zum Wildtyp). Es werden hydrophobe gegen hydrophile Aminosäuren (6190AP mit L₃₇₉Q), hydrophile gegen weniger hydrophile Aminosäuren (652AP mit N₃₇₆T) oder weniger hydrophobe gegen stärker hydrophobe (647AP mit M₃₇₁I; 615AP mit G₃₈₀C) Aminosäuren ausgetauscht, ohne daß sich die resultierenden AP-Aktivitäten signifikant von der des Wildtyps unterscheiden.

Ein hydrophober "Schwellenwert" für die Stop-Transfer-Funktion der TM 6 im Sinne von "Alles-oder-Nichts" kann nicht beobachtet werden. Die Stop-Transfer-Funktion, gemessen an der AP-Aktivität, ist in einem Bereich von bis zu ca. -35 kcal/mol (GES-Skala) stabil und wird bei niedrigerer Hydrophobizität schrittweise reduziert (Abbildung 14).

2.1.2 Die Transmembrandomäne 6 von MalF als Exportsignal

Als nächstes wurde die Frage gestellt, wie sich die Transmembrandomäne 6 mit den ausgewählten Substitutionen als Exportsignal verhalten würde. Als Stop-Transfer-Signal nimmt ihre Funktion graduell mit der Verkürzung des TM-Abschnitts durch eine positive Ladung ab. Würde die Exportfunktion gleichermaßen durch die entsprechende Position der positiven Ladungen graduell reduziert werden?

Nach einer früheren Untersuchung ist für die TM 1 von Tsr eine Mindesthydrophobizität von -23 kcal/mol der Aminosäuresequenz für eine erfolgreiche, volle Exportfunktion notwendig (Lee & Manoil, 1994). Tsr TM 1 hat die ursprüngliche Orientierung N_{in}C_{out}. Sie wurde also in ihrer natürlichen Exportfunktion untersucht. Wie würde sich die TM 6 von MalF mit ihrer ursprünglichen Orientierung N_{out}C_{in} als exportierende Domäne (N_{in}C_{out}) verhalten? Welche Mindesthydrophobizität wäre feststellbar?

Die Tsr-AP-Fusionen sind bitope Membranproteine. Die hier konstruierten MalF-AP III-Fusionen sind polytope Membranproteine mit fünf Transmembrandomänen. Würden vier zusätzliche TMs durch Stabilisation/Destabilisation den Schwellenwert verschieben?

Besitzen die TM 6 und ihre Derivate Aminosäuresequenzen, die sich eher für eine Export- oder eher für eine Stop-Transfer-Domäne eignen?

Um die TM 6 von einem Stop-Transfer-Signal in ein Exportsignal zu verwandeln, wurde die TM 3 von MalF bei allen Fusionsproteinen deletiert. Das sollte zu einer Inversion der Topologie des C-terminalen Proteinteils von MalF ab TM 2 bzw. der zweiten cytoplasmatischen Domäne führen (Abbildung 15A). Die Deletion von TM 3 wurde bereits bei der MalF-PhoA-Fusion Q III und anderen Fusionen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die Inversion der Topologie des C-terminalen MalF-Proteinteils bis zur TM 7 stattfindet (McGovern *et al.*, 1991).

Die invertierten hydrophilen Loops sind die zweite und dritte periplasmatische und die dritte cytoplasmatische Domäne (vergleiche Abbildung 2). Die Verteilung der positiv geladenen Aminosäuren in diesen Loops ist für dieses Experiment sehr günstig, weil ausgewogen. Der zweite periplasmatische Loop verlängert nach der Deletion die zweite cytoplasmatische Domäne (starker Anker mit drei positiven Resten) und die beiden dritten Loops besitzen je drei positive Reste. Eine signifikante Beeinflussung der TM 6 durch eine instabile Topologie N-terminal ist also nicht zu erwarten.

Die erwartete wildtypische Situation nach Deletion von TM 3 ist in Abb. 15A schematisch dargestellt. Nach der Deletion von TM 3 wird Alkalische Phosphatase durch TM 6 ins Periplasma exportiert, mit resultierenden hohen AP-Aktivitäten. Wie würden sich die mutierten TM 6 Exportsignale verhalten? Bei einem Unterbleiben des Exports wie in Abb. 15B dargestellt, wäre Alkalische Phosphatase im Cytoplasma lokalisiert und niedrige AP-Aktivität wäre die Folge.

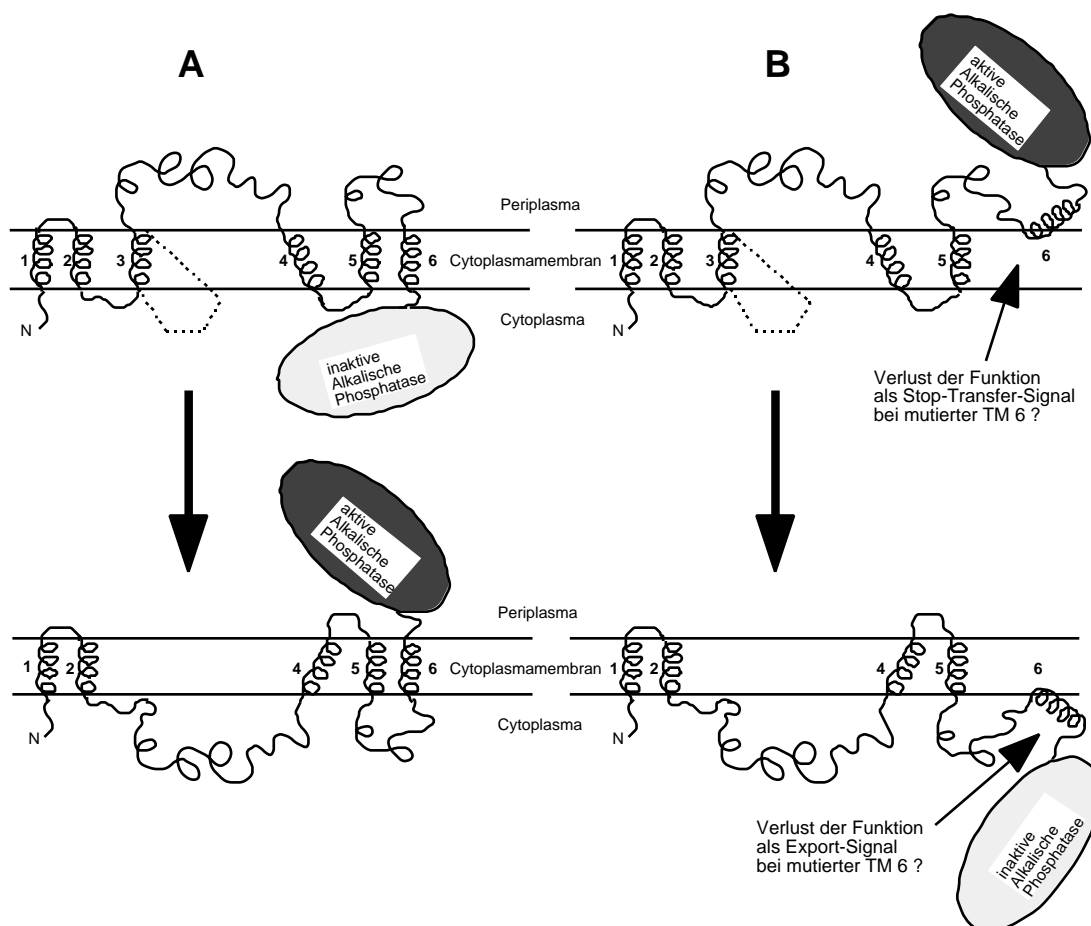


Abbildung 15. Schema einer C-terminalen Deletionsfusion MalF III-AP.

Die Abbildung zeigt schematisch die erwartete Auswirkung der Deletion der TM 3 auf die Topologie der MalF III-AP-Fusionen. Eine Inversion der Proteindomänen C-terminal der zweiten cytoplasmatischen Domäne wird erwartet.

A. Durch die Inversion der Topologie des C-Terminus wird die TM 6 zum Exportsignal für Alkalische Phosphatase (AP). Die AP wird ins Periplasma exportiert, wo sie aktiv wird.

B. Durch eine Mutation in TM 6 findet kein Export statt und die AP bleibt im Cytoplasma, wo sie inaktiv ist.

Die Meßwerte der im folgenden vorgestellten MalF III-AP-Fusionen sind in Tabelle 12 festgehalten. Alle Fusionen mit geladenen Substitutionen in TM 6 zeigen gleiche (64 IIIAP) oder höhere AP-Aktivitäten im Vergleich zur wildtypischen Fusion (TM6 IIIWT-AP). Im Gegensatz dazu liegen die AP-Aktivitäten der Fusionen mit ungeladenen Substitutionen im Bereich des Wildtyps oder geringfügig darunter (652 IIIAP und 6190 IIIAP).

Tabelle 12: Aktivität der MalF III-PhoA-Fusionen

Fusion mit geladener Aminosäure	AP-Aktivität ^a	Export-Funktion	Fusion mit ungeladener Aminosäure	AP-Aktivität ^a	Export-Funktion
616 IIIAP (L ₃₇₂ R)	124±27	++	<u>TM6 IIIWT-AP</u>	75±23	+
64 IIIAP (N ₃₇₆ K)	76±17	+	647 IIIAP (M ₃₇₁ I)	66±22	+
611 IIIAP (W ₃₇₈ R)	96±27	++	652 IIIAP (N ₃₇₆ T)	50±12	+
623 IIIAP (G ₃₈₀ D)	236±47	+++	6190 IIIAP (L ₃₇₉ Q)	60±8	+
644 IIIAP (L ₃₇₂ R; V ₃₇₅ D)	222±76	+++	615 IIIAP (G ₃₈₀ C)	86±26	+

^a Angegeben sind Durchschnittswerte der AP-Aktivitäten und die jeweilige Standardabweichung. Die Messungen pro Fusion wurden 3 bis 8 mal durchgeführt.

Die Expression der MalF III-AP-Derivate wurde durch Westernblots mit Direktentwicklung nachgewiesen, wie unter IV.2.1.1 beschrieben (siehe auch Abb. 13). Alle MalF III-AP-Fusionen sind im Westernblot erkennbar, am schwächsten ist die Expression von 6190 IIIAP. Die Ursache für die Expressionsunterschiede ist sehr wahrscheinlich dieselbe wie bei den MalF-AP-Fusionen: ungefaltete, cytoplasmatisch vorliegende AP wird durch zelluläre Proteasen abgebaut (Traxler *et al.*, 1992).

Wie bei den MalF-AP-Fusionen korreliert bei den MalF III-AP-Fusionen die sichtbare Proteinmenge genau proportional mit der Höhe der AP-Aktivität, mit einer Ausnahme: 644 IIIAP. Die AP-Aktivität ist hier viel höher, als es von der sichtbaren Proteinmenge (im Vergleich mit den anderen Fusionen) zu erwarten wäre.

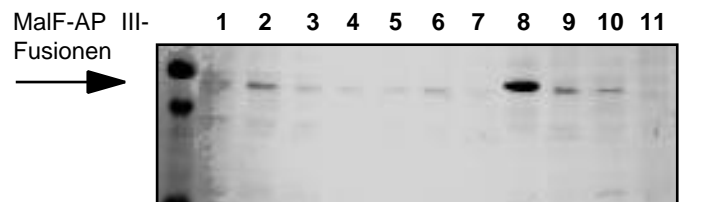


Abbildung 16. Westernblot der MalF III-AP-Fusionen.

AP-Fusionen (III) der Reihen 1-11: TM6 IIIWT, 616, 647, 64, 652, 611, 6190, 623, 615, 644, DHB4*recA* mit pDHB32 (zellulärer Hintergrund)

Die wildtypische TM 6-Sequenz funktioniert als Exportsignal. Ein Export der Alkalischen Phosphatase findet statt: Die AP-Aktivität von TM6 IIIWT-AP ist etwa 6-9 mal höher als die von TM6WT-AP.

Die AP-Aktivitäten der MalF III-AP-Fusionen 616, 611, 623, 644 zeigen aber einen effizienteren Export gegenüber TM6 IIIWT-AP. Der Grund könnte eine Folge der Kinetik des Exports sein (Michaelis *et al.*, 1986). Danach konkurriert bei einem verlangsamten Exportprozess der Abbau der Alkalischen Phosphatase mit ihrem Export.

Die AP-Meßwerte der Fusionen 616 IIIAP, 64 IIIAP und 611 IIIAP erbringen folgende Ergebnisse: Der Einfluß von Lys₃₇₆ in 64 IIIAP und Arg₃₇₈ in 611 IIIAP auf den Exportprozess ist im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht signifikant. Überhaupt keinen Einfluß auf den Export der AP zeigt Lys₃₇₆.

Eine positive Auswirkung von Arginin auf den Exportvorgang ist gegeben, wenn die Argininsubstitution näher am N-Terminus von TM 6 liegt. Das zeigen die Fusionen 616 IIIAP und 611 IIIAP im Vergleich, aber auch 644 IIIAP, wobei bei dieser Fusion die negative Ladung des Asp₃₇₅ die AP-Aktivität erhöht.

Betrachtet man die Hydrophobizitäten der TM 6 Derivate (Abbildung 17) mit geladenen Substituenten (runde Symbole), könnte der Eindruck entstehen, daß mit abnehmender Hydrophobizität der TM 6 die AP-Aktivität im Durchschnitt zunimmt. Die Situation muß aber differenzierter betrachtet werden. Bei den Fusionen 64 IIIAP und 611 IIIAP nimmt die Hydrophobizität ab, ohne daß der Export deswegen wesentlich verändert wird. Bei 616 IIIAP und 644 IIIAP übernimmt die positive Ladung am N-Terminus von TM 6 sehr wahrscheinlich eine funktionelle Rolle wie man sie bei Signalsequenzen findet. Dort steigern positive Ladungen am N-Terminus die Exporteffizienz (von Heijne, 1990b). Die Hydrophobizität von -25,2 kcal/mol des hydrophoben TM 6 Abschnitts bei 644 IIIAP liegt dabei noch sicher von der postulierten Mindesthydrophobizität für Exportsignale von -23 kcal/mol entfernt.

Die Auswirkung der negativen Ladung in den Fusionen 623 IIIAP und 644 IIIAP ist bemerkenswert.

Die negative Ladung in 623 IIIAP erhöht die Exporteffizienz um ein 3-faches im Vergleich zum Wildtyp. Das Protein ist zudem das am stärksten exprimierte von allen III-Fusionen (Abbildung 16). Dies ist ein Hinweis auf eine stabile Membraninsertion und auf wirkungsvollen Export von AP durch TM 6. Die negative Ladung könnte durch den elektrochemischen Gradienten, der über der Membran besteht, verstärkend auf den Export durch TM 6 einwirken. Möglicherweise erreicht die Position von Asp₃₈₀ den Zugang zum hydrophilen Außenbereich der periplasmatischen Membranoberfläche. Mit -17,3 kcal/mol unterschreitet der hydrophobere N-terminale Abschnitt deutlich die von Lee und Manoil vermutete Hydrophobizitätsgrenze für funktionstüchtige Exportdomänen von -23 kcal/mol (Lee & Manoil, 1994). Die TM 6 der Fusion 623 IIIAP könnte demnach eine funktionell begründbare Ausnahme der Regel von einer Hydrophobizitätsgrenze darstellen.

Die Fusion 644 IIIAP zeigt einen ähnlich hohen AP-Meßwert wie 623 IIIAP. Hier liegt die negative Ladung drei Aminosäuren vom Arginin entfernt, nahe des N-Terminus von TM 6. Die Ladungen könnten sich theoretisch neutralisieren, wie dies bei der Leader Peptidase (Lep) beobachtet werden konnte (Andersson & von Heijne, 1993a). Wenn dies der Fall wäre, würde man eine AP-Aktivität ähnlich der des Wildtyps erwarten, was aber nicht zutrifft. Gegenüber der Fusion 616 IIIAP (Arg in der selben Position) ist die AP-Aktivität fast verdoppelt, und dies obwohl die Hydrophobizität und die Anzahl der hydrophoben Aminosäuren im Exportsignal reduziert ist. Eine gegenseitige Neutralisation von Asp₃₇₅ und Arg₃₇₂ ist auch deswegen unwahrscheinlich.

Das legt die Möglichkeit nahe, daß das negativ geladene Aspartat an der N-terminalen Position in TM 6 eine neue, bisher unbekannt funktionelle Rolle im Exportprozeß spielen könnte und diesen damit fördert.

Die Fusionen mit ungeladenen Substitutionen besitzen AP-Aktivitäten vergleichbar der des Wildtyps. Dadurch wird (analog zur Stop-Transfer-Sequenz) angezeigt, daß die Position als solche oder denkbare wichtige Interaktionen mit einer in der Sequenz benachbarten Aminosäure keinen entscheidenden Beitrag für die Funktion einer Exportsequenz liefern und daß die Auswirkung einer positiv geladenen Aminosäure auf die Ladung selbst zurückzuführen ist. Die geringen vorhandenen Unterschiede der AP-Aktivität können durch die Meßgenauigkeit des experimentellen Systems erklärt werden.

Als Alternative kann angenommen werden, daß es Feinabstimmungen für die Exporteigenschaften einer TM gibt, für die nicht die Hydrophobizität verantwortlich ist. So bewirkt der Austausch des hydrophilen Asparagin gegen das hydrophobere Threonin der Fusion 652 IIIAP ein Drittel weniger Export als TM6 IIIWT. Der Austausch des hydrophoben Leucin gegen das hydrophile Glutamin der Fusion

6190 IIIAP weist ebenfalls einen leicht reduzierten Export auf. In der Fusion 615 IIIAP ist die strukturell bestimmende Aminosäure Glycin (enge 'Turns') gegen ein Cystein ausgetauscht, was zu einem geringfügig höheren Export von ca. 15% gegenüber dem WT führt.

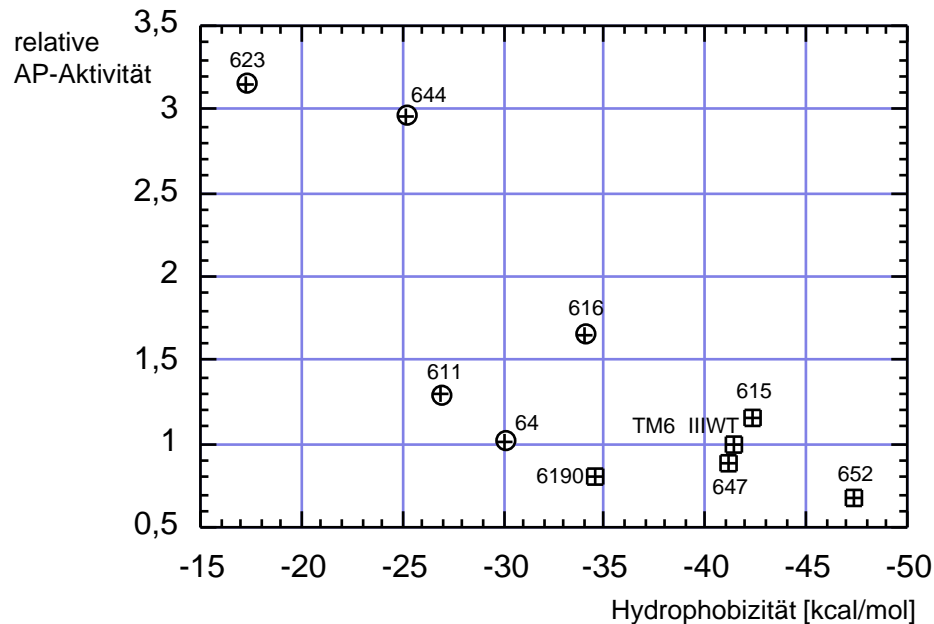


Abbildung 17. Die TM 6 von MalF III-AP-Fusionen als Exportsignal.

Dargestellt sind die Hydrophobizitäten der TM 6 Derivate in Relation zur AP-Aktivität.

Hydrophobizität: Die Hydrophobizitätswerte der Aminosäuren (in [kcal/mol] nach der GES-Skala (Engelman *et al.*, 1986)) des hydrophoben Abschnitts einer TM 6 wurde addiert (Wildtyp: Thr370 - Leu392).

Teilt ein geladener Rest die TM 6 in zwei Teile, wurde die Hydrophobizität des am stärksten hydrophoben TM-Abschnitts verwendet.

Relative AP-Aktivität: Der relativen AP-Aktivität des Wildtyps (TM6 IIIWT) von 1 entsprechen 75 Units (Tabelle 12). Runde Symbole: TM 6-Derivate mit geladener Aminosäure. Quadratische Symbole: TM 6-Derivate mit ungeladenen Aminosäuren.

2.2 Grundlegende Exportbedingungen für die C-terminale hydrophile Domäne des polytopen Membranproteins MalF-AP-Fusion J

Es wurde bereits beschrieben, wie Punktmutationen geladener und ungeladener Aminosäuresubstitutionen die Exportfunktion und die Stop-Transfer-Funktion der TM 6 von MalF, beeinflussen (siehe IV.2.1).

Aus den Phänotypcharakterisierungen kann aber geschlossen werden, daß keine der untersuchten Punktmutationen Topologieänderungen auslöst. Von 44 Mutanten sind lediglich 9 überhaupt nicht in der Lage, Wachstum auf Maltose/Maltodextrin zu ermöglichen. Von diesen 9 Mutanten exprimieren 6 stabiles MalF-Protein. Die restlichen drei Mutanten sind instabil *in vivo*, zeigen aber auf Westernblots noch reduzierte Mengen an MalF mit wildtypischem Molekulargewicht. Welche Arten von Mutationen wären nötig und ausreichend um eine Topologieveränderung herbeizuführen, so daß der C-Terminus eines Proteins (hier: das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) als Reporterprotein) seine Lokalisation verändert und auf die andere Seite der Membran transloziert wird? Welche Ergebnisse würde eine genetische *in-vivo*-Selektion zur Klärung dieser Frage hervorbringen? Welche spontane, in der Zelle selbst stattfindende Mutationen würden entstehen?

Zum einen könnten die Veränderungen das Protein selber betreffen: Wie am Beispiel der TM 6 von MalF gezeigt (siehe IV.2.1), wäre es möglich, daß geladene und sehr hydrophile Aminosäuren die unmittelbar N-terminale TM vor dem C-Terminus auflösen, so daß keine Translokation mehr stattfindet. Möglich ist auch, daß die Verteilung positiver Reste in cytoplasmatischen Ankerdomänen abgeändert werden. Denkbar wären auch Deletionen am Protein. Zum anderen könnte aber auch außerhalb des Proteins ein zellulärer Translokationsapparat, möglicherweise die Sec-Maschinerie, mutiert werden.

Dieser Fragestellung ist Kerstin Uhland im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Uhland, 1994) nachgegangen. Sie hat mit einem genetischen Selektionssystem Mutanten erzeugt, isoliert und weiter charakterisiert. Meine Aufgabe im Rahmen einer Zusammenarbeit war es, die isolierten Mutanten zu sequenzieren, um die genetischen Veränderungen festzustellen und die mutierten Proteine durch Westernblotting nachzuweisen (Uhland *et al.*, 1994).

2.2.1 Das genetische Selektionssystem

Das für die genetische Selektion verwendete Fusionsprotein war die MalF-AP-Fusion J (Boyd *et al.*, 1987), kodiert auf dem Plasmid pDHB32*J. Diese Fusion besitzt die ersten drei Transmembrandomänen von MalF. Am C-terminalen Ende der zweiten periplasmatischen Domäne (mit ca. 180 Aminosäuren) befindet sich der Fusionspunkt mit AP (Abbildung 18). Der periplasmatischen Domäne und der AP ist die als Exportsignal funktionierende dritte Transmembrandomäne N-terminal vorgeschaltet.

Der für die Selektion verwendete *E. coli*-Stamm war KU8 mit den Mutationen *serB* und *trxB*. SerB ist eine Phosphoserin-Phosphatase. In der Serin-Biosynthese dephosphoryliert sie Serin-Phosphat zu L-Serin. Ihr Fehlen in KU8 verursacht eine Serin-Auxotrophie. TrxB ist eine Thioredoxin-Reduktase, die im Cytoplasma die Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert. Eine signalsequenzlose AP kann in einer TrxB-Mutante durch die Bildung ihrer Disulfidbrücken im Cytoplasma aktiv werden (Derman *et al.*, 1993). Sie ist damit durch ihre breite Substratspezifität in der Lage, den SerB-Defekt zu komplementieren, indem sie Phosphoserin zu L-Serin dephosphoryliert (Abbildung 18).

Da bei der MalF-AP-Fusion J die AP schnell ins Periplasma exportiert wird (Traxler *et al.*, 1992), kann der Stamm KU8 auf einem Medium ohne L-Serin nicht wachsen.

Die Selektion sollte nun solche Zellen hervorbringen, bei denen durch Mutation die AP der MalF-AP-Fusion J im Cytoplasma vorliegt und durch ihre Komplementation des SerB-Defekts das Wachstum auf Medium ohne L-Serin ermöglicht. Bei diesen Zellen sollte der Export der AP beeinträchtigt bzw. dessen Kinetik verlangsamt sein oder überhaupt nicht mehr funktionieren.

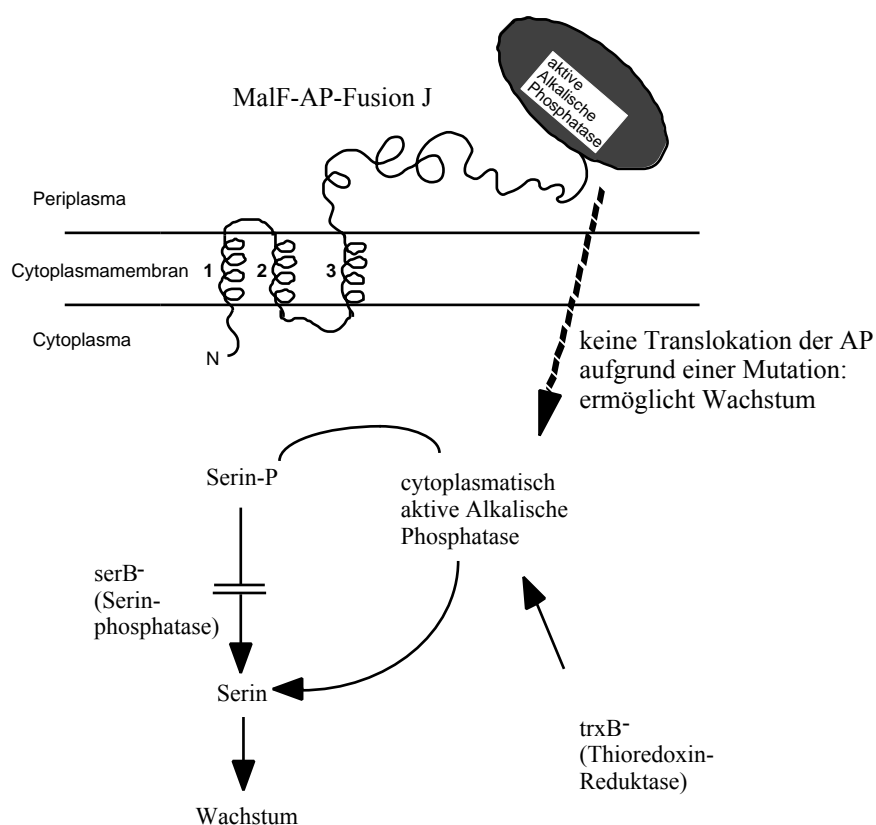


Abbildung 18. Prinzip der Selektion von Mutanten der MalF-AP-Fusion J, bei denen die AP im Cytoplasma vorliegt.

Oben im Bild als Schema ist das Fusionsprotein MalF-AP J mit seinen drei Transmembrandomänen zu sehen. Eine gesuchte neue zelluläre Mutation soll bewirken, daß AP der MalF-AP-Fusion J nicht mehr ins Periplasma transloziert wird. AP kann dann im Cytoplasma aufgrund der zellulären Mutation *trxB*⁻ aktiv werden und die zelluläre Mutation *serB*⁻ komplementieren. Solche Zellen sind am Wachstum auf Medium ohne L-Serin zu erkennen.

2.2.2 Mutationen, die das Wachstum in einem *serB trxB E. coli*-Stamm ermöglichen

Die Durchführung der genetischen Selektion erfolgte wie in Uhland *et al.* (Uhland *et al.*, 1994) beschrieben. Es wurden von Kerstin Uhland 11 Mutanten isoliert, die nur mit Hilfe des Plasmids auf MMA-Medium ohne Serin wachsen konnten. Durch Präparation der Plasmide und ihre Transformation in den ursprünglichen KU8-Stamm wurde sichergestellt, daß keine zusätzlich das Wachstum fördernde Mutation im Chromosom (bspw. in *serB*) vorlag. Die Stämme wurden gereinigt, danach die Plasmide für die Sequenzierung präpariert.

Die Sequenzierung ergab, daß in allen Plasmiden Deletionen aufgetreten sind, die Teile des MalF-N-Terminus der MalF-AP-J-Fusion entfernten (Abbildung 19).

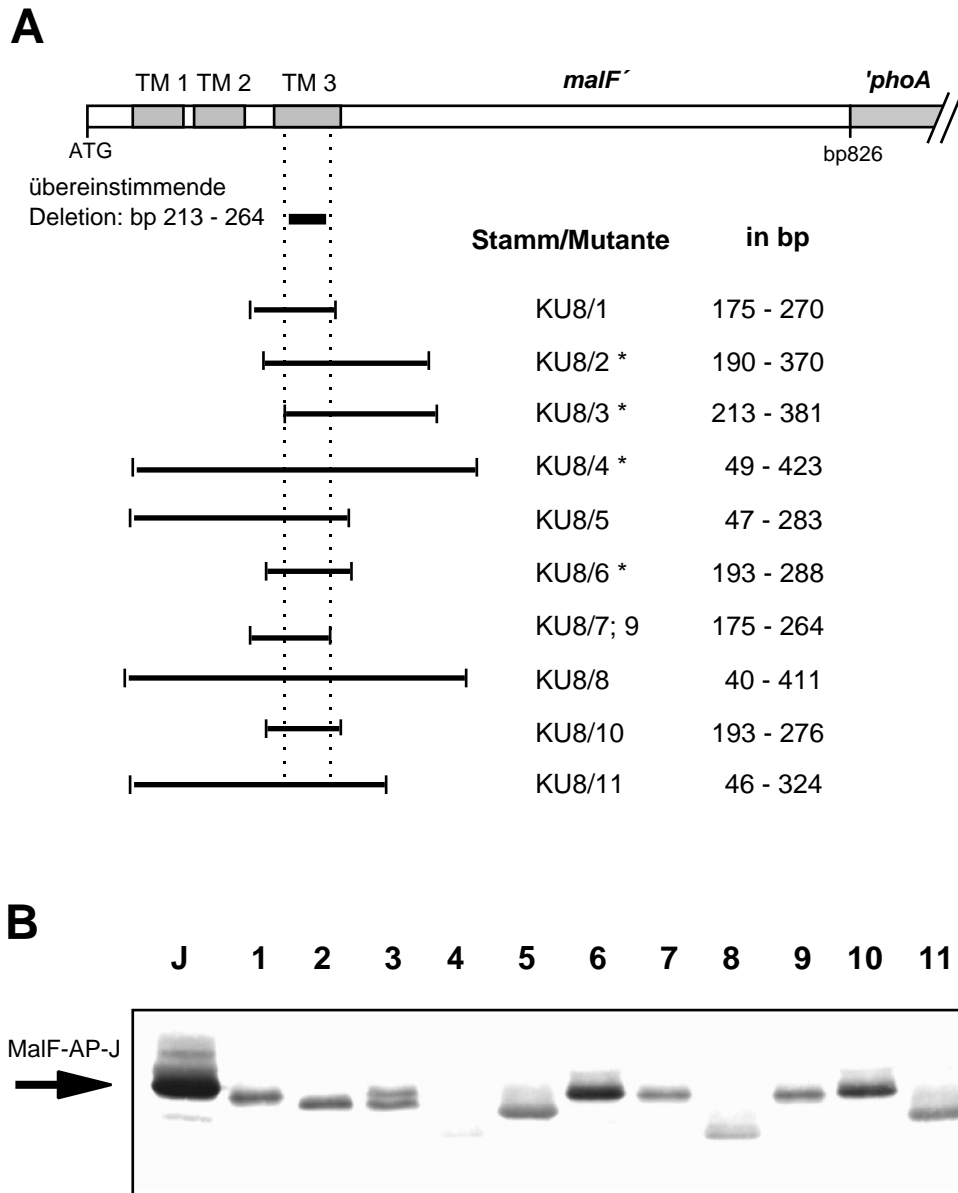


Abbildung 19. Deletionsderivate 1-11 von *malF-phoAJ. (Aus: Uhland *et al.*, (1994))**

Die Abbildung oben zeigt den N-Terminus von *malF-phoA**J. Die Transmembrandomänen (TM) 1-3 sind als schräg schraffierte Kästen dargestellt, von *phoA* ist nur ein N-terminales Fragment gezeigt.

A. Lokalisation der Deletionen in den Deletionsderivaten 1-11 von *malF-phoA**J. Der Bereich der Deletionen ist in Balken unterhalb des Gens dargestellt. Die genaue Deletion in bp für die Mutanten 1-11 ist angegeben.

* bedeutet eine Insertion oder den Austausch von Nukleotiden in der Nähe der Deletion. KU8/2: Insertion von ACG ATG ATG. KU8/3: A₂₁₃ ist durch C ersetzt. KU8/4: C₄₃TGAAA wurde durch C₄₃GA AAC CCG ersetzt. KU8/6AAC TAC GCA ATG sind inseriert.

B. Westernblot der MalF-AP J-Fusion und den Deletionsderivaten 1-11. Die Proteine der MalF-AP-Fusionen wurden im Stamm KU8 mit Hilfe von MalF-AP*J-Antikörper nachgewiesen. Die Proben für Westernblots stammen aus Ganzzellextrakten von Übernachtskulturen.

Bei den Mutanten 4, 5, 8 und 11 treten die vier größten Deletionen auf. Diese Deletionen eliminieren alle drei Transmembrandomänen des jeweiligen Fusionsproteins. Die Folge ist, daß keine Membraninsertion stattfinden kann, da kein Membranprotein mehr "existiert". Die Überreste des Fusionsproteins bzw. das neue Protein mit der AP ist im Cytoplasma lokalisiert.

Die Mutanten 1, 2, 3, 6, 7, 9 und 10 haben kleinere Deletionen erfahren. Durch ihre Deletion ging immer die dritte Transmembrandomäne vollständig verloren, zusammen mit verschiedenen großen flankierenden Sequenzabschnitten. Die Mutante 3 ist die einzige Fusion, bei der die zweite TM vollständig erhalten geblieben ist. Die Ausdehnung der Deletionen C-terminal der dritten TM variiert zwischen 0 (Mutanten 7 u. 9) und 52 Aminosäuren (Mutante 3).

Die Auswirkung aller Mutationen ist die, daß der Export der AP nicht mehr stattfinden kann. Die AP liegt somit im Cytoplasma vor und komplementiert den *serB*-Defekt, was zum Wachstum der Zellen auf MMA-Medium ohne Serin führt. Die entscheidende, in der Zelle entstandene Mutation ist die Veränderung der Topologie der Fusionsproteine. Andere Mutationen wurden nicht festgestellt, auch nicht die mögliche Deletion beispielsweise der TM 2 von MalF, was ebenfalls zu einer Topologieinversion geführt hätte (McGovern *et al.*, 1991).

Die Größe der Fusionsproteine stimmen mit den Größen der durch die Deletion zu erwartenden Proteingrößen überein (Abbildung 19). Die sichtbare Proteinmenge schwankt stark. Die Proteine der Mutanten 4 und 8 sind kaum mehr sichtbar. Diese Fusionsproteine besitzen die größten Deletionen, die am weitesten in die große periplasmatische Domäne (C-terminal der TM 3) hineinreichen. Tendenziell nimmt die durch Westernblotting nachweisbare Proteinmenge mit der Zunahme der Größe der Deletion ab. Eine Ursache könnte mangelnde Stabilität des resultierenden Proteins sein. Im Fall des Verlusts aller TMs (Mutanten 4, 5, 8, 11) kann im Cytoplasma keine Konformation mehr entstehen, die der des Wildtyps in irgendeiner Form nahekommt. Diese Proteine könnten von zellulären Proteasen als Substrat erkannt werden.

3. Modellierung eines Arbeitsmodells des MalF/MalG Transmembrankomplexes

Das Ziel dieser Modellierung ist ein Arbeitsmodell, welches die bisherigen Modelle (siehe unter II.2.9) des Transporters vertieft. Schwerpunkt dieses Modells ist das Verständnis der Transmembrandomänen (TMs) von MalF und MalG, d.h. ihr Beitrag zu Funktion und Struktur des Transporters. Das Modell soll die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Punktmutationen in den TMs 6 und 8 von MalF und weitere Punktmutationen der TM 7 (Pick, 1995) von MalF mit ihren beschriebenen Eigenarten dadurch besser zu verstehen helfen, daß sie in dem Bezugsrahmen der gesamten Proteinumgebung des Transporters gesehen und gedeutet werden. Das Modell soll außerdem in der Lage sein, für weitere experimentelle Daten, beispielsweise die der Maltosebindprotein-unabhängig arbeitenden Transportermutanten, eine Erklärungsmöglichkeit zu liefern. Schließlich sollten aus dem Modell Vorschläge zu weiteren Experimenten abgeleitet werden können, die nicht zuletzt zu seiner eigenen Überprüfbarkeit taugen.

Durch die Modellierung soll versucht werden, jede Helix im Komplex durch a) die relative Position ihres Helixzentrums zu dem der anderen Helices, b) die Orientierung (Rotation um die zentrale Helixlängsachse) zu den anderen Helices, c) die Lage der zentralen Helixlängsachse relativ zur seitlichen Lipidgrenze zu beschreiben.

Um dies zu erreichen, wurden Sequenzvergleiche mit homologen Proteinen durchgeführt und ausgewertet (IV.3.8 und 3.9), die Aminosäuresequenzen der TMs von MalF und MalG biophysikalisch und statistisch ausgewertet (IV.3.9) und experimentelle Ergebnisse mit einbezogen und gedeutet (IV.3.7 und Abbildungen 24 u. 26).

3.1 Sequenzvergleiche mit homologen Proteinen liefern Informationen über strukturelle Charakteristika der membranspannenden Segmente

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von MalF und MalG mit denen von homologen Proteinen liefert Aufschluß über konservierte und identische Sequenzabschnitte. Diese könnten gleichartige strukturelle und/oder funktionelle Aufgaben im jeweiligen Transportkomplex besitzen. Die Gewichtung der Informationen hängt jedoch davon ab, wie stark die Gesamtidentität der homologen Transporter ist. Zu bedenken ist, daß verschiedene zu transportierende Substrate der Architektur der homologen Transporter unterschiedliche Zwänge auferlegen, so daß dann Informationen aus einem Vergleich nur bedingt und mit Vorsicht verwertbar sind. Dies gilt auch für die Unterschiede der Zellhüllen bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakteriengruppen, die sicherlich spezifische Anforderungen an die Gestalt und Funktion der homologen ABC-Transporter stellen. Außerdem erhält man ab einem zu niedrigen Identitätsgrad keine für die Transmembrandomänen (die hier untersucht werden sollen) brauchbare Auswertung mehr. Das bedeutet beispielsweise, die Anzahl identischer Reste in Transmembrandomänen wird zu gering und die "Positionen, an denen polare Reste stehen können" (siehe unten), nehmen überhand. Unter ca 20% Identität unterscheiden sich die Transporter vermutlich zu sehr voneinander, als daß eine vergleichbare Position und Struktur für die Transmembrandomänen angenommen werden kann.

Die Suche nach homologen Sequenzen wurde mit den Sequenz-Suchservices BLITZ und FASTA des European Bioinformatics Institute (The EMBL Outstation) vorgenommen.

Folgende homologe Proteine wurden für Sequenzalignments ausgewählt:

Zu MalF (*E. coli*): MalF (*Salmonella typhimurium*), MalF (*Enterobacter aerogenes*), CymF (*Klebsiella oxytoca*), MalC (*Streptococcus pneumoniae*).

Zu MalG (*E. coli*): MalG (*Salmonella typhimurium*), MalG (*Enterobacter aerogenes*), CymG (*Klebsiella oxytoca*), MalD (*Streptococcus pneumoniae*).

Die Aminosäuresequenzidentitäten sind der Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Homologe Proteine zu MalF und MalG^a

	MalF (<i>S. ty.</i>)	MalF (<i>Ent. ae.</i>)	CymF (<i>Kleb. ox.</i>)	MalC (<i>Str. pn.</i>)
MalF (<i>E. coli</i>)	90,7 %	89,7 %	26,3 %	22,5 %
	MalG (<i>S. ty.</i>)	MalG (<i>Ent. ae.</i>)	CymG (<i>Kleb. ox.</i>)	MalD (<i>Str. pn.</i>)
MalG (<i>E. coli</i>)	93,6 %	92,6 %	30,5 %	30,2 %

^a Die Tabelle zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen von MalF und MalG (*E. coli*) mit den Sequenzen homologer Proteine. Die jeweiligen Sequenzidentitäten sind in Prozent (%) angegeben. Sie wurden mit dem Alignment-Programm Clustal V bestimmt. Sequenzen mit unter 20% Identität wurden für diese Arbeit nicht berücksichtigt.

Die Proteine der Maltosetransporter der Enterobakterien *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und *Enterobacter aerogenes* sind nahezu identisch. Sie transportieren Maltose und Maltodextrine.

Die Proteine CymF/CymG stellen eine Permease dar, die cyclische - und -Dextrine transportiert. Wie beim Maltosetransporter von *E. coli* ist das System offensichtlich Bindeprotein-abhängig und wird möglicherweise durch zwei Cym D-Proteine (mit ATP-Bindemotiv) energetisiert (Fiedler *et al.*, 1996). Ob es in *Klebsiella oxytoca* ein separates Maltosetransportsystem gibt, ist noch unbekannt.

Die Proteine MalC/MalD von *Streptococcus pneumoniae* stellen wahrscheinlich die Komponenten einer Gram-positiven Version eines Maltose- und Maltodextrintransporters dar (Bindeprotein: MalX). Die Gene sind Bestandteil eines Maltoseregulons, das eine Art Vorläuferversion des *E. coli*-Maltoseregulons sein könnte, da *Streptococcus pneumoniae* gegenüber *E. coli* als weniger evolviertes Bakterium betrachtet wird (Puyet & Espinosa, 1993).

Weitere homologe Sequenzen wurden für diese Arbeit nicht verwendet. Es gibt leider keine bekannten Proteine im wichtigen Homologiebereich von ca. 50%-70%. Die am nächsten homologen Kandidaten zu MalF (MsmF, LacF, AmyD, UgpA) weisen nur eine geringe Identität von knapp 17% auf (bezogen auf das vollständige MalF-Protein). Hydrophathie-Plots zeigen überdies, daß diese Kandidaten nicht wie MalF acht Transmembrandomänen besitzen, sondern wahrscheinlich nur sechs.

Wie sehr sich die Proteinsequenzen der Permeasen von *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* und *Streptococcus pneumoniae* ähneln, zeigen die zwei folgenden Hydrophathie-Plots in den Abbildungen 20 und 21. Die Plots lassen vermuten, daß die entsprechenden Permeasen-Proteine jeweils die selbe Anzahl an Transmembrandomänen besitzen.

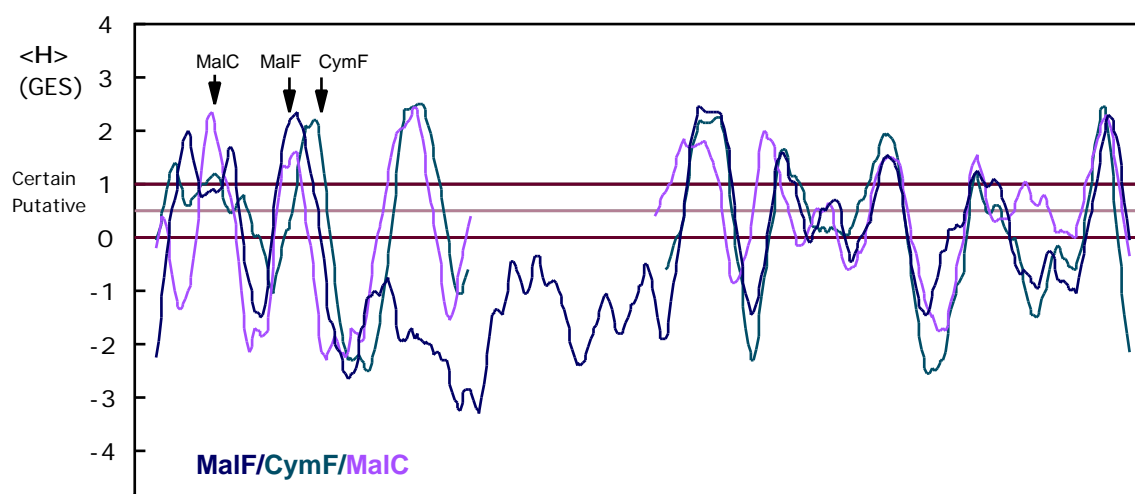


Abbildung 20. Hydropathie-Plots von MalF, CymF und MalC

Gezeigt ist die Hydrophobizität $\langle H \rangle$ der Aminosäuresequenzen von MalF, CymF und MalC nach den Werten von GES (Engelman *et al.*, 1986), berechnet mit TopPred II (Claros & von Heijne, 1994). Hydrophobe Werte liegen im positiven Bereich, die Werte der TMs liegen zumeist oberhalb der im Programm angegebenen "sicheren" Schwelle ("Certain"). Die Sequenzen von CymF und MalC wurden nach der 3. TM auseinandergeschnitten und auf den C-Terminus der MalF-Sequenz gelegt. Dazwischen liegt die zweite, 181 As lange periplasmatische Domäne von MalF, für die es in den anderen Proteinen keine Entsprechung gibt.

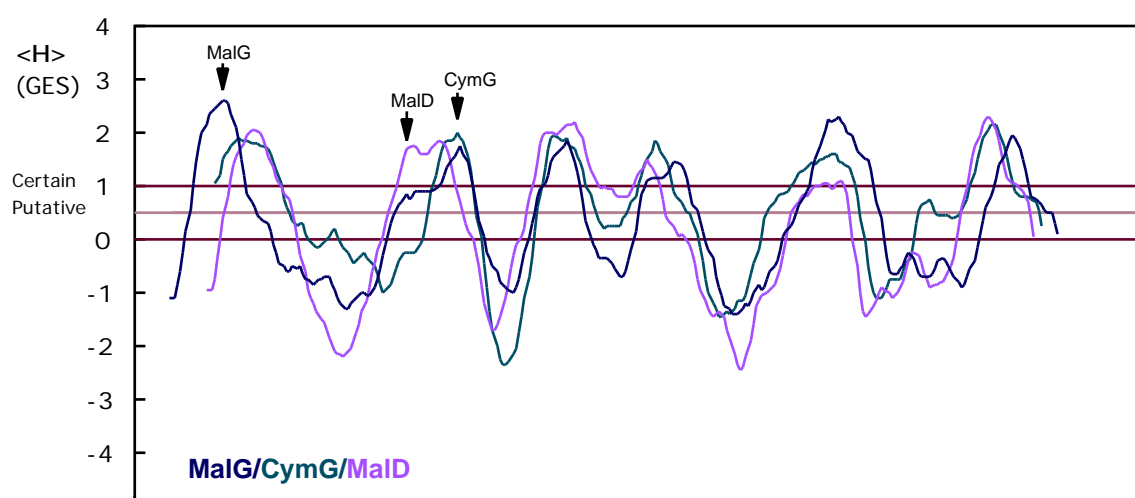


Abbildung 21. Hydropathie-Plots von MalG, CymG und MalD

Gezeigt ist die Hydrophobizität $\langle H \rangle$ der Aminosäuresequenzen von MalG, CymG und MalD nach den Werten von GES (Engelman *et al.*, 1986), berechnet mit TopPred II (Claros & von Heijne, 1994). Hydrophobe Werte liegen im positiven Bereich, die Werte der TMs liegen zumeist oberhalb der im Programm angegebenen "sicheren" Schwelle ("Certain"). MalG hat die längste der drei Aminosäuresequenzen, die beiden anderen Sequenzen wurden entsprechend den TMs darübergelegt.

3.2 Vorhersage der Topologie von CymF/CymG und MalC/MalD

Um die TMs der homologen Proteine einem Vergleich durch Alignments unterziehen zu können, mußten diese erst identifiziert werden. Weder von den CymF/CymG-Proteinen noch von den MalC/MalD-Proteinen liegen zur Zeit Topologiedaten vor. Ihre TMs wurden hier mit dem Topologievorhersage-Programm TopPred II (Claros & von Heijne, 1994) bestimmt und im Alignment (Abbildungen 22 und 23) durch Unterstreichen gekennzeichnet, ohne daß dabei eine Korrektur "von Hand" vorgenommen wurde. Dabei wurde die GES-Skala des Programms angewandt. Es wurden nur "sichere" TMs übernommen (Abbildungen 20 und 21). Diese mußten auch durch die Kyte-Doolittle (KD)-Skala als sicher bewertet werden (Ausnahme: Die TM 7 von CymF ist nach KD nur putativ. Sie wurde übernommen, weil die TMs 7 von MalF und MalC beide typischerweise schwach hydrophob sind und sich außerdem in einem stark konservierten Bereich befinden). Außerdem konnten alle identifizierten putativen TMs durch das PHDtopology-Programm des PredictProtein servers, EMBL Heidelberg, bestätigt werden, mit der Ausnahme der TMs 1 und 3 von MalC und TM 2 von CymF.

3.3 Beschränkung der Untersuchung einer jeden Helix auf ihre putativ zentralen achtzehn Aminosäuren

Die Aminosäuresequenz der TMs wurde für diese Untersuchung auf die jeweils zentralen achtzehn Aminosäuren beschränkt. Zirka zwanzig Aminosäuren ist die Anzahl, die für die Durchquerung des hydrophoben Kernbereichs der Lipidmembran (ca. 30 Å) ausreicht, wenn eine Helix annähernd senkrecht die Membran durchquert (Reithmeier, 1995). Durch die Limitierung auf achtzehn Aminosäuren werden die Aminosäuren an den Helixenden, die mit dem Schnittstellenbereich der Membran zur wäßrigen Lösung (Kopfgruppenbereich der Lipide, ca. 15 Å dick (White & Wimley, 1994)) in Kontakt treten könnten, in ausreichendem Maße ausgeschlossen. Dies betrifft häufig die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin mit ihrer polaren Hydroxylgruppe, die in diesem Grenzbereich bei Helices von integralen Membranproteinen zu finden sind (Cowan & Rosenbusch, 1994; Landolt-Marticorena *et al.*, 1993). Durch die Limitierung können die verbleibenden polaren Reste im Zentrum einer Helix, die ihre Orientierung beeinflussen, eindeutiger erfaßt und dargestellt werden.

Endgültige Positionen von Helices im MalF/MalG-Proteinkomplex (nach dem Assembly-Vorgang) könnten durch Längenverschiebung und Neigung bestimmt sein, ähnlich den Verhältnissen im Photosynthese-Reaktionszentrum (Rees *et al.*, 1989b). Der Kernbereich von achtzehn Aminosäuren würde hier vermutlich mit größerer Wahrscheinlichkeit an Interaktionen beteiligt sein, als ein möglicherweise aus dem Proteinkomplex herausragendes N- oder C-terminales Helixende.

In Kernbereichen der TMs 6, 7, 8 von MalF sind außerdem alle Aminosäuren enthalten, zu denen es Informationen über Punktmutanten (Einzelaminosäureaustausche) gibt. Die einzige Ausnahme betrifft L443 in TM 7. Diese Aminosäure wird hier dem N-terminalen Ende der Helix zugeordnet.

3.4 Durchführung der Alignments und ihre Auswertung

Die Alignments (Abbildungen 22 und 23) wurden mit dem Programm Clustal V in Standardeinstellung durchgeführt. Sie wurden nach folgenden Kriterien überarbeitet: Gaps in TMs wurden nicht zugelassen, sondern geschlossen. Falls notwendig, wurden einander entsprechende TMs, die sich zu wenig überdeckten, übereinandergelegt. Dabei ist die angrenzende Sequenz so wenig wie möglich in den Korrekturbereich einbezogen worden; zusätzliche Gaps wurden, wenn möglich, vermieden¹.

Im folgenden werden die Auswertungskriterien definiert, nach denen die Alignments untersucht werden. Es wird ferner beschrieben, welche Informationen für die Erstellung des MalF/MalG-Arbeitsmodells erwartet werden können.

3.4.1 Konservierte und identische Reste

Von diesen Resten wird erwartet, daß sie eine Rolle in *den* Bereichen von Struktur und Funktion spielen, die alle vergleichbaren Transporter gemeinsam besitzen. Konserviert wären somit hauptsächlich die strukturell festgelegten Interaktionsbereiche von im Proteinkomplex benachbarten Helices (zahlenmäßig vermutlich die meisten konservierten Reste), aber auch Strukturbildner wie Proline, außerdem die Aminosäurereste einer geforderten Substratbindestelle, die sich im zentralen Kanal des Komplexes befinden könnte und vielleicht auch Reste, die eine Rolle bei der putativen Signaltransduktion nach Bindung des MBP zu den assoziierten, ATP-bindenden Proteinen (MalK) spielen könnten.

3.4.2 Positionen, welche von polaren Resten eingenommen werden können.

"Positionen polarer Reste" sind die Aminosäurepositionen der zu untersuchenden Proteinsequenz, an welchen sich in einer oder mehreren der gereihten Sequenzen (oder in der zu untersuchenden Proteinsequenz selbst) eine polare Aminosäure befindet.

Gegen das Proteinzentrum oder gegen benachbarte Helices gerichtete Reste bei integralen Membranproteinen sind im Durchschnitt stärker polar als nach außen gegen das Lipid gerichtete Reste (Engelman & Zaccari, 1980; Rees *et al.*, 1989a).

Die "polaren Positionen" gemäß dem Alignment sollten zusammen mit den tatsächlich vorhandenen polaren Resten einer Helix gehäuft auf einer Helixseite auftreten und dabei alle Aminosäuren der Klasse 2 (siehe IV.3.6.1) umfassen. Es wird vermutet, daß eine etwas stärker polare Helixseite der etwas hydrophoberen Seite mehr oder weniger gegenüberliegt. Bei einer Untersuchung von 35 Transmembranhelices ergab sich ein Durchschnittswinkel von 129° zwischen der Lipidseite der "durchschnittlichen Helix" und ihrer hydrophileren Seite (Rees *et al.*, 1989a).

¹Im Einzelnen sind diese Korrekturen ausgeführt worden:

Alignment der MalF-Homologen: Für die Größe der periplasmatische Domäne in MalF zwischen TM 3 und TM 4 (187 As; vorhanden bei *E. coli*, *Ent. ae.*, *S. ty.*) gibt es in den anderen Proteinen keine Entsprechung. Es wurden daher vor dem durchzuführenden Alignment 140 Aminosäuren aus ihrer Mitte, zu denen es die geringste Homologie gab, herausgeschnitten und nach dem alignen wieder eingesetzt. Gaps wurden in TM 1 (MalC) und TM3 (alle Proteine) geschlossen. Die TM 2 von CymF und MalC mußte über die TM 2 der MalF-Proteine der Enterobakterien gelegt werden (siehe auch im Hydrophobizitätsprofil). Ab Transmembrandomäne 4 mußten keine Gaps mehr geschlossen werden und die Transmembrandomänen waren immer direkt übereinander angeordnet.

Alignment der MalG-Homologen:

In TM 4 der Sequenz der MalG-Proteine wurde ein Gap geschlossen. Weitere Korrekturen an den Transmembranbereichen wurden nicht ausgeführt. Alle Transmembrandomänen sind durch das Alignment genau übereinander angeordnet worden.

Positionen polarer Reste können den Interaktionsbereich mit benachbarten Helices oder eine kanalzugewandte Seite anzeigen. Im Protein eingeschlossene Helices, die keine oder nur eine minimal membran zugewandte Seite besitzen, können entlang ihrer gesamten Oberfläche "polare Positionen" (gemäß dem Alignment) aufweisen.

Für diese Analyse ist es wichtig, nicht mehr als die achtzehn Aminosäuren des zentralen Helixbereiches einzubeziehen (siehe unten), da die Reste C- und N-terminal davon immer die hydrophile Oberfläche der Membrangrenze erreichen könnten bzw. mit ihr in Kontakt stehen. Diese Positionen können aber im "helical wheel" an jeder beliebigen Seite auftreten und so die membran zugewandte Seite mehr oder weniger "verdecken".

Es wird hier angenommen, daß auch innerhalb der achtzehn zentralen Aminosäuren die Positionen 1, 2, 3 und 16, 17, 18 die hydrophile Oberfläche erreichen könnten, so daß sie im "helical wheel" als polare Reste gekennzeichnet sind und trotzdem lipid zugewandt positioniert werden.

3.4.3 Nicht identische Positionen bei eng verwandten Sequenzen

Die Aminosäuresequenzen von MalF und MalG der Enterobakterien sind zu ungefähr 90% identisch. Wenn diese Proteine tatsächlich die selbe Funktion/Struktur besitzen (wie hier angenommen wird), dann müssen die Sequenzunterschiede an unbedeutenden Positionen liegen. In den Transmembransegmenten liegen diese Positionen mit großer Wahrscheinlichkeit an den Randbereichen des Komplexes an das Lipid angrenzend.

3.5 Länge der Loops zwischen den Transmembrandomänen

Die Länge der interhelicalen Loops benachbarter, nebeneinanderliegender Transmembrandomänen im Photosynthese-Reaktionszentrum von *Rhodospseudomonas viridis* beträgt in den L- und M-Untereinheiten zwischen minimal 4 und maximal 36 Aminosäuren. Der Loop zwischen Helix C und Helix D, die nicht benachbart sind (Helix E liegt dazwischen), ist 31 Aminosäuren lang (Deisenhofer & Michel, 1989a).

Im allgemeinen Modell der Uniporter / Symporter / Antiporter Superfamilie wird eine kurze Looplänge bis ca. elf Aminosäuren für vermutlich benachbarte Helices errechnet, und ab ca. vierzehn Aminosäuren müssen die Helices nicht mehr direkt nebeneinander stehen (Goswitz & Brooker, 1995). Im allgemeinen Modell der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren von Baldwin beträgt der höchste Wert für die Looplänge benachbart geltender Helices dreizehn Aminosäuren (Baldwin, 1993).

Diesen Arbeiten folgend wird ebenfalls die Grenze von vierzehn Aminosäuren angenommen, ab welcher Helices nicht mehr nebeneinander legen müssen, wohl aber können. Helices mit einer verbindenden Looplänge bis dreizehn Aminosäuren werden als direkt benachbart angesehen (Tabelle 17).

3.6 Biophysikalische und statistische Analysen zur relativen Orientierung der Helices von MalF und MalG

3.6.1 Einteilung der Aminosäuren in zwei Klassen

Für die Bewertung der Helixorientierung wurden, einem Schema von Baldwin folgend (Baldwin, 1993), alle Aminosäuren in zwei Klassen eingeteilt.

Klasse 1: Aminosäuren, die mit dem den integralen Proteinteil umgebenden Lipid in Kontakt treten können. Diese Klasse beinhaltet alle hydrophoben Aminosäuren einschließlich der polaren As Serin, Threonin und Tyrosin. Serin und Threonin können ihr Wasserstoffbrücken-Bindungspotential an dem Rückgrad der Helix sättigen (Gray & Matthews, 1984) und Tyrosin wurde an lipidzugewandten Oberflächen von Bacteriorhodopsin und Porinen gefunden (Cowan *et al.*, 1992; Henderson *et al.*, 1990; Weiss *et al.*, 1991). Alle Aminosäuren der Klasse 1 können im Modell direkt an die Membran grenzen.

Klasse 2: Aminosäuren, die man nicht in Kontakt mit dem Lipid erwarten würde. Dies sind die Reste Asparagin, Glutamin, Histidin, Aspartat, Glutamat, Lysin, Arginin und Tryptophan. Außer Tryptophan sind es entweder geladene Reste oder solche, die mehr als eine H-Brücke bilden können. Die Abwesenheit von Tryptophan in direkt an die Membran grenzenden Bereiche wurde beim Photosynthese-Reaktionszentrum (Schiffer *et al.*, 1992) und auch bei Porin beobachtet und wird durch statistische Analysen über Membranproteine mit bekannter Topologie als eher generelles Charakteristikum bestätigt (Jones *et al.*, 1994b).

Im Modell werden die Helices so positioniert, daß keine der vorhandenen Aminosäuren der Klasse 2 Membrankontakt bekommt.

Die Einteilung der Reste in diese zwei Klassen stimmt mit den Befunden an den integralen Membranproteinen des Photosynthese-Reaktionszentrum und Bacteriorhodopsin überein (Deisenhofer & Michel, 1989b; Henderson *et al.*, 1990).

3.6.2 Unterscheidung von Transmembrandomänen bezüglich ihrer Hydrophobizität

Die durchschnittliche Hydrophobizität von TMs war bei der Erstellung eines allgemeinen (schematischen) Modells für die Anordnung der TMs für die Uniporter-, Symporter- und Antiporter-Proteinfamilien ein maßgebliches Kriterium. Schwach hydrophobe Domänen wurden als kanalauskleidende Domänen klassifiziert und als solche im Kanalbereich des Proteinkomplexes postiert. Die hydrophoberen Domänen wurden zwischen Lipid und den kanalauskleidenden Domänen eingeordnet (Goswitz & Brooker, 1995).

Für diese Arbeit wurde von jeder achtzehn Reste langen Helix eine mittlere Hydrophobizität nach der GES-Skala und nach den Werten von Eisenberg errechnet (Tabelle 15). Die mittlere Hydrophobizität soll hier ein Anhaltspunkt dafür sein, wie stark eine Helix ins Proteininnere oder gegen das Lipid positioniert ist. Hohe Hydrophobizitätswerte weisen auf Helices, die eher Lipidkontakt besitzen; niedrigere Werte werden für eher zentrale, eingeschlossene Helices vermutet. Außerdem wurden Durchschnittswerte ($\bar{}$) für die jeweils erste bis achte Helix aller MalF-homologen und für die jeweils erste bis sechste Helix aller MalG-homologen Proteine errechnet. Unter der Annahme, daß die Helices der homologen Proteine eine vergleichbare relative Position im jeweiligen Transportkomplex einnehmen, kann ein Durchschnittswert die Tendenz der Positionierung hervorheben.

3.6.3 Bewertung von Helixseiten durch das "Hydrophobe Moment"

Die Bewertung der Hydrophobizität und der Amphiphilizität der Helices wurde nach dem sogenannten "Hydrophoben Moment" von Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1982a) vorgenommen. Es ist eine quantitative Auswertung der Amphiphilizität (d.h. der asymmetrischen Verteilung hydrophober und hydrophiler Seitenketten) einer periodischen Peptid-Struktur wie die der α -Helix. Das Hydrophobe Moment gibt also die Stärke der periodischen Hydrophobizität einer Helix an. Je amphiphiler die Helix, desto größer ist der Betrag des Hydrophoben Moments μ .

Der Fourier-Term zur Berechnung der Werte für diese Arbeit stammt aus Eisenberg *et al.* (Eisenberg *et al.*, 1984) :

$$m_H = \sqrt{A^2 + B^2}$$

Der Winkel f des hydrophoben Moments und des Mutabilitätsmoments für die "helical wheels" wurde folgendermaßen berechnet:

$$f = \frac{360}{2\pi} \cdot \arctan \frac{B}{A} + 180 \cdot n$$

mit:

$$n = 0, 1, 2$$

$$A = \sum_{j=1}^N H_j \cos(jw)$$

$$B = \sum_{j=1}^N H_j \sin(jw)$$

$$j = 1, 2, \dots, N: \text{Aminosäuren im "helical wheel"}$$

In dieser Arbeit wird die Stärke des Hydrophoben Moments μ graphisch durch die Länge eines Pfeils in einem "helical wheel" dargestellt, die Ausrichtung der Hydrophobizität (senkrecht zur Helixlängsachse) durch die Richtung der Pfeilspitze dargestellt. Der Pfeil in einem "helical wheel" zeigt also auf die Helixseite, die aufgrund der höchsten Hydrophobizität am wahrscheinlichsten das Lipid kontaktieren würde (Abbildungen 24 und 25). Ist der Betrag für das Moment einer Helix hoch und damit eine starke Amphiphilizität angezeigt, ist dies ein Hinweis auf ihre Position an einer deutlich abgesetzten Grenzfläche. Ausgeprägte Grenzflächen entstehen, wenn wenig oder keine spezifische Interaktionen zwischen zwei Phasen vorhanden sind und es keine Übergangsphase gibt. Grenzflächen entstehen somit am Übergang Protein-Lipid, aber auch zwischen Kanal und Proteinkomplex. Ist eine Helix direkt zwischen Kanal und Lipid positioniert, wird eine hohe Amphiphilizität erwartet. Ist der Betrag eines Moments klein und nur eine geringe Amphiphilizität vorhanden, kann die Orientierung der Helix relativ zur Membran auch durch andere Kriterien bestimmt sein, beispielsweise durch eine von Prolin erzeugte konvexe Helixseite. Ein weiterer Faktor, der bei der Bewertung des hydrophoben Moments zu berücksichtigen ist, ist das Ausmaß der Einbettung einer Helix in das Proteininnere. Bei einer (nahezu) vollständig eingeschlossenen, wenig hydrophoben Helix muß die Richtung des Moments nicht mehr gegen das Lipid zeigen.

Um bei der Bewertung der Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren nicht von den Eigenheiten einer einzelnen Bewertungsskala abzuhängen, wurden die Hydrophoben Momente nicht nur nach der Skala von

Eisenberg *et al.* (Eisenberg *et al.*, 1982b), sondern auch nach der neueren Skala von Engelman, Steitz und Goldman (GES-Skala) (Engelman *et al.*, 1986) berechnet. Sie ist eine halbtheoretische Skala aus experimentell ermittelten Werten für polare und nicht-polare Charakteristika für Aminosäureseitenketten, kombiniert mit der Oberflächengröße von Seitenketten mit resultierender Hydrophobizität speziell in einer α -Helix. Auch polare Interaktionen in einer Helix werden berücksichtigt.

3.6.4 Bewertung von Helixseiten durch Mutabilität

Die Strukturanalysen der Photosynthese-Reaktionszentren-Familie (Rees *et al.*, 1989b) enthüllten eine schwache Konservierung von Resten in Transmembranhelices, die der Membran zugewandt sind (16%) im Gegensatz zu einer deutlich höheren Konservierung eingeschlossener Helixreste (60%), die Pigmentkontakt oder Kontakt mit anderen Helices haben. Dies läßt auf geringere Beschränkungen für membranexponierte Reste schließen, vermutlich aufgrund wenig spezifischer Interaktionen zu den Fettsäureketten der Membran. Eine lipidexponierte Helixseite läßt sich deshalb über die statistisch nicht-konservierten Aminosäuren einer Helixseite identifizieren.

Für diese Arbeit wurde die Mutations-Daten-Matrix von Jones *et al.* verwendet (Jones *et al.*, 1994b). Sie ist eine Aminosäuren-Vergleichs-Matrix, die auf einer Studie zu Austauschwahrscheinlichkeiten von Aminosäuren evolutionär verwandter und ähnlicher Proteinsequenzen beruht. Die verwendete Matrix wurde speziell aus Sequenzen von TMs polytooper Membranproteine erarbeitet. Ein besonderes Merkmal dieser Matrix ist die hohe Mutabilität von hydrophoben Resten (Isoleucin, Methionin, Valin) in einer Helix, wobei Leucin eine Ausnahme darstellt. Spezielle Reste wie Prolin, Tyrosin oder Tryptophan sind stark konserviert. Generell zeigt sich für polytope integrale Membranproteine eine recht hohe Konservierung von polaren Resten (Ausnahmen sind Serin und Threonin), die im Allgemeinen mit spezifischer Funktionalität (wie Bindung prosthetischer Gruppen bzw. Substrat, Kanalbildung und/oder Helixinteraktionen) in Verbindung gebracht wird.

Genau wie die Eigenschaft der Hydrophobizität kann die Mutabilität mit Hilfe eines Fourier-Terms kalkuliert werden (Etchebest & Popot, *in the press*). Das Moment der Mutabilität der MalF/MalG-Helices wurde mit dem Fourier-Term von Eisenberg *et al.* (Eisenberg *et al.*, 1984) berechnet und dargestellt (Tabelle 16; Abbildungen 24 und 25), und zwar analog zur Hydrophobizität (siehe oben). Damit wird eine gegebene periodische Verteilung oder Anordnung schwach konservierter Reste in der α -Helix sichtbar. Je höher der Betrag des Mutabilitätsmoments ist, desto weniger konserviert und bedeutend müßte dann die ausgewiesene Helixseite sein. Es wird angenommen, daß diese hierbei identifizierten Helixseiten sich mit den hydrophoben Helixseiten decken und gegen das Lipid gerichtet sind (sofern die Helix nicht ins Proteininnere gepackt ist, siehe unter IV.3.6.3).

Im Gegensatz zur mittleren Hydrophobizität kann die mittlere Mutabilität einer Helix (Tabelle 15) nicht als Maß für ihre Position im Proteinkomplex dienen (ins Innere gepackt oder eher im Randbereich). Die mittlere Mutabilität einer Helix gibt hier nur einen Wahrscheinlichkeitswert für ihre Existenz an.

3.6.5 Prolin im zentralen Bereich einer Transmembranhelix

Prolin im zentralen Bereich einer Helix beeinflusst deren Gestalt so, daß sich Konsequenzen für ihre räumliche Anordnung ergeben. Abgesehen von den drei N-terminalen Endpositionen einer Transmembranhelix verursacht Prolin einen Knick in der Helix. Die Helix erhält dadurch eine konvexe - eine offene Seite, die Prolin enthält - und eine konkave - eingeknickte, eingeschlossene - Seite. Solche Helices in globulären Proteinen tendieren dazu, überdurchschnittlich lang zu sein, weil sie dadurch stabiler werden und die nicht schließbaren H-Brücken besser tolerieren können. Die offene, konvexe Seite ist dabei tendenziell gegen das umgebende Lösungsmittel gerichtet, das H-Brücken besser als das Proteininnere sättigen kann (Barlow & Thornton, 1988). In Integralen Membranproteinen sind die Verhältnisse umgekehrt. Nur das Proteininnere kann die wegen Prolin nicht geschlossene H-Brücken im Helixrückgrad - wenn überhaupt - "versorgen", somit muß hier die konvexe Seite tendenziell ins Proteininnere gerichtet sein (von Heijne, 1991).

Eine Analyse der Helices mit Prolin im zentralen Bereich von Bacteriorhodopsin (BR) und dem Photosynthese-Reaktionszentrum (RC) von *Rhodospseudomonas viridis* (vier Helices von 18; das sind 22%) zeigt, daß sich die konvexe Seite einer uniform apolaren oder schwach amphiphilen Helix gegen benachbarte Helices oder gegen den Cofaktor im Proteinzentrum richtet (Ausnahme: die sehr starke polare Helixseite von BR-C zwingt diese mit der konvexen Seite gegen das Lipid) (von Heijne, 1991).

Bei der Untersuchung von 110 Prolin enthaltenden Transmembranhelices aus Proteinen von *E. coli* zeigt sich, daß die konvexe Seite der Durchschnittshelix polarer ist als die gegenüberliegende konkave Seite (von Heijne, 1991).

Die Orientierung einer Transmembranhelix (mit Prolin) ist dann schwer einzuschätzen, wenn diese mit dem größten Teil ihrer Oberfläche im Proteininneren liegt. Diese Helices sind meist weniger hydrophob und werden in ihrer Ausrichtung durch die Proteinumgebung beeinflusst. Dies trifft beispielsweise zu bei der TM 7 von MalF.

3.7 Experimentelle Daten als Kriterium für die Anordnung der Helices

Die folgenden experimentellen Ergebnisse werden als Hinweise zur Anordnung der Helices verwendet (IV.3.7.1-3.7.6). Die im folgenden aufgeführten Mutationen verursachen Veränderungen im Proteinmolekül, die man unter die Stichworte "Assembly-Störungen", "Konformationsveränderungen" und "Funktionsdefekte" fassen kann. Für diese Arbeit wurde versucht, die Positionen der Helices, deren Veränderung zu den unten beschriebenen Eigenschaften führt, so anzuordnen, daß sich eine plausible Deutung dieser Mutationen ergibt.

3.7.1 Mutanten des MalF-Proteins mit der Folge einer Instabilität *in vivo* oder einer erhöhten Proteasesensitivität

Diese Mutanten betreffen Positionen in den TMs 6, 7 und 8 von MalF, an denen eine oder mehrere verschiedene Punktmutationen zu einer Instabilität *in vivo* oder zu einer erhöhten Proteasesensitivität (durch Proteinase K) von MalF führen (siehe IV.1.2.2; IV.1.3; (Pick, 1995)). Es wird angenommen, daß diese Mutationen am ehesten in Interaktionsbereichen von Helices liegen und nicht gegen das Lipid gerichtet sind, prinzipiell aber überall dort zu finden sind, wo die Struktur des funktionsfähigen Transporters durch die Sequenz determiniert ist.

3.7.2 Mutanten mit der Folge eines konditionalen (Transport-) Defektes (Temperatursensitivität)

Temperatursensitive Punktmutationen wurden in den TMs 6, 7 und 8 von MalF isoliert (siehe IV.1.2.8; (Pick, 1995)). Diese Mutationen könnten in Interaktionsbereichen innerhalb des Proteins liegen und auch eine Rolle in der Faltung des Integralen Membranproteins spielen.

3.7.3 Mutanten mit der Eigenschaft einer veränderten Substratspezifität

Darunter fallen Punktmutationen in den TMs 6, 7 und 8 von MalF, welche in die Kategorien der Substratphänotypen IV (Mal⁺Dex⁻), V (Mal⁻Dex⁺) und Dex^{dom-} einzuordnen sind (siehe IV.1.2.5; (Pick, 1995)). Die Position dieser Mutationen wird am Kanalrand oder in Interaktionsbereichen von Helices vermutet, deren Flexibilität beim Transportvorgang vielleicht eingeschränkt wird.

3.7.4 Clusterung von Punktmutationen, die die Transportfunktion verändern

Eine Clusterung von Punktmutationen, die die (Transport-) Funktion von MalF beeinträchtigen, findet sich in den Helices 6 und 7 von MalF (Abbildung 4; (Pick, 1995)). Die große Mehrheit dieser Positionen in TM 6 wird wegen der Beeinträchtigung des Maltosetransports gegen den Kanal gelegt, in TM 7 werden Mutanten aufgrund der Positionen an der hydrophileren Seite der Helix am Kanal, aber auch in angrenzenden Interaktionsbereichen mit TM 6 und TM 8 vermutet.

3.7.5 Suppressoranalyse von Mutanten in MalF

Für zwei verschiedene (Ausgangs-) Punktmutationen in TM 7 von MalF wurden verschiedene supprimierende Punktmutanten in TM 6 und TM 8 von MalF isoliert. Es wird eine direkte räumliche Nähe der Suppressormutanten bzw. der entsprechenden TMs 6 und 8 zur TM 7 vermutet (Ulrich, 1996; Ehrle *et al.*, 1996). Für die Suppressoren von P₄₂₈E in TM 8 wird eine indirekte Suppression (über räumliche Distanz, gegenüberliegende Helixseite) angenommen.

3.7.6 MBP-unabhängige Mutationen

Die Proteinbereiche in MalF, in welchen diese Mutationen auftreten, wurden in eine proximale und eine distale Region eingeteilt. Die verschiedenen Mutantenpaare lösen möglicherweise zwei synergistisch gekoppelte Ereignisse aus: Das Öffnen des Kanals mit dem Verfügbarwerden einer Substratkontaktstelle und der Aktivierung der ATPase (MalK) mit nachfolgenden Konformationsveränderungen. Die Anordnung der Helices soll eine plausible Erklärungsmöglichkeit für diesen komplexen Vorgang bieten.

3.8 Ergebnisse der Sequenzvergleiche

Der Sequenzvergleiche (Abbildungen 22 und 23) mit den homologen Proteinen zeigen, daß der Bereich der höchsten Konservierung im C-Terminus der Proteine liegt. Dieser Bereich umfaßt die vier C-terminalen TMs der MalF-homologen und die drei C-terminalen TMs der MalG-homologen Proteine. Besonders stark konserviert ist dabei die EAA-X₃-G-X₉-I-X-LP Consensus Sequenz im jeweils letzten cytoplasmatischen Loop und die Sequenz des letzten periplasmatischen Loops. Die geringste Homologie der Proteine ist im N-Terminus bis einschließlich der jeweils ersten beiden TMs zu finden. Dies weist auf die Bedeutung des C-Terminus von MalF und MalG bei der Funktion des Transporters hin.

3.9 Identifizierung struktureller Eigenschaften der Transmembranhelices von MalF und MalG

Die Auswertung der Kriterien für die Sequenzvergleiche (Abbildungen 22 und 23) mit den homologen Proteinen von MalF bzw. MalG ist direkt in die "helical wheel"-Darstellung der TMs von MalF/MalG übertragen worden (Abbildungen 24 und 25). Das betrifft konservierte und identische Reste, Positionen an denen polare Reste stehen können und nicht identische Positionen eng verwandter Sequenzen. Ebenso wurden die Hydrophobizitäts- und Mutabilitätsmomente (Tabellen 15 und 16) übertragen, sowie die von Prolin hervorgerufenen konvexen und konkaven Helixseiten. Die mittlere Hydrophobizität (Tabelle 15) ist dagegen in den Abbildungen 24 und 25 nicht dargestellt, wird aber bei dem Arrangement der Helices im Arbeitsmodell als wichtiges Kriterium berücksichtigt.

Die resultierenden Eigenschaften der Helices werden schließlich in der Tabelle 14 aufgezeigt und beschrieben. Das hervorzuhebende Ergebnis zu den strukturellen Eigenschaften der Helices ist die jeweils individuelle asymmetrische Verteilung von bestimmten Merkmalen (Kriterien) einer jeden Helix. Sie ist dadurch gegeben, daß ein Merkmal (z.B. konservierte Reste) vorwiegend oder ausschließlich auf einer Helixseite liegt. Liegen mehrere Merkmale vorwiegend oder ausschließlich auf einer Seite, sind sie "geclustert". Beispielsweise liegen in MalF TM 3 die konservierten Reste und polaren Positionen "geclustert" an der gemeinsamen konvexen Helixseite, die an eine hydrophobe Helixseite angrenzt bzw. ihr schräg gegenübersteht.

Es ist bei allen Helices von MalF und MalG möglich, jeweils ausreichend deutlich voneinander abgegrenzte Seiten der Helixplots zu unterscheiden, was darauf hinweist, daß diese TMs tatsächlich Helices sind.

CymF - Kleb.ox. -----VGLKNFITLFE~~LRI~~WSKTFVG
 MalC - Str.pn. -----VGLTNFTNIW~~SL~~STFRSAF~~GS~~
 MalF - Ent.ae. P~~N~~A~~D~~I~~G~~F~~Y~~Q~~S~~I~~N~~A~~D~~G~~S~~W~~G~~N~~E~~K~~L~~S~~P~~G~~Y~~T~~V~~T~~I~~G~~W~~D~~N~~F~~T~~R~~V~~F~~Q~~D~~E~~G~~I~~Q~~K~~P~~F~~F~~A~~
 MalF - S.ty. P~~N~~N~~D~~S~~G~~Y~~Y~~Q~~S~~I~~N~~D~~G~~S~~W~~G~~D~~E~~K~~L~~S~~P~~G~~Y~~T~~V~~T~~I~~G~~A~~K~~N~~F~~T~~R~~V~~F~~T~~D~~E~~G~~S~~Q~~K~~P~~F~~F~~A
 MalF - E.coli P~~N~~N~~Q~~I~~G~~F~~Y~~Q~~S~~I~~T~~A~~D~~G~~N~~W~~G~~D~~E~~K~~L~~S~~P~~G~~Y~~T~~V~~T~~T~~G~~W~~K~~N~~F~~T~~R~~V~~F~~T~~D~~E~~G~~I~~Q~~K~~P~~F~~L~~A~~
 * * * . * .

TM 4

TM 5

CymF - Kleb.ox. IG~~V~~W~~T~~V~~L~~W~~A~~F~~F~~A~~T~~L~~C~~T~~C~~S~~F~~G~~F~~L~~L~~A~~L~~A~~E~~N~~K~~K~~I~~I~~A~~K~~K~~A~~W~~R~~V~~V~~F~~I~~L~~P~~Y~~A~~I~~P~~A~~
 MalC - Str.pn. VL~~S~~W~~T~~I~~I~~W~~A~~L~~A~~A~~S~~T~~L~~Q~~I~~V~~I~~G~~I~~F~~T~~A~~I~~I~~A~~N~~Q~~P~~F~~I~~K~~G~~K~~R~~I~~F~~G~~V~~I~~F~~P~~S~~S~~L~~A~~V~~P~~A
 MalF - Ent.ae. IF~~V~~W~~T~~V~~V~~F~~S~~V~~L~~T~~V~~I~~L~~T~~V~~A~~V~~G~~M~~V~~L~~A~~C~~L~~V~~Q~~W~~E~~A~~L~~K~~G~~K~~A~~I~~Y~~R~~V~~L~~L~~I~~L~~P~~Y~~A~~V~~P~~S
 MalF - S.ty. IF~~V~~W~~T~~V~~V~~F~~S~~V~~L~~T~~V~~V~~L~~T~~V~~A~~V~~G~~M~~V~~L~~A~~C~~L~~V~~Q~~W~~E~~A~~L~~K~~G~~K~~A~~I~~Y~~R~~V~~L~~L~~I~~L~~P~~Y~~A~~V~~P~~S
 MalF - E.coli IF~~V~~W~~T~~V~~V~~F~~S~~L~~I~~T~~V~~F~~L~~T~~V~~A~~V~~G~~M~~V~~L~~A~~C~~L~~V~~Q~~W~~E~~A~~L~~R~~G~~K~~A~~V~~Y~~R~~V~~L~~L~~I~~L~~P~~Y~~A~~V~~P~~S
 . * * . . . * * . . * * . . * .

TM 5

CymF - Kleb.ox. FV~~T~~L~~L~~I~~F~~R~~L~~L~~L~~N~~G~~-I~~G~~P~~V~~N~~S~~T~~L~~N~~S~~W~~G~~I~~D~~S~~I~~G~~F~~L~~S~~D~~P~~L~~I~~A-----K~~M~~T
 MalC - Str.pn. FI~~T~~I~~L~~F~~S~~N~~M~~F~~N~~D~~S~~V~~G~~A~~I~~N~~T~~Q~~V~~L~~P~~I~~L~~A~~K~~F~~L~~P~~F~~L~~D~~G~~A~~L~~I~~P~~W~~K~~T~~D~~P~~T~~W~~T~~K~~I~~A~~
 MalF - Ent.ae. FI~~S~~I~~L~~I~~F~~K~~G~~L~~F~~N~~Q~~S~~F~~G~~E~~I~~N~~M~~M~~L~~S~~A-----L~~F~~G~~I~~K~~P~~A~~W~~F~~S~~D~~P~~T~~T~~A~~R~~T~~M~~
 MalF - S.ty. FI~~S~~I~~L~~I~~F~~K~~G~~L~~F~~N~~Q~~S~~F~~G~~E~~I~~N~~M~~M~~L~~S~~A-----L~~F~~G~~I~~K~~P~~A~~W~~F~~S~~D~~P~~N~~T~~A~~R~~A~~M~~
 MalF - E.coli FI~~S~~I~~L~~I~~F~~K~~G~~L~~F~~N~~Q~~S~~F~~G~~E~~I~~N~~M~~M~~L~~S~~A-----L~~F~~G~~V~~K~~P~~A~~W~~F~~S~~D~~P~~T~~T~~A~~R~~T~~M~~
 * . . * * . . * * . . * . .

TM 6

TM 7

CymF - Kleb.ox. VI~~A~~V~~S~~V~~W~~V~~G~~A~~P~~Y~~F~~M~~L~~L~~I~~T~~G~~A~~M~~N~~I~~P~~R~~D~~L~~Y~~E~~A~~S~~E~~V~~D~~G~~A~~S~~K~~F~~Q~~Q~~F~~R~~E~~I~~T~~L~~P~~M~~
 MalC - Str.pn. LI~~M~~M~~Q~~G~~W~~L~~G~~F~~P~~Y~~I~~Y~~V~~L~~T~~L~~G~~I~~L~~Q~~S~~I~~P~~N~~D~~L~~Y~~E~~A~~A~~I~~D~~G~~A~~N~~A~~W~~Q~~K~~F~~R~~N~~I~~T~~F~~P~~M~~
 MalF - Ent.ae. II~~I~~V~~N~~T~~W~~L~~G~~Y~~P~~Y~~M~~M~~I~~L~~C~~M~~G~~L~~L~~K~~A~~I~~P~~D~~D~~L~~Y~~E~~A~~S~~A~~M~~D~~G~~A~~G~~P~~F~~Q~~N~~F~~F~~K~~I~~T~~L~~P~~L
 MalF - S.ty. VI~~I~~V~~N~~T~~W~~L~~G~~Y~~P~~Y~~M~~M~~I~~L~~C~~M~~G~~L~~L~~K~~A~~I~~P~~D~~D~~L~~Y~~E~~A~~S~~A~~M~~D~~G~~A~~G~~P~~F~~Q~~N~~F~~F~~K~~I~~T~~L~~P~~L
 MalF - E.coli LI~~I~~V~~N~~T~~W~~L~~G~~Y~~P~~Y~~M~~M~~I~~L~~C~~M~~G~~L~~L~~K~~A~~I~~P~~D~~D~~L~~Y~~E~~A~~S~~A~~M~~D~~G~~A~~G~~P~~F~~Q~~N~~F~~F~~K~~I~~T~~L~~P~~L
 . * . * . * * * . * * . * * * * * . * * * * * . * * * * .

TM 7

CymF - Kleb.ox. VL~~H~~Q~~V~~A~~P~~S~~L~~V~~M~~T~~F~~A~~H~~N~~F~~N~~F~~N~~F~~G~~A~~I~~Y~~L~~L~~T~~E~~G~~G~~P~~I~~N~~P~~E~~Y~~R~~F~~-A~~G~~H~~T~~D~~I~~L~~I~~T~~W~~I
 MalC - Str.pn. IL~~A~~V~~A~~A~~P~~T~~L~~I~~S~~Q~~Y~~T~~F~~N~~F~~N~~F~~S~~I~~M~~Y~~L~~F~~N~~G~~G~~G~~P~~G~~S~~V~~G~~G~~G--A~~G~~S~~T~~D~~I~~L~~I~~S~~W~~I
 MalF - Ent.ae. LI~~K~~P~~L~~T~~P~~L~~M~~I~~A~~S~~F~~A~~F~~N~~F~~N~~F~~V~~L~~I~~Q~~L~~L~~T~~N~~G~~G~~P~~D~~R~~L~~G~~T~~T~~P~~A~~G~~Y~~T~~D~~L~~L~~V~~S~~Y~~T
 MalF - S.ty. LI~~K~~P~~L~~T~~P~~L~~M~~I~~A~~S~~F~~A~~F~~N~~F~~N~~F~~V~~L~~I~~Q~~L~~L~~T~~N~~G~~G~~P~~D~~R~~L~~G~~T~~T~~P~~A~~G~~Y~~T~~D~~L~~L~~V~~S~~Y~~T
 MalF - E.coli LI~~K~~P~~L~~T~~P~~L~~M~~I~~A~~S~~F~~A~~F~~N~~F~~N~~F~~V~~L~~I~~Q~~L~~L~~T~~N~~G~~G~~P~~D~~R~~L~~G~~T~~T~~P~~A~~G~~Y~~T~~D~~L~~L~~V~~N~~Y~~T
 . . . * . . . * * * * . * . * * * * * . * * * * .

TM 8

CymF - Kleb.ox. Y~~K~~L~~T~~L--D~~F~~-Q~~Y~~Q~~I~~A~~S~~V~~I~~S~~I~~I~~I~~F~~L~~F~~S~~I~~F~~A~~I~~W~~Q~~F~~R~~R~~M~~K-S~~F~~K~~E~~D~~V~~G~~M~~
 MalC - Str.pn. Y~~R~~L~~T~~T--G~~T~~S~~P~~Q~~Y~~S~~M~~A~~A~~A~~V~~T~~L~~I~~I~~S~~I~~I~~V~~I~~S~~I~~S~~M~~I~~A~~F~~K~~K~~L~~H~~-A~~F~~D~~M~~E-E~~V~~
 MalF - Ent.ae. Y~~R~~I~~A~~F~~E~~G~~G~~G~~Q~~D~~F~~G~~L~~A~~A~~A~~I~~A~~T~~L~~I~~F~~L~~L~~V~~G~~A~~L~~A~~I~~V~~N~~L~~K~~A~~T~~R~~M~~K~~F~~D~~-----
 MalF - S.ty. Y~~R~~I~~A~~F~~E~~G~~G~~G~~Q~~D~~F~~G~~L~~A~~A~~A~~I~~A~~T~~L~~I~~F~~L~~L~~V~~G~~A~~L~~A~~I~~V~~N~~L~~K~~A~~T~~R~~M~~K~~F~~D~~-----
 MalF - E.coli Y~~R~~I~~A~~F~~E~~G~~G~~G~~Q~~D~~F~~G~~L~~A~~A~~A~~I~~A~~T~~L~~I~~F~~L~~L~~V~~G~~A~~L~~A~~I~~V~~N~~L~~K~~A~~T~~R~~M~~K~~F~~D~~-----
 * * . . . * *

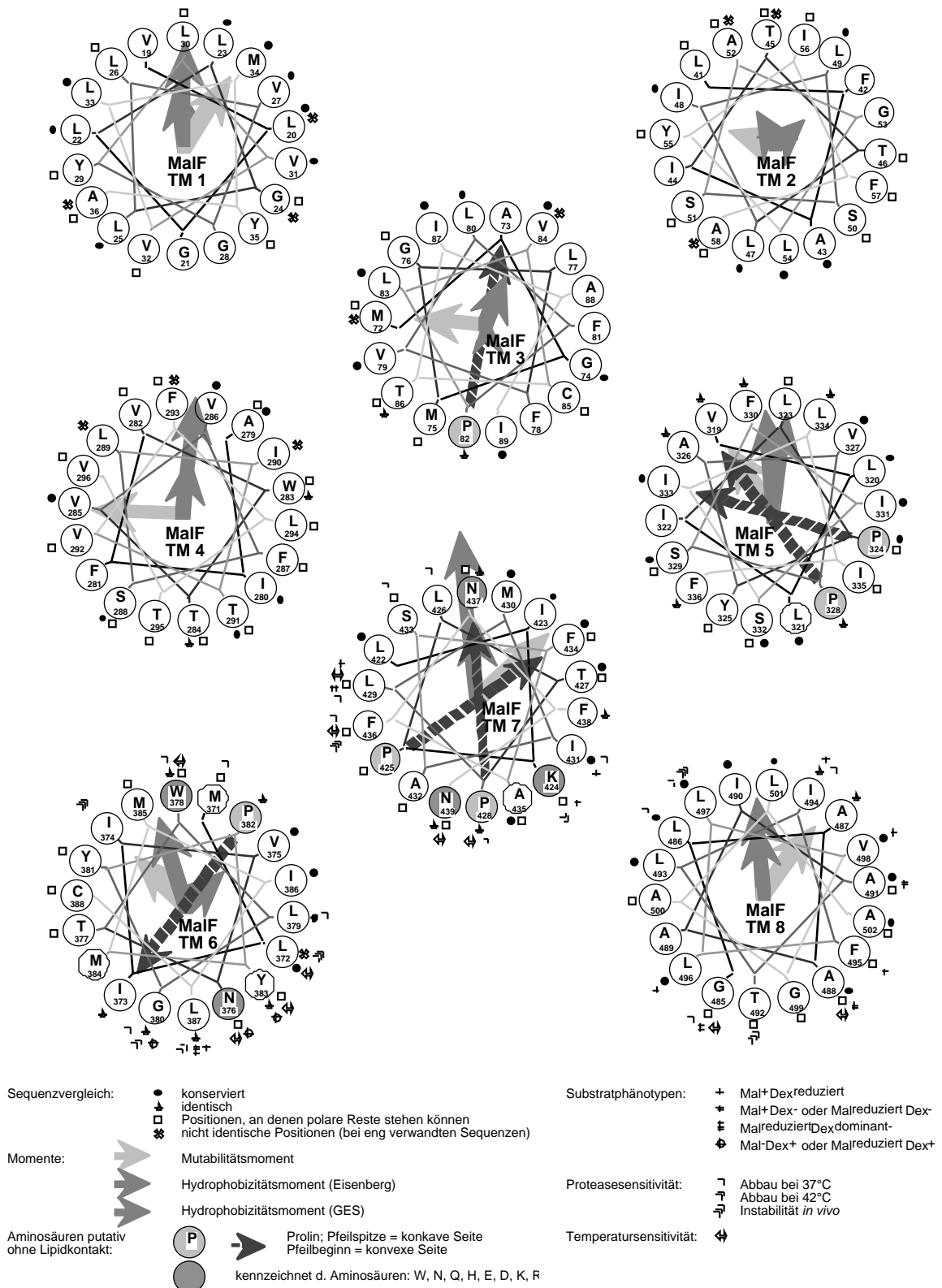


Abbildung 24. Charakteristika der „helical wheels“ der Transmembrandomänen von MalF.

Die Aminosäuresequenzen der 'helical wheels' stammen aus dem Sequenzvergleich der MalF-homologen Proteine (Abbildung 22) und beginnen jeweils mit der N-terminalen Aminosäure. Dargestellt sind die Ergebnisse der Kriterien (IV.3.4; 3.6; 3.7.1-3.7.4), nach denen die TM-Sequenzen untersucht wurden. Die Charakteristika der Helices sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die 'helical wheels' sind so angeordnet, daß ihre am stärksten hydrophobe Seite (entsprechend den Momenten) nach oben zeigt.

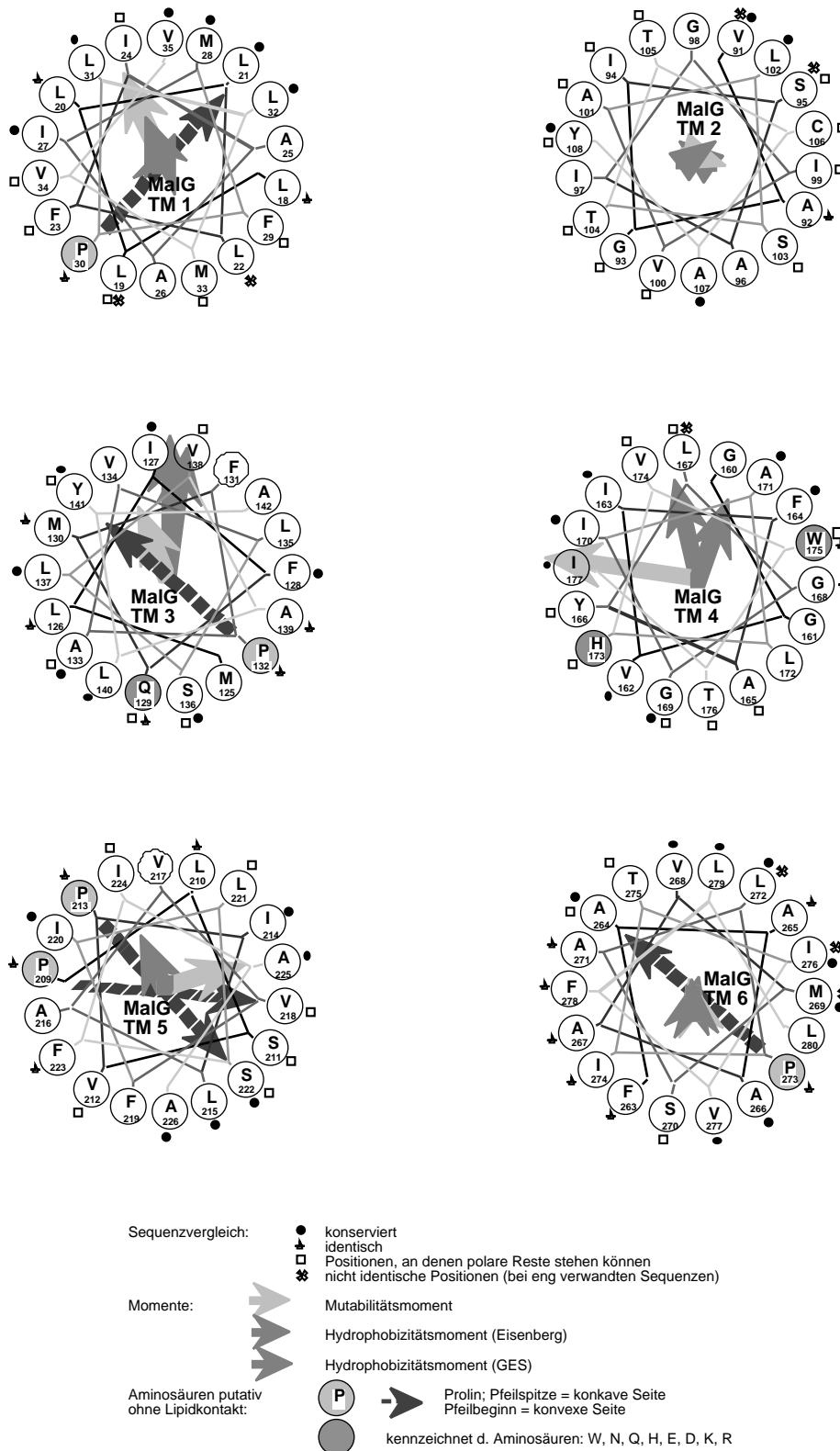


Abbildung 25. Charakteristika der „helical wheels“ der Transmembrandomänen von MaIG.

Die Aminosäuresequenzen der 'helical wheels' stammen aus dem Sequenzvergleich der MaIG-homologen Proteine (Abbildung 23) und beginnen jeweils mit der N-terminalen Aminosäure. Dargestellt sind die Ergebnisse der Kriterien (IV.3.4; 3.6), nach denen die TM-Sequenzen untersucht wurden. Die Charakteristika der Helices sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die 'helical wheels' sind so angeordnet, daß ihre am stärksten hydrophobe Seite (entsprechend den Momenten) nach oben zeigt.

Tabelle 14: Asymmetrisch verteilte Merkmale der Helices von MalF und MalG^a

MalF TM 1: Das Muster der Konservierung und der nicht ident. Reste ist uneinheitlich; die Helix kann bei fast gleichbleibender Funktionalität des Transporters deletiert werden. Helixseiten: polare Positionen ->•<- hydrophobe Seite
MalF TM 2: geringe Momente; wenig konservierte Reste. Helixseiten: konservierte Reste ->•<- hydrophobe Seite/nicht ident. Reste
MalF TM 3: hydrophobe Helix. Helixseiten: konservierte Reste/polare Positionen/konvexe Seite ->•<- hydrophobe Seite/nicht ident. Reste
MalF TM 4: polare Positionen rund um die Helix; ausgeprägte Momente; hydrophobe Helix. Helixseiten: konservierte Reste ->•<- hydrophobe Seite/nicht ident. Reste
MalF TM 5: konservierte Helix; hohe Momente. Helixseiten: polare Positionen/konvexe Seite ->•<- hydrophobe Seite
MalF TM 6: wenig hydrophobe Helix; ausgeprägte Momente; putativ kanalauskleidende Helix. Helixseiten: konservierte Reste/Mutanten veränderter Substratspezifität/T ^S -Mutanten/ proteasesensitive Mutanten ->•<- polare Positionen/hydrophobe Seite
MalF TM 7: schwach hydrophobe Helix; polare Positionen rund um die Helix; hohe Momente; putativ kanalauskleidende Helix. Helixseiten: konvexe Seite/Mutanten veränderter Substratspezifität/T ^S -Mutanten ->•<- hydrophobe Seite; teils überdeckend und seitlich davon konservierte Reste
MalF TM 8: hydrophobe Helix. Helixseiten: polare Positionen/Mutanten veränderter Substratspezifität, auf hydrophobe Seite übergehend ->•<- hydrophobe Seite/konservierte Reste
MalG TM 1: sehr hydrophobe Helix, geringe Momente. Helixseiten: konvexe Seite/nicht ident. Reste ->•<- hydrophobe Seite/konservierte Reste
MalG TM 2: wenig hydrophobe Helix; geringe Momente; wenig konservierte Reste. Helixseiten: polare Positionen (fast rund um die Helix) ->•<- nicht ident. Reste
MalG TM 3: hohe Momente; putativ kanalauskleidende Helix. Helixseiten: polare Positionen/konservierte Reste/konvexe Seite ->•<- hydrophobe Seite
MalG TM 4: hohe Momente; wenig hydrophobe Helix; putativ kanalauskleidende Helix. Helixseiten: polare Positionen ->•<- hydrophobe Seite/nicht ident. Rest
MalG TM 5: geringe Momente; niedrigste Hydrophobizität im Durchschnitt der MalG-homologen Proteine, daher putativ kanalauskleidende Helix. Helixseiten: konvexe Seite mit stärkerer Konservierung ->•<- konkave Seite mit mehr polaren Positionen
MalG TM 6: hydrophobe Helix; geringe Momente. Helixseiten: stark konservierte Seite ->•<- nicht ident. Reste

^a Die Helices werden unter Berücksichtigung der Mittleren Hydrophobizität (Tabelle 15) kurz charakterisiert. Grundlage der Charakterisierung sind die Abbildungen 24 und 25. Aufgeführt sind unterscheidbare Seiten der Helices aufgrund der beschriebenen Kriterien die sich gegenüber liegen oder seitlich aneinander grenzen. Zusammen aufgeführte Merkmale, durch ein "/" getrennt, liegen auf der selben Seite und sind "geclustert". "Helixseiten": Gegenüberliegende oder deutlich abgegrenzte Helixseiten mit ihren Merkmalen sind durch das Zeichen "->•<-" getrennt. Die hydrophobe Seite ist nicht zwangsläufig die Membranseite; das kann beispielsweise bei einer stark eingeschlossenen Helix der Fall sein, die keinen Kontakt zur Membran hat.

Tabelle 15: Mittlere Hydrophobizität und Mutabilität der 18-Reste-Helices^a

Transmembran- domäne (TM)	Mittlere Hydrophobizität (Eisenberg)		Mittlere Hydrophobizität (GES)		Mittlere Mutabilität (Jones <i>et al.</i>)
MalF	MalF	Ø ^b (MalF/ CymF/ MalC)	MalF	Ø ^b (MalF/ CymF/ MalC)	MalF
TM 1	0,38	0,37	2,03	1,87	88,8
TM 2	0,31	0,32	2,03	1,70	93,5
TM 3	0,36	0,40	2,34	2,43	97,4
TM 4	0,38	0,30	2,42	2,05	113,5
TM 5	0,39	0,37	2,11	2,14	95,1
TM 6	0,27	0,29	1,68	1,76	92,1
TM 7	0,15	0,12	0,85	0,73	81,8
TM 8	0,38	0,36	2,18	2,16	93,2
MalG	MalG	Ø (MalG/ CymG/ MalD)	MalG	Ø (MalG/ CymG/ MalD)	MalG
TM 1	0,47	0,41	2,68	2,15	95,3
TM 2	0,24	0,26	1,70	1,76	106,3
TM 3	0,30	0,30	1,89	1,97	93,8
TM 4	0,33	0,31	1,69	1,81	88,1
TM 5	0,37	0,25	2,14	1,41	100,9
TM 6	0,35	0,39	2,23	2,31	101,4

^a Für jede TM von MalF und MalG, reduziert auf die zentralen 18 Aminosäuren, wurde die mittlere Hydrophobizität nach zwei verschiedenen Skalen (Eisenberg und GES) und die mittlere Mutabilität (Jones *et al.*) berechnet.

^b Die Durchschnittswerte (Ø) beziehen sich auf die jeweilige Helix und wurden aus den Mittelwerten der TMs von MalF, CymF, MalC beziehungsweise MalG, CymG und MalD errechnet.

Tabelle 16: Hydrophobizitätsmomente und Mutabilitätsmomente der 18-Reste-Helices^a

Transmembran- domäne (TM)	Hydrophobizitäts- moment (Eisenberg)	Hydrophobizitäts- moment (GES)	Mutabilitäts- moment (Jones <i>et al.</i>)
MalF: TM 1	1,33	8,68	170,8
TM 2	0,82	3,08	99,7
TM 3	1,08	0,93	143,5
TM 4	2,05	6,51	188,9
TM 5	2,05	8,72	159,4
TM 6	1,06	7,64	146,2
TM 7	1,64	13,81	199,4
TM 8	1,96	5,9	176,2
MalG: TM 1	0,91	2,73	177,2
TM 2	0,40	2,17	55,4
TM 3	2,56	9,51	138,4
TM 4	1,88	7,94	279,0
TM 5	1,06	0,54	149,0
TM 6	0,31	1,35	27,6

^a Für jede TM von MalF und MalG, reduziert auf die zentralen 18 Aminosäuren, wurden Hydrophobizitätsmomente nach zwei verschiedenen Skalen (Eisenberg und GES) und Mutabilitätsmomente (Jones *et al.*) berechnet.

3.10 Identifizierung homologer Charakteristika der Helices von MalF und MalG

Ein interessanter Befund dieser Arbeit ist, daß fast jede MalF-Helix eine charakteristisch entsprechende Helix in MalG besitzt. Ausgenommen sind die ersten zwei TMs von MalF, zu denen man die geringste Homologie findet, und das Paar TM 4 (MalF) - TM 2 (MalG). Im folgenden sollen die Homologien der vergleichbaren Helices stichwortartig beschrieben werden.

TM 3 (MalF) - TM 1 (MalG): Es liegt eine hohe Hydrophobizität der Helices vor. Die Momente nach Eisenberg sind recht ähnlich und insgesamt auch nicht so hoch, als daß diese Helices eine sehr kanalexponierte Seite besitzen dürften.

TM 4 (MalF) - TM 2 (MalG): diese beiden Helices sind das unähnlichste Paar. TM 4 von MalF könnte recht lang sein. TM 2 von MalG besitzt die niedrigste Konservierung aller untersuchter Helices.

TM 5 (MalF) - TM 3 (MalG): Beide Helices weisen eine recht hohe und sehr ähnliche Amphiphilizität auf, die sie als Kandidaten für eine ausgeprägte Schnittstelle zwischen Kanallumen und Membranseite ausweist. Prolin könnte bei beiden Helices eine ähnliche Struktur bewirken. Die zwei Helices weisen Positionen auf, die, entsprechend mutiert, alleine oder paarweise mit einer anderen Mutation zu einem MBP-unabhängigen Transporter führen.

TM 6 (MalF) - TM 4 (MalG): Beide Helices besitzen eine nahezu identische, relativ niedrige Hydrophobizität und sehr ähnlich hohe Momente, so daß sie für eine stärker kanalexponierte Position in Frage kommen. Beide Helices besitzen Positionen (TM 4 von MalG am äußersten N-Terminus), die, entsprechend verändert, mit einer anderen Mutation zusammen zu einem MBP-unabhängigen Transporter führen.

TM 6 (MalF) weist Positionen auf, die putativ für den Transport der Substrate Maltose und Maltoheptaose verantwortlich sind (siehe Abbildung 4). Diese vier Positionen liegen im Helixplot direkt nebeneinander. In TM 4 (MalG) findet sich ein sehr ähnliches "Motiv", entlang der Helixinnenseite (Abbildung 26) umgekehrt angeordnet. Alle vier Positionen liegen nebeneinander im Helixplot:

MalF: Y₃₈₃-N₃₇₆-L₃₈₇-G₃₈₀ (im Uhrzeigersinn am "helical wheel")

MalG: Y₁₆₆-H₁₇₃-V₁₆₂-G₁₆₉ (gegen den Uhrzeigersinn am "helical wheel")

Werden diese Aminosäurepositionen in der Reihenfolge vom Periplasma aus an den "helical wheels" entlang zum Cytoplasma aufgezeichnet, ergibt sich die folgende Anordnung:

		N ₃₇₆ - G ₃₈₀ - Y ₃₈₃ - L ₃₈₇	(MalF, TM 6)	
Periplasma	->	->	->	->
	(H ₁₅₉ -)	V ₁₆₂ - Y ₁₆₆ - G ₁₆₉ - H ₁₇₃	(MalG, TM 4)	Cytoplasma

(siehe auch unter V.3.2).

Es ist denkbar, daß diese strukturelle Anordnung beider Helices bei einer Substratbindestelle oder einer Art "Substratrutschbahn" durch den Transporter beteiligt ist.

TM 7 (MalF) - TM 5 (MalG): In beiden Helices sind zwei Positionen, die direkt übereinanderliegen, mit Prolin besetzt. Das könnte eine gleichartige Architektur der Helices zur Folge haben. Auffällig ist eine ähnliche Abfolge von Aminosäuren, die zwar im "helical wheel" nebeneinander liegen, aber im Alignment nicht untereinander zu liegen kommen. Der cytoplasmatische Loop N-terminal vor den beiden Helices enthält die EAA-X₃-G-X₉-I-X-LP Consensus Sequenz der bindeproteinabhängigen Transportsysteme, die direkt an die Helix heranreicht.

TM 8 (MalF) - TM 6 (MalG): beide Helices sind sehr hydrophob, die Momente sind nicht so groß in TM 8 bzw. sehr gering in TM 6, diese besitzt "dafür" im Zentrum der Helix ein Prolin (welches möglicherweise an der Helixausrichtung mitwirkt). Eine stark konservierte Seite ist bei beiden Helices

auffällig. Der den Helices vorausgehende periplasmatische Loop ist der jeweils am stärksten konservierte periplasmatische Loop im Protein überhaupt.

3.11 Herleitung von Aufeinanderfolge und genereller Anordnung der Helices im MalF/MalG-Komplex

Nach dem Kriterium der Looplänge (siehe IV.3.5) liegen Transmembrandomänen, wenn der Loop zwischen ihnen nicht mehr als ca. dreizehn Aminosäuren lang ist, vermutlich nebeneinander. Mit Hilfe dieses Kriteriums kann jedoch nur die Zahl der Möglichkeiten in der Aufeinanderfolge von Helices im Proteinkomplex eingeschränkt werden. Aussagen über die genauere 3D-Anordnung von benachbarten Helices kann dieses Kriterium nicht liefern. Beispielsweise kann mit ihm nicht bestimmt werden, ob drei aufeinanderfolgende Helices genau hintereinander in einer Reihe liegen oder in welcher Form sie räumlich aneinander gepackt sind und wie umfangreich die Kontaktbereiche sind.

Nach dem Kriterium der Looplänge folgen in MalF nur die TMs 1, 2 und 3 entsprechend ihrer Reihenfolge in der Primärsequenz aufeinander und die TM 4 und TM 5 sind benachbart (Tabelle 17). In MalG ist danach nur das Aufeinanderfolgen der TMs 2, 3 und 4 festgelegt.

Es wird hier angenommen, daß MalF und MalG auch zueinander homologe Proteine sind. Hinweise dafür sind die paarweise charakteristische Entsprechung ihrer Helices und die direkte Homologie von MalF und MalG².

Es wird deshalb weiter angenommen, daß die homologen TMs von MalF und MalG homologe Funktionen im Transportkomplex besitzen und entsprechend gleichartige Positionen einnehmen. Damit würden auch die homologen TMs die gleichen homologen Nachbarn besitzen. Das bedeutet folglich, daß die TMs 1, 2, 3, 4, 5 in MalF und die TMs 1, 2, 3, 4 in MalG im Proteinkomplex aufeinanderfolgen, so wie dies in der Primärsequenz der Fall ist.

Nach dem Kriterium der Suppressordaten werden die TMs 6, 7 und 8 in MalF räumlich nahe zueinander positioniert.

Die homologe Entsprechung in MalG wäre demnach die, daß auch hier die letzten drei C-terminalen TMs 4, 5 und 6 räumlich nahe beieinander liegen.

² Wird die Sequenz von MalF (mit einer Deletion von 140 Aminosäuren der großen periplasmatischen Domäne) direkt mit MalG aligned, ergibt sich eine Identität von 19,6%. Werden der MalF-Sequenz zusätzlich zur großen periplasmatischen Domäne die Transmembrandomänen 1 und 2 deletiert und die resultierende Sequenz gegen MalG aligned, sind die Proteine zu 21,95% identisch, wobei die oben beschriebenen, sich charakteristisch entprechenden Helices einander zugeordnet werden. Diese Identität von ca. 22% ist fast gleich groß wie die von MalF mit MalC (22,5%).

Tabelle 17: Loopplängen in MalF und MalG; minimale Loopplängen^a

	N- Term. cyto.	Loop TM 1-2 peri.	Loop TM 2-3 cyto.	Loop TM 3-4 peri.	Loop TM 4-5 cyto.	Loop TM 5-6 peri.	Loop TM 6-7 cyto.	Loop TM 7-8 peri.	C- Term. cyto.
MalF	16	3	10	186	12	33	24	42	10
MalF-Homologe (einschl. MalF) maximal	31	28	41	186	20	41	26	42	12
MalF-Homologe (einschl. MalF) minimal^b	16	3	10	30	12	29	24	41	10
MalG	17	53	12	15	27	35	-	-	15
MalG-Homologe (einschl. MalG) maximal	17	53	21	15	39	35	-	-	15
MalG-Homologe (einschl. MalG) minimal^b	14	36	9	2	27	25	-	-	13

^a Diese Tabelle zeigt die Anzahl der Aminosäuren der hydrophilen Loops von MalF und MalG. Maximale und minimale Loopplängen, die bei den MalF-Homologen (MalF, CymF, MalC) bzw. MalG-Homologen (MalG, CymG, MalD) vorhanden sind, können mit den Loopplängen von MalF bzw. MalG verglichen werden.

^b Für die Modellbildung ist die minimale Looplänge entscheidend.

3.12 Die Erstellung des Arbeitsmodells

Grundlage für die Modellbildung (siehe Abbildung 26) war die Herleitung der Aufeinanderfolge der Helices wie in IV.3.11 beschrieben. Eine mögliche räumliche Anordnung der letzten drei C-terminalen Helices von MalF (TM 6, 7, 8) wurde aus den Daten der Suppressormutationen (Ulrich, 1996; Ehrle *et al.*, 1996) abgeleitet und die "helical wheels" adäquat aneinandergelagt. Hier zeigte sich, daß die aktuelle Interpretation der Daten der Suppressormutationen ein entgegengesetzt orientiertes Gesamtmodell nicht zuläßt: TM 6 (MalF) kann bei beibehaltener Position von TM 8 (MalF) nicht mit TM 7 (MalF) vertauscht werden. Die Spiegelachse für ein entgegengesetzt orientiertes Modell würde hierbei durch TM 8 (MalF) und TM 6 (MalG) verlaufen.

Die homologen Helices TM 4, 5, 6 von MalG wurden analog zueinander, entsprechend TM 6, 7, 8 von MalF, angeordnet. Sie wurden den drei MalF-Helices "gegenübergestellt", da angenommen wurde, daß diese sechs Helices bei der Kanalbildung während des Transportvorgangs beteiligt sind. Grundlage für die Gegenüberstellung war nicht nur die strukturelle Homologie der Helices (Tabelle 14), sondern auch eine Deletionsmutante am N-Terminus von TM 6 von MalG, die sich bis in den vorhergehenden periplasmatischen Loop erstreckt und einen Mal^{+/}-Dex⁻-Phänotyp hervorruft (Dassa, 1993). Dieser Phänotyp entspricht den in TM 8 von MalF am häufigsten isolierten Punktmutanten (diese Arbeit). Dies ist ein Hinweis dafür, daß im MalF/MalG-Komplex strukturell homologe Helices auch funktionell homolog sind. Nahe an den putativen Kanalbereich gerückt wurde als nächstes TM 5 von MalF und die ihr homologe TM 3 von MalG. Ausschlaggebend für diese Positionierung war außer der Looplänge und der Beteiligung an MBP-unabhängigen Transportern die Existenz einer Substratdoppelmutante (Mal⁺Dex⁻) in TM 5 von MalF (Ehrmann, pers. Mitteilung).

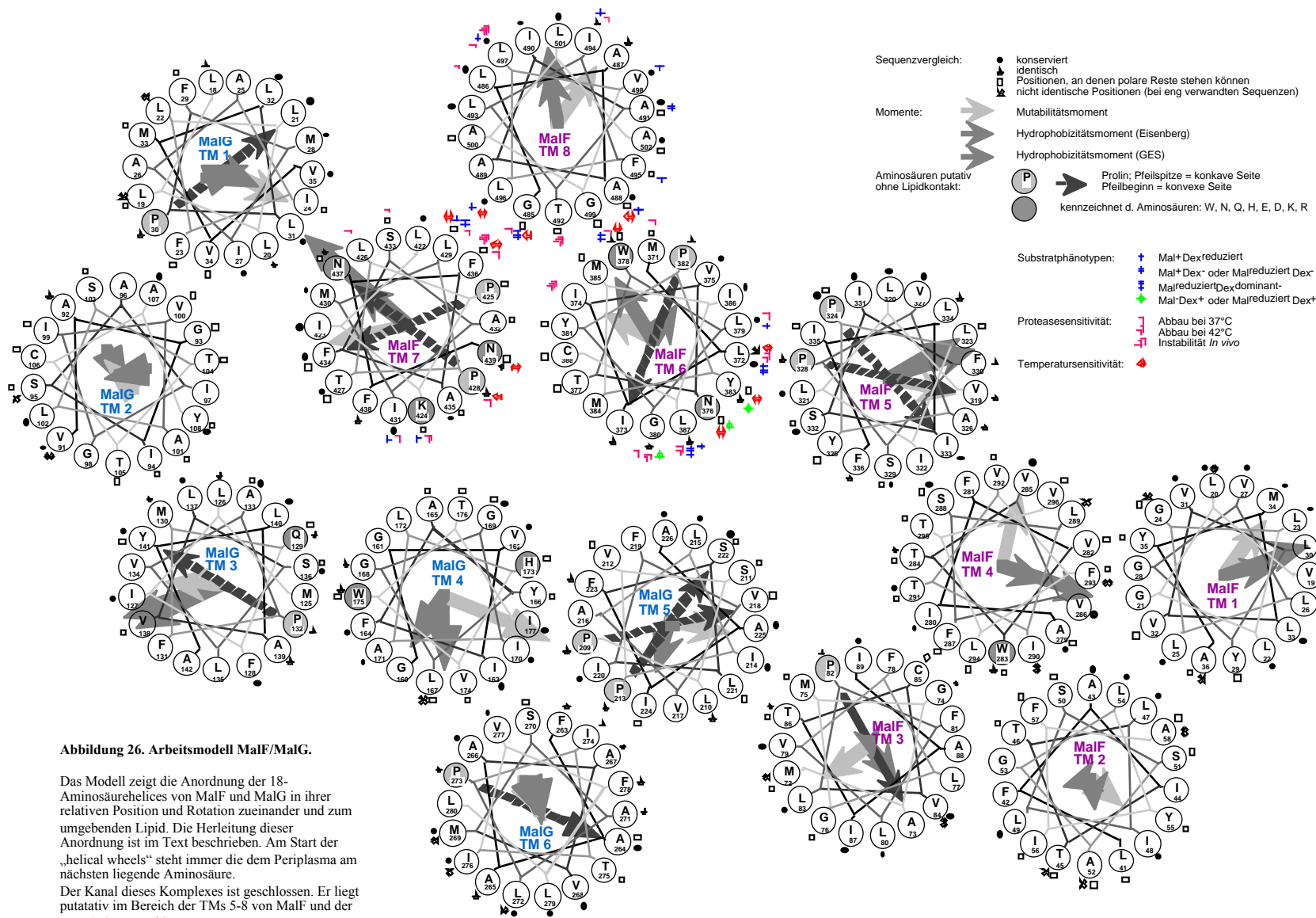


Abbildung 26. Arbeitsmodell MalF/MalG.

Das Modell zeigt die Anordnung der 18-Aminosäurehelices von MalF und MalG in ihrer relativen Position und Rotation zueinander und zum umgebenden Lipid. Die Herleitung dieser Anordnung ist im Text beschrieben. Am Start der „helical wheels“ steht immer die dem Periplasma am nächsten liegende Aminosäure.

Der Kanal dieses Komplexes ist geschlossen. Er liegt putativ im Bereich der TMs 5-8 von MalF und der TMs 3-6 von MalG.

Weiter wurden gleichzeitig alle bereits oben beschriebenen Kriterien zur Anordnung der Helices berücksichtigt (Hydrophobizität, Momente, Aminosäuren der Klasse 2, Konservierung, Positionen, an denen polare Reste stehen können, nicht identische Positionen, konvexe/konkave Helixseite, diverse Substratmutanten). Bei der Anordnung der Helices wurde die bestmögliche Beachtung aller Kriterien angestrebt. Die Kriterien der Hydrophobizität, der Momente und der Klasse 2-Aminosäuren wurden bei der Modellbildung immer zuerst berücksichtigt und erfüllt. Danach erfolgte die "Feinabstimmung" der Positionierung über die restlichen Kriterien.

3.13 Die Form des Arbeitsmodells

Das Arbeitsmodell zeigt den MalF/MalG-Komplex im geschlossenen Zustand. Es wurde vorausgesetzt, daß die geschlossene Konformation dem energieärmsten Zustand entspricht. Das bedeutet für die Rotationsorientierung der Helices das Ausrichten der hydrophoberen Seite gegen die Membran und der weniger hydrophoben Seite gegen das Proteininnere, ohne daß dabei ein wäßriger, starrer Kanal entsteht. Das kurzzeitige Öffnen zur Substratübernahme von MBP löst vermutlich größere Verschiebungen unter den Helices aus, die mit diesem Modell nicht dargestellt sind. Möglichkeiten der Kanalbildung werden unter V.1.3.2 und V.3.2 diskutiert.

Die Kontaktfläche/Spalt zwischen MalF und MalG im Modell ist S-förmig gestaltet. Die Ursache dafür ist TM 7 von MalF, die als weitgehend von anderen TMs eingeschlossene Helix eingestuft wurde. Dieses Eingeschlossen-Sein konnte entsprechend der hergeleiteten Aufeinanderfolge der Helices (siehe IV.3.11) nicht ausschließlich durch andere MalF-Helices geschehen.

Vorstellbar ist, daß die Position von TM 1 von MalF rings um TM 2 von MalF liegen kann. Außer der Option der Bildung eines Vier-Helix-Bündels der TMs 1-4 von MalF wurde kein weiteres Kriterium für die Position von TM 1 befolgt.

3.14 Die 180°-Rotationssymmetrie

Ein Ergebnis des modellierten Komplexes ist seine Rotationssymmetrie von 180°, wenn man von den TMs 1 und 2 von MalF absieht. Das bedeutet, daß die "helical wheels" 3 bis 8 von MalF, wenn ihre Positionen um eine imaginäre Achse senkrecht zur Membranoberfläche um 180° versetzt werden, auf die sechs Positionen ihrer jeweils homologen MalG-Helices plaziert werden. Eine 180°-Rotationssymmetrie wird auch für das generelle Modell der Uniporter-, Symporter- und Antiporter-Proteinfamilie angenommen (Goswitz & Brooker, 1995). Die meisten experimentellen Daten stammen dabei von Arbeiten über die Lactose-Permease (LacY). Interessanterweise zeigt das Photosynthese-Reaktionszentrum mit seinen beiden sehr homologen L- und M-Untereinheiten genau diese 180°-Rotationssymmetrie.

V. Diskussion

Um den Mechanismus des Maltosetransports besser verstehen zu können, ist es notwendig, die Topologie, Struktur und die Anordnung der membrangebundenen Komponenten des Transporters MalFGK₂ zu kennen, ebenso wie die Positionen und Eigenschaften von funktionell bedeutenden Aminosäureresten.

Über den hydrophoben Transmembranbereich des Transporters, bestehend aus den acht Transmembrandomänen (TMs) von MalF und den sechs Transmembrandomänen von MalG, ist hingegen nicht sehr viel bekannt. Von H. Shuman und Mitarbeiter wurden Mutationen entdeckt und charakterisiert, die MBP-unabhängige Maltosetransporter erzeugen (Covitz *et al.*, 1994; Treptow & Shuman, 1985). Ihnen ist gemeinsam, daß Paare von Punktmutanten (mit der Ausnahme einer einzelnen Punktmutante) in den TMs 5-8 von MalF und den TMs 3 und 4 von MalG einen synthetischen Phänotyp auslösen, der zu einer konstitutiven ATPase-Aktivität und zu einem im Vergleich zum Wildtyp niedriger affinen Maltosetransport ohne Bindeprotein führt.

Die Bedeutung des hydrophoben C-Terminus (TM 4-6) von MalG für die Transportfunktion wurde durch eine Linker-Insertionsmutagenese aufgezeigt. Am N-terminalen Ende von TM 6 führte eine Insertion zu einer Mutante mit einem Mal⁺Dex⁻-Phänotyp (Dassa, 1993).

Diese experimentellen Befunde ließen vermuten, daß der hydrophobe Innenbereich des Maltosetransporters funktionell bestimmende Regionen enthält. Weitere solche Regionen und Aminosäurereste in einem quantitativ angelegten Ansatz aufzuspüren und zu charakterisieren, war ein Hauptgegenstand dieser Arbeit. Der Schwerpunkt wurde dabei auf den C-Terminus des integralen Cytoplasmamembranproteins MalF gelegt (siehe auch unter II.4.)

In den TMs 6 und 8 wurde über eine spezifische Oligomutagenese nach Aminosäuresubstitutionen gesucht, die den Maltosetransport beeinträchtigen.

Die Suche wurde dadurch systematisch durchgeführt, daß für die spezifische Mutagenese der TMs degenerierte Primer verwendet wurden. Potentiell konnten damit fast alle möglichen Aminosäuresubstitutionen für jede Position in den TMs stattfinden. Das bedeutete - im Rahmen der phänotypischen Erkennung mit dem verwendeten Plattentest - eine quantitative Identifizierung der Substitutionen, die zumindest eine erkennbare leichte Reduktion des Substrattransportes zur Folge hatten.

Durch die Sequenzierung der spezifisch mutierten Domänen konnte das Ausmaß der jeweiligen Veränderungen der DNA mit resultierenden Aminosäuresubstitutionen bestimmt werden.

Die Charakterisierung und Untersuchung der eingetretenen Veränderungen bei den isolierten Mutanten wurde durch verschiedene experimentelle Ansätze vorgenommen:

1. Die Wachstumsphänotypen aller Mutanten auf MacConkey-Maltose Agarplatten sowie auf Minimalplatten mit Maltose oder Maltodextrin (Maltoheptaose) oder Maltose plus Maltodextrin als jeweils einzige Kohlenstoffquellen wurden festgestellt.
2. Der spezifische Maltosetransport wurde gemessen.
3. Konformationsveränderungen an MalF bzw. MalFGK₂ durch veränderte Sensitivität gegenüber extern applizierten Proteasen wurde aufgezeigt.

4. Eine veränderte Membraninsertion von Mutanten der Transmembrandomäne 6 in MalF-AP-Fusionsproteinen wurde festgestellt.

Außerdem konnten im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Kerstin Uhland Mutanten des Fusionsproteins MalF-AP J identifiziert werden, die - im Gegensatz zu den Mutanten der Transmembrandomäne 6, die in MalF-AP-Fusionen untersucht wurden - eine Veränderung der Topologie des Fusionsproteins auslösen, mit der Folge, daß der C-Terminus (Alkalische Phosphatase) nicht mehr transloziert wird.

Schließlich wurden Kriterien ausgearbeitet und zusammengestellt, mit denen ein Arbeitsmodell des MalF/MalG-Komplexes entwickelt werden konnte. Dieses Modell schafft für die isolierten Mutanten der TMs 6-8 einen Bezugsrahmen, der die vorliegenden Phänotypen zu erklären hilft. Es wird eine plausible, einfache Anordnung aller TMs von MalF und MalG vorgeschlagen, die mit den bis jetzt bekannten Daten zur Funktion des Maltosetransporters übereinstimmt. Die Anordnung bestimmt die relative Position eines Helixzentrums zu dem der anderen Helices. Dabei wird die Rotationsorientierung von charakterisierten Helixseiten in Bezug zu anderen Helices und zum Lipid berücksichtigt.

1. Mutationen der Transmembrandomänen 6 und 8 von MalF

1.1 Die Suche nach Mutanten mit reduziertem Maltosetransport

Mit dem verwendeten Plattentest zur Identifizierung von Maltosetransport-Mutanten konnten nicht alle denkbar möglichen Kategorien von Mutationen, die eine Veränderung des Substrattransportes bewirken, erfaßt werden.

Mutationen, die zu einer Reduktion der Affinität des Transportsystems gegenüber Maltose führen, also zu höheren K_{mT} -Werten bei gleichbleibender maximaler Transportgeschwindigkeit V_{max} , konnten wegen der eingesetzten systemsättigenden Maltosekonzentration von 1% (25-30 mM) in den MacConkey-Maltose-Platten nicht erkannt werden. In der Tat zeigten alle überprüften K_{mT} -Werte der isolierten Mutanten den K_{mT} -Wert des Wildtyps oder bis maximal um das 10-fache erhöhte Werte, was vernachlässigbar gering ist. Bei LamB-Defekten beispielsweise sind die K_{mT} -Werte des Transportsystems für Maltose um das ca. 500-fache (Szmelcman *et al.*, 1976) und bei MBP-unabhängigen Mutanten um das ca. 2000-fache erhöht (Covitz *et al.*, 1994).

Dagegen war bei allen Mutanten die V_{max} reduziert. Bei einem gerade noch meßbaren spezifischen Transport ist die Transportgeschwindigkeit um das ca. 60-fache reduziert.

Mutationen, die zu einem MBP-unabhängigen Transport führen, konnten mit dem verwendeten *E. coli*-Stamm DHB32 (MBP⁺) nicht erfaßt werden. Nur eine Punktmutante in MalG (*malG510*) ist in der Lage, eine MBP-Unabhängigkeit auszulösen. Solche Mutationen in MalF sind noch nicht isoliert worden, und es ist nicht ausgeschlossen, daß es sie gibt.

Es wurde nicht nach Mutanten gesucht, die einen reduzierten Dextrintransport (mit beispielsweise Maltoheptaose in MacConkey-Platten) aufweisen. Es wurden nur Maltose reduziert transportierende Mutanten auf ihren Dextrintransport überprüft. Es ist aber ein Mal⁺Dex⁻-Phänotyp denkbar, bei welchem der Maltosetransport sich nicht vom Wildtyp unterscheiden läßt. Diese Mutanten sind auf MacConkey-Maltose-Platten kaum zu identifizieren. Die in dieser Arbeit identifizierten Mutanten der Kategorie IV (Mal⁻Dex⁺ mit den Abstufungen Mal⁺Dex^{+/-} und Mal^{+/-}Dex⁻) zeigen einen Maltosetransport von 7-95% der wildtypischen Transportrate.

In den TMs 6 und 8 wurden insgesamt 63 Mutationen isoliert, inklusive der unabhängig voneinander mehrfach isolierten Mutanten. Davon weisen nur 2 Mutanten einen Maltosetransport von über 90% der des Wildtyps auf und nur 5 Mutanten einen Transport von über 70%. Dies zeigt, daß die visuelle Suche nach Mutanten mit einer Transportreduktion mit dem verwendeten Plattentest vorwiegend Mutanten mit schwerwiegenden funktionellen Defekten identifizieren läßt. Vor allem bei TM 6, bei der die meisten Punktmutanten zusammen an einer Seite liegen, wäre es interessant zu wissen, ob an den anderen Helixseiten vorwiegend quasi "stille" Substitutionen auftreten würden. Solche konnten mit der angewendeten Suchmethode ebenfalls nicht erfaßt werden, wurden aber auch nicht gesucht.

1.2 Phänotypen und Eigenschaften der isolierten MalF-Mutanten

Nach der Isolation der Mutanten ist und bleibt es das Hauptproblem, zu verstehen, was durch die Aminosäuresubstitution eigentlich im Protein passiert. Die Eigenschaften der substituierten Reste zu kennen, trägt nur bedingt zum Verstehen bei. Da die genaue molekulare Umgebung und ihre Rolle in der Konstruktion des Transporters und ihr Beitrag zum Transportgeschehen völlig unbekannt ist, kann über die tatsächliche Auswirkung einer Substitution letztlich nur indirekt durch Schlußfolgerungen aus der Untersuchung von Phänotypen spekuliert werden. Mehrfachsubstitutionen komplizieren die Interpretation durch die mögliche Erzeugung synthetischer Phänotypen zusätzlich. Wegen dieser Schwierigkeit wurden bei der Interpretation der Untersuchungsergebnisse nicht alle Mehrfachmutanten auf ihre Proteasesensitivität (nur Mehrfachmutanten von TM 6) und überhaupt keine Mehrfachmutanten bei der Hydrophobizitätsanalyse berücksichtigt.

1.2.1 Mutanten mit veränderter Substraterkennung: Verschiedene Kategorien von Substratphänotypen

Mutanten der Kategorie I (Mal^+Dex^+) wurden in dieser Arbeit nicht gefunden, nach ihnen wurde nicht gesucht. Sie konnten mit dem verwendeten Suchansatz nicht identifiziert werden (siehe oben).

Von 12 Mutanten mit wildtypischen Wachstum auf MMA-Maltose (1d1d2d bei 28°, 37° und 42°C) zeigen nur drei (*malF62281*, *malF846*, *malF834*) einen wildtypähnlichen spezifischen Maltosetransport von 87% bzw. 95% des Wildtyps (WT). Ihr MacConkey-Maltose-Phänotyp ist aber verschieden von dem des WT. Die restlichen 9 Mutanten besitzen Transportwerte, die zwischen 22% und 78% des WT liegen. Wenn die Transportwerte und Wachstumsdaten der übrigen Mutanten hierzu in Relation gesetzt werden, zeigt sich hier dennoch eine relativ gute Übereinstimmung.

Erstaunlicherweise konnten nur drei Mutanten der Kategorie II ($\text{Mal}^{\text{reduziert}}\text{Dex}^{\text{reduziert}}$, quantitativ vergleichbare Reduktion des Wachstums auf Maltose sowie auf Dextrin) isoliert werden. Alle übrigen Mutanten, wenn sie nicht Null-Mutanten waren, hatten entweder einen vergleichsweise schwächeren Dex-Phänotyp im Vergleich zum Mal-Phänotyp oder umgekehrt. Ein möglicher Grund dafür ist das schlecht quantifizierbare Wachstum auf den Minimalplatten, das ungenaue, schwankende Daten liefert. Ein anderer Grund sind unterschiedliche molekulare Bedingungen für den Transport von Maltose im Gegensatz zu langkettigen Dextrinen (Maltoheptaose). Punkt- und Mehrfachmutationen würden diese "Bedingungen", vermutlich bestimmte "örtliche" Konformationen, selektiv und räumlich begrenzt verändern können. Für den

letztgenannten Grund sprechen Mutanten, die unzweideutig einen klaren Mal⁺Dex⁻ (*malF8033*, *malF8337*) oder Mal⁻Dex⁺ (*malF64*, *malF641*, *malF615*, *malF652*) Phänotyp besitzen.

Für einen differenzierteren, quantitativeren Vergleich zwischen Mal- und Dex-Phänotypen würde sich zusätzlich die Bestimmung der Teilungsraten in MMA-Flüssigmedium bei allen Mutanten anbieten.

Der Phänotyp der Kategorie IV (Mal⁺Dex⁻) wurde schon früher entdeckt. Er wurde bei MBP-unabhängigen Mutanten (Treptow & Shuman, 1985), d.h. in den TMs 5, 6, 7 und 8 von MalF; in TM 3 (*malG510*), TM 3 und N-Terminus von TM 4 (*malG511*) von MalG und bei einer Insertionsmutante am N-Terminus von TM 6 von MalG (Dassa, 1993) beschrieben. In MalF zeigen alle Punkt- und Mehrfachmutanten der TM 8, wenn sie nicht Mal⁻Dex⁻ oder instabil *in vivo* sind, diesen Phänotyp in verschiedenen Ausprägungen. In TM 6 kommt dieser Phänotyp nur bei 5 von allen 21 Mutanten vor. Auch von zwei Punktmutanten der TM 7 ist eine leichte Ausprägung dieses Phänotyps bekannt (Pick, 1995) und außerdem zeigt ihn eine Doppelmutante in TM 5 von MalF (M. Ehrmann, persönliche Mitteilung). Der Mal⁺Dex⁻-Phänotyp kommt demnach, soweit bis jetzt bekannt, weit verstreut in allen TMs von MalF und MalG vor, an denen Punkt-, Doppel-, Dreifach- oder Insertionsmutationen Substratphänotypen erzeugen. Eng eingrenzbar Regionen in MalF, deren Änderung diesen Phänotyp hervorruft, scheint es nicht zu geben, da MBP-unabhängige Mutanten und vielleicht auch ein Teil der Mehrfachmutanten von TM 8 und 6 einen synthetischen Phänotyp zeigen.

Ein in dieser Arbeit neu entdeckter Phänotyp ist der der Kategorie IV (Mal⁻Dex⁺). Er kommt nur an drei Positionen von TM 6 vor und betrifft in verschiedenen Ausprägungen die Allele *malF64*, *malF641*, *malF652*, *malF615*, *malF620* und *malF666*. Ein spezifischer Maltosetransport ist nur meßbar bei *malF652* mit 22% des wildtypischen Transports. Bei diesen Mutanten wäre es wichtig, einen spezifischen Dextrintransport messen zu können; nach unseren Informationen war aber Radioisotop-markiertes Dextrin zu dieser Zeit nicht erhältlich. Die Frage, ob es sich hier um eine Substraterkennungsstelle handeln könnte, wird weiter unten diskutiert (V.1.4).

Ein weiterer in dieser Arbeit neu entdeckter Phänotyp ist der Dextrin dominant negative Phänotyp (Dex^{dom-}). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Maltose und Dextrin dominiert das Nichtwachstum mit Dextrin über ein Wachstum mit Maltose, das bei diesen Bedingungen eigentlich hätte stattfinden können (*malF616*, *malF89*).

Bei vier Mutanten verschlechtert sich das Wachstum wenn beide Kohlenstoffquellen gleichzeitig vorliegen, im Vergleich zum Wachstum lediglich auf Maltose (*malF831*, *malF8337*, *malF826*, *malF66*).

Der Dextrin dominant negative Phänotyp ist somit kein "Alles-oder-Nichts-Phänomen", sondern kommt graduell abgestuft vor, wie der Mal⁻Dex⁺- und der Mal⁺Dex⁻-Phänotyp.

Die beiden vollständig Dex^{dom-}- Phänotypen sind gekoppelt mit einer Temperatursensitivität (T^S). Von den anderen vier Mutanten zeigt die mit dem schlechtesten Wachstum/Transport auf Maltose gleichfalls einen T^S-Phänotyp. Diese Art der Mutation ruft möglicherweise mit zunehmenden Defekten im Maltosetransport konditionale Konformationsänderungen (bzgl. Temperatur) hervor.

Der Dex^{dom-}-Phänotyp könnte zum einen dadurch erklärt werden, daß Maltoheptaose unspezifisch den Transportkanal blockiert. Die Mutationen lösen möglicherweise Konformationsänderungen aus, die zu einem zu engen oder zu unflexiblen Kanal führen, so daß Maltoheptaose verzögert oder überhaupt nicht mehr ins Cytoplasma freigesetzt wird. Zum anderen könnte Maltoheptaose den Kanal spezifisch blockieren. Es ist denkbar, daß Konformationsveränderungen eine sehr feste Bindung an die putative natürliche oder eine neu

geschaffene Bindestelle erlauben. Eine neu entstandene oder "verbesserte" natürliche, hochaffine Bindestelle durch nur eine (oder zwei) Punktmutation ist aber nicht sehr wahrscheinlich.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß wildtypisches MBP seine verschiedenen Substrate mit unterschiedlicher Affinität bindet, daß nämlich Dextrine bevorzugt vor Maltose gebunden werden. Maltoheptaose ist unter den nicht-zyklischen Dextrinen dabei der beste Inhibitor der Maltosebindung am gereinigten MBP (71% gebundene Maltoheptaose gegenüber 29% gebundener Maltose bei gleichzeitigem Vorliegen beider Zucker) (Kellermann & Szmelcman, 1974). Es ist also vielleicht nicht ganz auszuschließen, daß ein mutierter MalF/MalG-Komplex in einer Art Analogie Maltoheptaose mit einer höheren Affinität als normal bindet. In solch einer Mutante könnte der Transport sowohl spezifisch als auch unspezifisch blockiert werden.

Um die Abhängigkeit des Phänotyps $\text{Dex}^{\text{dom-}}$ von langkettigen Dextrinen zu überprüfen, wäre es ein einfacher Test, das Wachstum zusätzlich beispielsweise auf Maltotriose und Maltopentaose festzustellen. Dieser Test wäre auch für alle Dex^- oder $\text{Dex}^{\text{reduziert-}}$ -Mutanten angebracht, da dadurch vielleicht zwischen den Mutanten weiter differenziert werden könnte, nämlich zwischen solchen, die kürzere Dextrine noch wildtypisch oder wenigstens besser transportieren können als Maltoheptaose und solchen, deren Defekte bedeutender sind und die daher keine Dextrine mehr transportieren.

Die Existenz der Substratphänotypen $\text{Mal}^- \text{Dex}^+$, $\text{Mal}^+ \text{Dex}^-$ und $\text{Dex}^{\text{dom-}}$ legt nahe, daß der Transport von Maltose und Maltoheptaose voneinander unterscheidbare Vorgänge in dem Sinne sind, daß wenigstens partiell unterschiedliche räumlich-strukturelle "Gegebenheiten" für den Transport unterschiedlich großer Substrate durch die Transmembrankomponenten vorhanden sind, die zumindest zum Teil unabhängig voneinander inaktiviert werden können. Die Cytoplasmamembrankomponenten zeigen hier ein Charakteristikum, das sie mit dem MBP gemeinsam haben, da auch beim MBP eine Reihe von unterschiedlichen $\text{Mal}^+ \text{Dex}^{\text{reduziert-}}$ -Mutanten isoliert wurden (Duplay *et al.*, 1987; Spurlino *et al.*, 1991).

1.2.2 Temperatursensitive Mutationen in MalF

Die Temperatursensitivität (T^S) wurde bei Wachstum auf Maltose oder Dextrin als einzige Kohlenstoffquellen beobachtet (bei 42°C zeigt sich eine deutliche Reduktion des Wachstums gegenüber dem bei 28° oder 42°C von wenigstens 2 Tagen). Dieser konditionale Phänotyp zeigt sich bei Punktmutationen entweder nur mit Maltose oder nur mit Dextrin. Bei T^S -Phänotypen mit Maltose ist das Wachstum mit Dextrin aber oft nicht mehr gegeben. Vermutlich beeinträchtigt die Konformationsänderung der T^S -Mutation im Falle der $\text{Mal}^+ \text{Dex}^-$ -Mutanten den Dextrintransport viel stärker als den Maltosetransport, der erst bei 42°C stärker betroffen ist.

Möglicherweise beeinträchtigen die Konformationsänderungen spezifisch die Substraterkennung, vielleicht direkt an einer "Erkennungsposition" (denkbar ist *malF652*) oder indirekt, etwa durch Knicken der Helix durch eine Prolin-Substitution, so daß dadurch eine an der anderen Helixseite liegende Position in ihrer Funktion betroffen wird (denkbar ist *malF811*, interessanterweise nicht Proteinase K-sensitiv). Alternativ zur Beeinträchtigung der Substraterkennung kann auch allgemein die Art der Öffnung oder Flexibilität des Kanals verändert sein.

Zwischen spezifischen und unspezifischen Auswirkungen der Temperatursensitivität kann hier nicht klar unterschieden werden. In jedem Fall treten wenigstens bei 9 von 13 T^S -Phänotypen beobachtbare größere Konformationsdefekte auf (unbekannt bei *malF8330* und *malF89*), die variieren können zwischen Instabilität

in vivo und starker und leichter Proteinase K-Sensitivität. Diese Fälle sprechen eher für unspezifische Strukturveränderungen.

1.2.3 Proteinase K-Sensitivität

Um mögliche Veränderungen der Konformation von MalF-Mutanten aufzeigen zu können, wurden Proteasetests mit Sphäroplasten und extern applizierter Protease durchgeführt. Mutanten der TM 7 erwiesen sich als nicht sensitiv für Trypsin oder Chymotrypsin (Pick, 1995), was darauf hinweist, daß diese MalF-Derivate sich mit MalG und MalK zu einem Komplex zusammenlagern, ihre Konformation ändern und dadurch nicht mehr gegen diese beiden Proteasen sensitiv sind (Traxler & Beckwith, 1992).

Um kleinere Konformationsunterschiede im Komplex aufzuspüren, wurden die Mutanten von TM 6 und TM 8 mit einer weniger spezifischen Protease, Proteinase K, untersucht.

Vergleichbar mit den Ergebnissen von Traxler zeigt in die Membran inseriertes Wildtyp-MalF ohne Coexpression von MalG oder MalK Proteinase K-Sensitivität. Die Mutanten von TM 6 und TM 8 zeigen mit dieser Protease je nach Mutation eine mehr oder weniger gesteigerte Sensitivität.

Die für Proteinase K erreichbaren Schnittstellen liegen vermutlich in den periplasmatischen Domänen 2, 3 und 4 von nicht komplexiertem MalF (Traxler & Beckwith, 1992). In den TMs 6 und 8 könnten folglich Konformationsänderungen ausgelöst werden, die bis in die periplasmatische Domänen reichen, wo die Protease ihre Schnittstellen erkennt.

Es ist aber unklar, wie man sich eine solche - vermutlich drastische - Konformationsänderung bei beispielsweise *malF860* (partielle Sensitivität bei 37° und 42°C) vorzustellen hat, bei der ein Isoleucin gegen ein Leucin (konservativer Austausch, vergleichbare Größe) in der putativen Membranmitte von TM 8 ausgetauscht wurde und wo ein Maltosetransport zu 39% stattfindet. Näher dem Periplasma liegende Mutationen mit Prolin-Substitutionen (putative Knicke in den Helices) haben dagegen weit weniger Proteinase K-Sensitivität und einen spezifischen Transport von 7% (*malF842*) bzw. überhaupt keinen mehr (*malF816*).

Mit zunehmender Proteasekonzentration über 100 µg/ml wird der wildtypische Transportkomplex gegenüber Proteinase K sensitiv. Davon könnte auch MalG betroffen sein. Ab 1000 µg/ml wird sogar MalK Proteinase K-sensitiv, wobei MalF bei dieser Konzentration vielleicht gar nicht mehr vorhanden ist (Schneider *et al.*, 1995).

Mit dieser Art der Proteasesensitivität kann keine Aussage über den Ort, die Beschaffenheit und den Charakter einer vorliegenden Konformationsänderung getroffen werden. Die Zugänglichkeit der Membranproteine für Proteinase K kann nicht definiert werden und die möglichen Schnittstellen in MalF (und MalG) sind kaum aufzeigbar. Daher muß die Proteinase K-Sensitivität der Mutanten von TM 6 und TM 8 vorsichtig bewertet werden.

Die Überprüfung der Phänotypkategorien auf Muster der Proteasesensitivität zeigt, daß es keine charakteristische Proteasesensitivität für einen bestimmten Phänotyp gibt. Funktionelle Defekte sind in jedem untersuchten Fall mit individueller Proteasesensitivität und Konformationsänderungen verknüpft.

Als ein allgemeines Ergebnis kann nur eine Tendenz festgestellt werden: Mutationen mit einer Instabilität *in vivo* sind sensitiver als Dex^{dom}-Mutanten mit T^S, diese wiederum sind sensitiver als alle übrigen Mutanten. Ausnahmen sind vorhanden. Die Punktmutationen in TM 6 sind tendenziell weniger sensitiv als Doppel-

und Dreifachmutanten. Die Sensitivität aller MalF-Derivate bei 42°C ist in der Regel etwas stärker als bei 37°C.

Der Proteinase K-Assay ist verwendbar für die Suche nach zwei "Gruppen" interessanter Mutanten, die es theoretisch geben könnte. Die erste Gruppe soll korrekt gefaltet, keine Konformationsänderungen und damit keine Proteasesensitivität zeigen, dafür aber schwere Beeinträchtigungen bei Transport und Wachstum besitzen. Für die zweite Gruppe werden eine ausgedehnte Proteasesensitivität und demnach große Konformationsänderungen gefordert, die aber möglichst keine Auswirkungen auf den Transport haben sollen. In den TMs 6 und 8 sind keine Mutationen isoliert worden, die die Kriterien der "Gruppen" 1 und 2 voll erfüllen. Betreffend die Gruppe 1 zeigen die in Frage kommenden Mutationen entweder eine zu große Proteasesensitivität oder Konformationsänderungen, die sich als Temperatur-sensitivität äußern. Mutanten, die der Gruppe 2 nahestehen, haben zu große Maltosetransportdefekte oder zu sehr vom Wildtyp abweichendes Wachstumsverhalten.

In dieser Arbeit isolierte Mutanten, die der Gruppe 1 am nächsten kommen, sind *malF641* (N₃₇₆H) und *malF66* (L₃₈₇H), beide mit geringster Proteinase K-Sensitivität bei 42°C, die aber nicht unerheblich ist.

Beide Mutanten zeigen einen Phänotyp (Mal⁻Dex⁺ bzw. Mal⁺Dex^{+/-} mit Dex^{dom+/-}), der die ursprünglichen Aminosäuren als Kandidaten für eine putative Substraterkennung durch MalF/MalG ausweist. Dies wird gestützt durch jeweils wenigstens eine weitere Substitution mit demselben Phänotyp an denselben Positionen und durch weitere Substitutionen mit einem Mal⁻Dex⁺-Phänotyp an dieser Helixseite (vergleiche Abbildung 4).

Von den Mutationen, die der Gruppe 2 nahestehen, können durch die Proteinase K-Assays nur *malF647* und *malF651* in TM 6 identifiziert werden. Die Mutante *malF647* ist stark sensitiv bei 42°C, dabei zeigt sie wildtypische Wachstumsraten auf Maltose und Dextrin. Die starke Instabilität *in vivo* von *malF651* mit zusätzlichem Abbau bei 42° und 37°C steht im Gegensatz zu ihrer relativ guten Transportrate (21% des WT). MalF-Protein in WT-Größe ist nur schwach erkennbar. Es hat den Anschein, als würde ein funktioneller Transportkomplex zusammengesetzt, der aber wieder zerfällt und durch zelluläre Proteasen abgebaut wird. Um dies zu überprüfen, müßte pulsmarkiertes MalF (wildtypischer Größe) aus Proben für Transporttests quantifiziert und in Relation zur Transportrate und zum WT gesetzt werden.

Die Mutante *malF651* könnte die Faltung oder die Endkonformation von MalF verändern, ohne daß dabei Regionen, die die Substratspezifität festlegen, betroffen sind. Dies könnte in reduziertem Ausmaß auch auf das Genprodukt von *malF647* zutreffen.

Daß diese beiden Substitutionen die Konformation von TM 6 beeinflussen wird dadurch bekräftigt, daß auf derselben Helixseite zwischen den beiden Positionen die Aminosäure W₃₇₈ liegt, an deren Stelle eine Suppressormutation zu einer Ausgangsmutation in TM 7 isoliert wurde (Ulrich, 1996; Ehrle *et al.*, 1996) und an der eine andere Substitution an der Entstehung eines MBP-unabhängigen Transporters beteiligt ist (Covitz *et al.*, 1994).

Der Proteinase K-Assay ist somit geeignet, einige der für die Transportfunktion und für die Konformation wichtigen Aminosäuren zusammen mit anderen Untersuchungen zu identifizieren bzw. ihre funktionelle Bedeutung zu unterstreichen.

1.3 Positionen von Substitutionen verschiedener Phänotypen in Helixdarstellungen von TM 6 und TM 8

1.3.1 Positionen von Substitutionen, die die Substratspezifität verändern

Zunächst werden die Positionen der Kategorien IV (Mal^+Dex^-) und V (Mal^-Dex^+) betrachtet und im Zusammenhang mit MBP-Unabhängigkeit diskutiert. Berücksichtigt werden dabei nur solche Mal^+Dex^- -Phänotypen in TM 6 und TM 8, die wenigstens einen deutlich meßbaren spezifischen Maltosetransport über dem Hintergrund von ca. 10% aufweisen.

Am "helical wheel" der TM 6 liegen alle Substitutionen mit dem Phänotyp der Kategorie V (Mal^-Dex^+), betreffend die wildtypischen Reste N₃₇₆, G₃₈₀, Y₃₈₃, eindeutig an einer Helixseite (Abbildung 4). In Abbildung 27 ist ihre Verteilung entlang der Helixlängsachse dargestellt. Es wird sichtbar, daß die Positionen direkt übereinander liegen, jeweils eine Helixwindung voneinander entfernt. Interessanterweise liegt eine Position, deren Mutation einen Mal^+Dex^- -Phänotyp hervorruft (L_{387H}), direkt darunter und "setzt die Reihe fort".

Ein beachtenswerter Befund ist die räumliche Nähe der Mutation W_{378C} (Bestandteil der MBP-unabhängigen Mutante *malF506* (Covitz *et al.*, 1994)) zu den Mal^-Dex^+ -Positionen (dieselbe "horizontale Ebene" auf der gegenüberliegenden Helixseite) (Abbildung 27). Es ist möglich, daß die räumliche Nähe dieser Mutation zu Positionen, deren Mutation die Substratspezifität verändern, notwendig ist für das Auslösen der Öffnung der putativen Substraterkennungsstelle.

Am "helical wheel" der TM 8 sind alle Substitutionen von Punktmutationen relativ gleichmäßig verteilt (Abbildung 5). Für den vorherrschenden Substratphänotyp Mal^+Dex^- scheint es keine eindeutige Präferenz für eine Helixseite zu geben, obwohl bei der Verteilung der Positionen entlang der Helixlängsachse ein Schwerpunkt zu erkennen ist (Abbildung 27). Ein Grund dafür wäre, daß zu wenig Mutanten dieses Phänotyps isoliert worden sind. Wie oben beschrieben, wurden keine Mutanten mit einem reduzierten Dextrintransport gezielt gesucht.

Überdies liegen die Mal^+Dex^- -Phänotypen gehäuft in einer ungefähren horizontalen Ebene direkt an und unterhalb der waagerechten Helixmitte. Die Punktmutationen bilden dabei eine komplette Helixwindung aus, die Doppelmutanten liegen immer mit einer ihrer Punktmutationen in dieser Windung (Abbildung 27).

Analog zu TM 6 liegen auch in TM 8 Mutationen, die an der Ausbildung von MBP-unabhängigen Mutanten beteiligt sind (A_{502V}, N_{505I}, N_{505S}; (Covitz *et al.*, 1994)), in einer relativen räumlichen Nähe (d.h. 1-2 Helixwindungen "tiefer") zu den Positionen der Mal^+Dex^- -Phänotypen. Vielleicht zeigt sich hier, wie schon bei TM 6, ein Prinzip, nämlich daß MBP-Unabhängigkeit auslösende Mutationen in räumlicher Nähe zu Positionen liegen, die die Substratspezifität nach Mutation verändern. Dafür spricht, daß die meisten MBP-unabhängigen Mutanten selbst einen Mal^+Dex^- -Phänotyp und die restlichen einen $\text{Mal}^+\text{Dex}^{\text{reduziert}}$ -Phänotyp besitzen (Shuman, 1982; Treptow & Shuman, 1988). Für die TMs 5 und 7 kann diese Möglichkeit nicht überprüft werden, da hier keine oder zu wenige entsprechende Mutanten vorliegen. Vielleicht gilt diese Korrelation aber auch nur für die TMs 6 und 8.

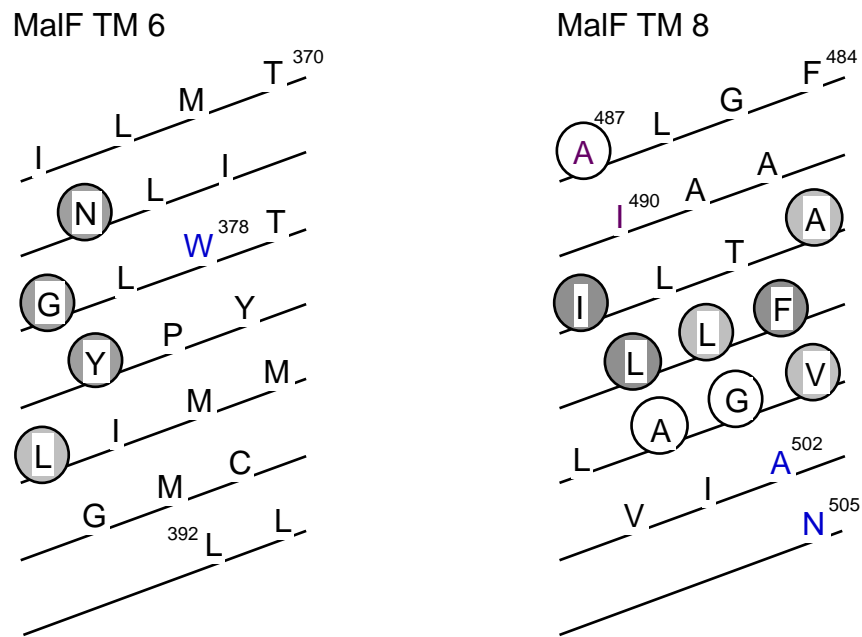


Abbildung 27. Positionen von Substitutionen in TM 6 und TM 8, die die Substratspezifität verändern und die an einer MBP-Unabhängigkeit beteiligt sind.

Eingekreiste Aminosäuren kennzeichnen die Positionen von Aminosäuresubstitutionen mit veränderter Substratspezifität. TM 6: Eingekreiste Aminosäuren mit "Punktmuster": Kategorie V (Mal^-Dex^+); mit "Linienmuster": Kategorie IV (Mal^+Dex^-).

TM 8: Eingekreiste Aminosäuren zeigen die Positionen von Mutanten der Kategorie IV (Mal^+Dex^-). Mit "Linienmuster": Punktmutanten; Ohne Muster: Doppelmutanten; "Karomuster": Punkt- und Doppelmutanten. Von den Positionen W₃₇₈, N₅₀₅ und A₅₀₂ sind Substitutionen bekannt, die an einer MBP-Unabhängigkeit beteiligt sind. An den Positionen W₃₇₈, A₄₈₇ und I₄₉₀ wurden Suppressoren zu Mutanten in TM 7 isoliert (Ulrich, 1996; Ehrle *et al.*, 1996).

In TM 8 liegen drei Bereiche eigentümlich "geschichtet" übereinander. Das sind Positionen von Suppressormutationen, Mal^+Dex^- -Phänotypen und Positionen, die MBP-Unabhängigkeit auslösen können (Abbildung 27). Erklärungen dafür sind eine Neigung und/oder eine Superspiralisierung mit einer benachbarten Helix der TM 8 im Transportkomplex.

1.3.2 Positionen von Substitutionen, die Temperatursensitivität und Instabilität *in vivo* verursachen.

In TM 6 wurden vier Punktmutationen isoliert, die Temperatursensitivität (T^S) oder Instabilität *in vivo* hervorrufen. Möglicherweise werden Konformationsänderungen hervorgerufen, die Interaktionen mit benachbarten Helices im Transporter beeinflussen. Um mögliche Interaktionsbereiche von TM 6 interpretativ festzulegen, wurden alle Punkt- und Mehrfachmutationen mit diesen beiden Phänotypen in ein "helical wheel" eingetragen, zusammen mit einer Suppressormutante (W₃₇₈C) (Ulrich, 1996; Ehrle *et al.*, 1996) und einer Punktmutation (W₃₇₈C) (Covitz *et al.*, 1994), die an der Entstehung eines MBP-unabhängigen Transporters beteiligt ist (Abbildung 28).

Es zeigt sich, daß alle Substitutionen in zwei diskreten Bereichen liegen, die als Helixseiten nahe zusammenkommen und sich teilweise gegenüberstehen. Die Mutationen, die eine Instabilität *in vivo* hervorrufen, liegen am Rand dieser Bereiche. Die Region, in der sich zwei der drei Positionen mit Mal⁻Dex⁺-Phänotypen befinden (Y₃₈₃, N₃₇₆, G₃₈₀), enthält nur T^S-Phänotypen, was damit übereinstimmt, daß hier möglicherweise funktionelle Defekte im Sinne von putativer Substraterkennung dominieren und weniger größere Konformationsdefekte.

Es wird hier vermutet, daß die beiden identifizierten Helixseiten (Abbildung 28) an jeweils benachbarte Helices grenzen. Die Suppressormutation an der Position W₃₇₈ läßt darauf schließen, daß diese Seite der TM 7 zugewendet liegt, wie dies in einem Modell der Positionen der Suppressormutanten vorgeschlagen worden ist (Ulrich, 1996; Ehrle *et al.*, 1996). Die gegenüberliegende Seite könnte zum Teil an die möglicherweise benachbarte TM 5 (siehe auch das Arbeitsmodell, Abbildung 26) grenzen.

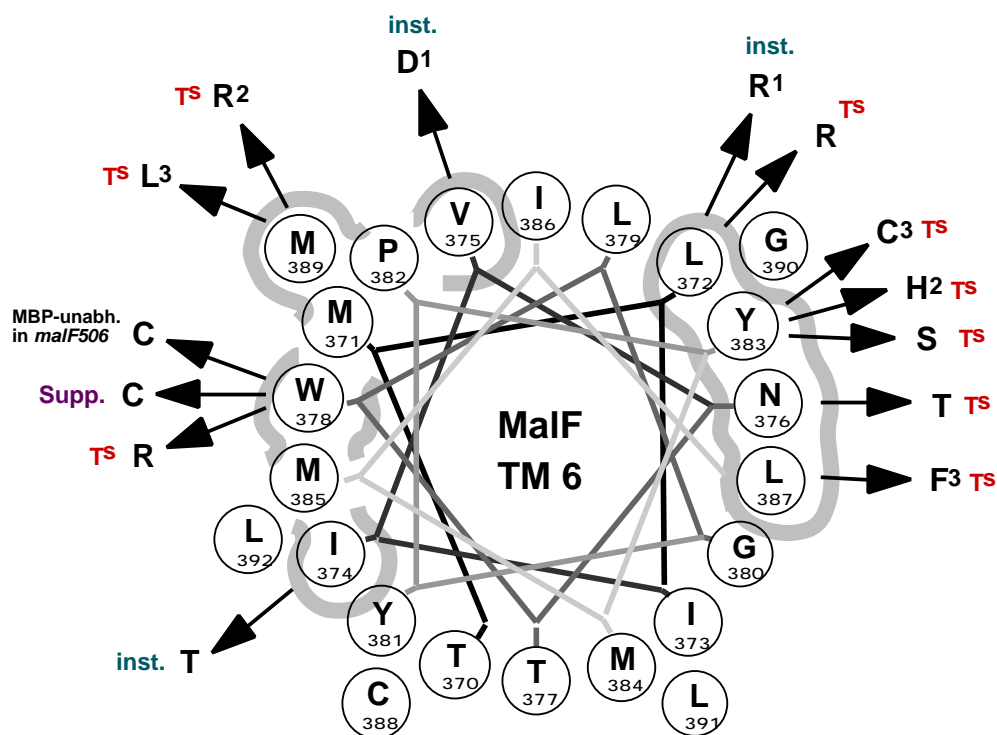


Abbildung 28. Substitutionen mit den Phänotypen Temperatursensitivität und Instabilität *in vivo* im "helical wheel" von TM 6.

Dargestellt sind alle Punkt- und Mehrfachmutanten in TM 6 mit Temperatursensitivität (Ts) und/oder einer Instabilität *in vivo* (inst.). Mehrfachmutanten sind mit der gleichen Zahl gekennzeichnet. Doppelmutanten: 1: *malF644*; 2: *malF626*. Dreifachmutante: 3: *malF624*. Zusätzlich ist eine Suppressormutation (Supp.) eingezeichnet, die die Mutation N₄₃₉T in TM 7 supprimiert und eine Punktmutante, die an der Entstehung eines MBP-unabhängigen Transportes beteiligt ist.

Alle durch Substitutionen betroffenen Helixpositionen sind grau eingerahmt, wodurch zwei ungefähre Helixhälften hervorgehoben sind, die fast aneinandergrenzen und sich teilweise gegenüberstehen.

An einer Helixseite wurden überhaupt keine Mutationen gefunden. Das betrifft die Aminosäuren C₃₈₈, T₃₇₀, T₃₇₇, M₃₈₄, L₃₉₁ und I₃₇₃. Die Bedeutung der grau eingerahmten Helixbereiche für die Konformation von TM 6 wird dadurch hervorgehoben.

Es zeichnet sich insgesamt ein Bild ab, in dem alle in TM 6 isolierten Mutationen vier diskreten, relativ gut abgrenzbaren Helixbereichen zuordenbar sind. Dazu gibt es einen weiteren, offenbar funktionell indifferenten Bereich (Abbildung 29). Die Bereiche sind offensichtlich entsprechend den Phänotypen der Mutanten für verschiedene Funktionen der TM 6 maßgeblich bestimmend.

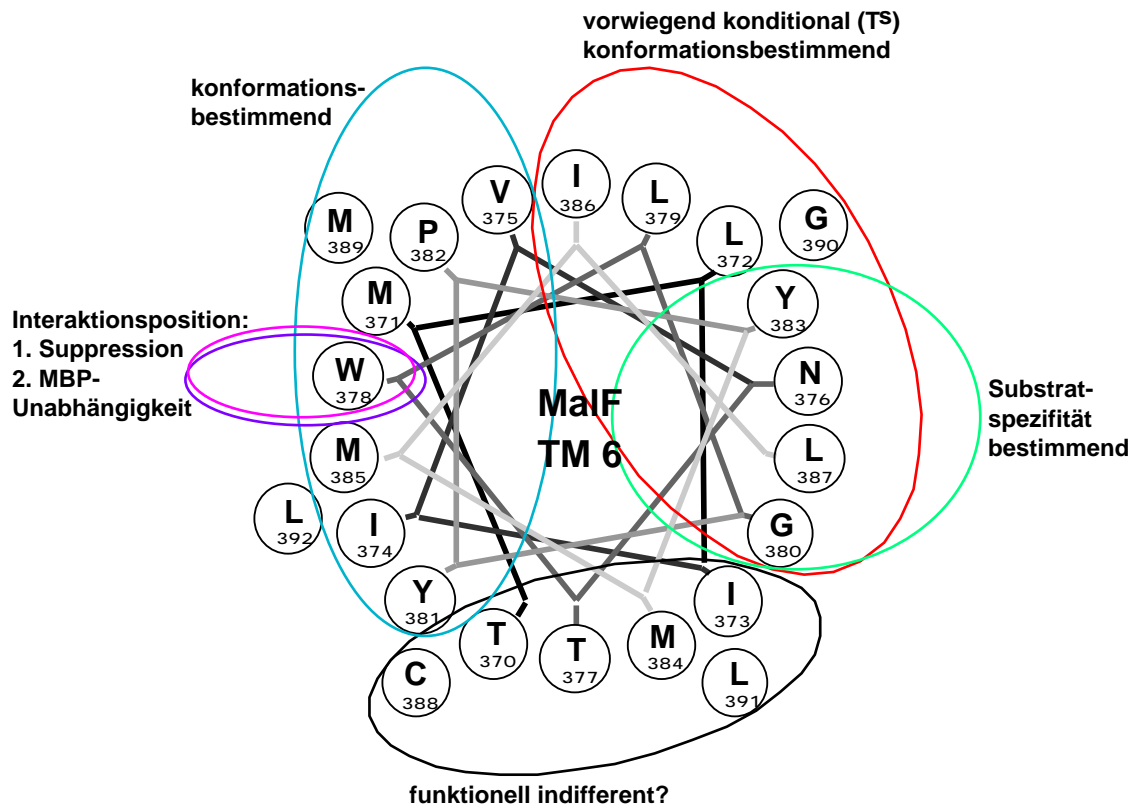


Abbildung 29. Funktionsbereiche der 6. Helix von MalF.

Die Positionen von verschiedenen Mutanten-Phänotypen sind zu Bereichen am "helical wheel" zusammengefasst und interpretiert. Eine Grundlage für diese schematische, zusammenfassende Darstellung sind die Abbildungen 4 und 28.

In TM 8 gibt es nur fünf Punktmutanten, die Konformationsänderungen mit den Phänotypen der Temperatursensitivität (T^S) und Instabilität *in vivo* verursachen (Abbildung 30). Vier davon liegen zusammen auf einer Seite der Helix, die fünfte liegt auf der gegenüberliegenden Seite. Wie bei TM 6 wurden zusätzlich alle Mehrfachmutanten mit den Phänotypen T^S und/oder einer Instabilität *in vivo* in eine zusammenfassende Betrachtung mit einbezogen und gemeinsam in ein "helical wheel" eingetragen (Abbildung 30). Substitutionen, die als Suppressoren gegen die Mutation P428E in TM 7 wirken (Ulrich, 1996; Ehrle *et al.*, 1996) und Substitutionen, die an der Erzeugung einer MBP-Unabhängigkeit beteiligt sind, werden hier ebenfalls gezeigt (Covitz *et al.*, 1994). Dadurch ergibt sich eine interessante Darstellung: Alle Substitutionen liegen in zwei symmetrischen Bereichen, die sich als Helixseiten gegenüber liegen. Phänotypen mit T^S und Instabilität *in vivo* sind dabei gleichmäßig auf beiden Seiten verteilt. Die Suppressoren liegen zusammen an einer einzigen Seite. Die beiden an einer MBP-Unabhängigkeit beteiligten Mutanten liegen nahe zusammen, aber in getrennten Bereichen. Wenn nun alle diese Phänotypen als Auswirkungen von Konformationsdefekten

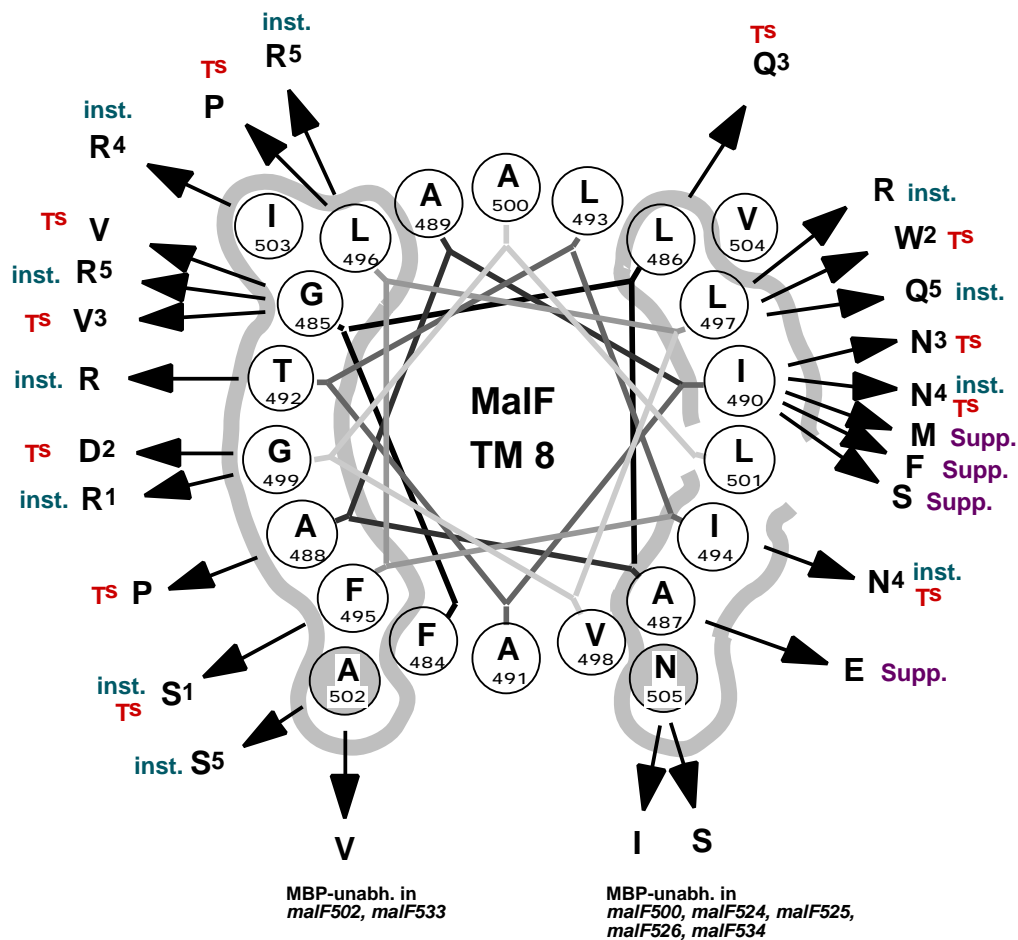


Abbildung 30. Substitutionen mit den Phänotypen Temperatursensitivität und Instabilität *in vivo* im "helical wheel" von TM 8.

Dargestellt sind alle Punkt- und Mehrfachmutanten in TM 8 mit Temperatursensitivität (Ts) und/oder einer Instabilität *in vivo* (inst.). Mehrfachmutanten sind mit der gleichen Zahl gekennzeichnet. Doppelmутanten: 1: *malF838*; 2: *malF8330*. Dreifachmutanten: 3: *malF89*; 4: *malF855*. Vierfachmutante: 5: *malF815*. Zusätzlich sind Suppressoren (Supp.) eingezeichnet, die die Mutation P428E in TM 7 supprimieren und Punktmutanten, die an der Entstehung MBP-unabhängigen Transportes beteiligt sind.

Alle durch Substitutionen betroffenen Helixpositionen sind grau eingerahmt, wodurch zwei Helixhälften hervorgehoben sind, die sich gegenüberstehen.

interpretiert werden, die die Interaktion zwischen den Helices beeinträchtigen und dabei die Funktion und Stabilität des Transporters stören bzw. im Falle der Suppressoren wiederherstellen bzw. MBP-unabhängig machen, können die beiden Seiten als "Interaktionsseiten" für TM 6 und TM 7 gesehen werden. Diese umfassen ca. zwei Drittel der äußeren Oberfläche der Helix und ihre ganze Länge.

Welche Seite wäre dabei gegen TM 6 und welche gegen TM 7 gerichtet?

Die Wirkung der Suppressoren in TM 8 zu P428E in TM 7 wurde für eine schematischen Repräsentation von TM 6, TM 7 und TM 8 als indirekt eingeschätzt (Ulrich, 1996; Ehrle *et al.*, 1996), so daß ihre Positionen der Helixseite gegenüberliegen, die mit TM 7 interagiert. Die linke Seite von TM 8 in Abbildung 30 ist folglich gegen TM 7 orientiert und die rechte Seite gegen TM 6. Im Arbeitsmodell

(Abbildung 26) ist die rechte Seite von TM 8 in Abbildung 30 als hydrophobe Helixseite gegen das Lipid gerichtet, die linke Seite grenzt in Übereinstimmung mit dem Suppressionsmodell an TM 7 und TM 6. Diese Position ist gedacht für die Ruhestellung des Transportkomplexes mit geschlossenem Kanal, bei der hydrophobe Helixseiten gegen das Lipid gerichtet sind. Für die Öffnung des Kanals wird hier postuliert, daß zumindest die TM 8 eine Rotation durch Drehmomente erfährt und dabei zwischen die TM 6 und TM 7 positioniert wird, die beide bei der Entstehung des Kanals von dem Komplexzentrum zurückweichen.

Eine Einteilung des "helical wheel" von TM 8 in verschiedene funktionell relevante Helixseiten (Abbildung 31) wie bei TM 6 (Abbildung 29) ist nicht so gut darstellbar, da die funktionellen Bereiche zusätzlich vertikal geschichtet in der Helix liegen (Abbildung 27) und einige Mal⁺Dex⁻-Phänotypen an verschiedenen Helixseiten vorkommen.

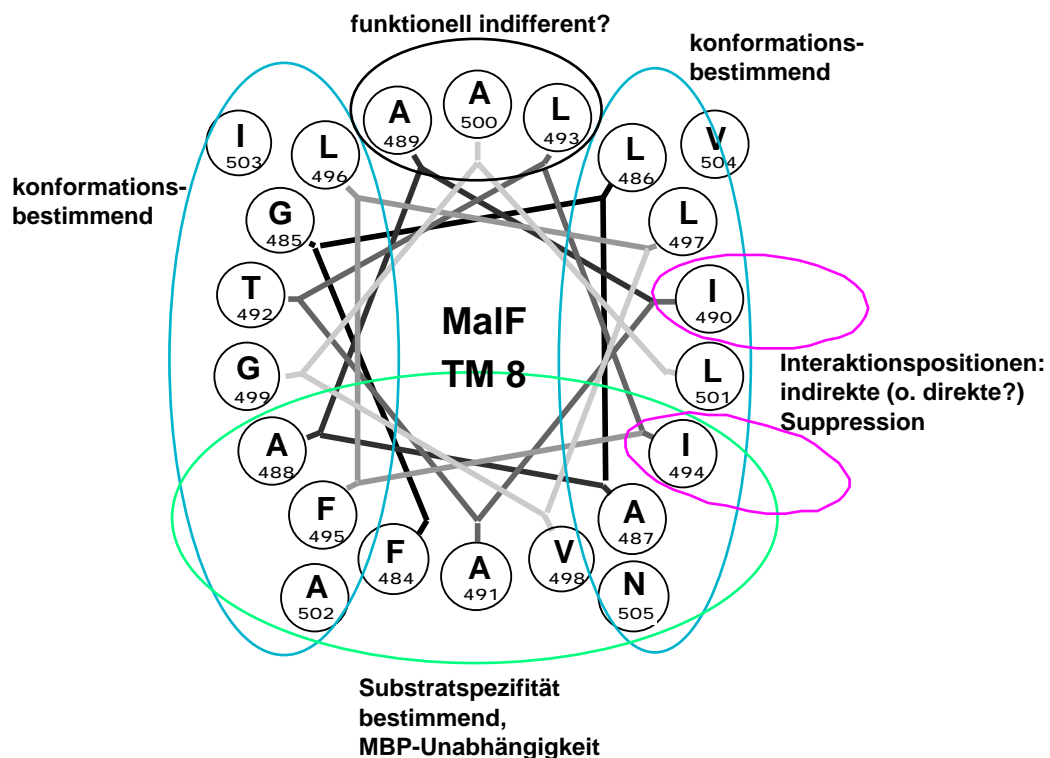


Abbildung 31. Funktionsbereiche der 8. Helix von MalF.

Die Positionen von verschiedenen Mutanten-Phänotypen sind zu Bereichen am "helical wheel" zusammengefaßt und interpretiert. Eine Grundlage für diese schematische, zusammenfassende Darstellung sind die Abbildungen 5 und 30.

Die die 'Substratspezifität bestimmende Region' enthält die meisten Punktmutanten mit Dex^{reduziert} und Mal^{reduziert}-Phänotypen, hier liegen die wenigsten Doppelmутanten (außer in der putativ indifferenten Region), außerdem zwei Positionen für die Erzeugung von MBP-Unabhängigkeit. An den Positionen 496 und 497, die außerhalb liegen, an welchen ebenfalls Dex^{reduziert}-Phänotypen auftreten, findet man zusätzlich stärkere Konformationsänderungen. Ein Punkt, der sehr für die funktionelle Bedeutung dieses Bereichs spricht, ist, daß das darin liegende "Motiv" AFAA (Aminosäuren A488, F495, A502, A491 in MalF) ebenfalls in der TM 6 von MalG vorkommt (Aminosäuren A267, F278, A271, A264 in MalG, TM 6) und dazu bei allen MalG-homologen Proteinen nahezu identisch ist (siehe auch Abbildung 26 und unter IV.3.14).

In der scheinbar funktionell indifferenten Region wurde keine Punktmutation isoliert, ebensowenig eine Mehrfachmutante mit T^S oder Instabilität *in vivo*.

Die stärker die Konformation beeinflussenden seitlichen Bereiche sind durch T^S und Instabilität *in vivo* bei Mehrfachmutationen ausgewiesen (Abbildung 30).

Interaktionsbereiche in vergleichbarer Größenordnung wurden auch beispielsweise für Helices des Tar-Rezeptors (Pakula & Simon, 1992) und der Leader Peptidase von *E. coli* (Whitley *et al.*, 1993) mit der Methode des "Disulfide Mappings" identifiziert und nachgewiesen. Diese Methode wäre geeignet, eine direkte Interaktion der TMs 6, 7 und 8 zu beweisen.

1.4 Existenz einer Substratbindestelle für Maltose und Maltodextrin in den Cytoplasmamembrankomponenten MalF/MalG?

Eine Substraterkennungsstelle wurde schon 1982 von H. Shuman postuliert, als nach UV-Bestrahlung eine MBP⁻-Mutante isoliert wurde, die in der Lage war, Maltose in Abwesenheit des Maltosebindeproteins zu transportieren (Shuman, 1982). Weitere Hinweise für eine Substratbindestelle für Maltose und Maltodextrin an den Proteinen MalF/MalG folgten durch die Isolierung mehrerer MBP-unabhängig transportierender MalF/MalG-Mutanten (Covitz *et al.*, 1994; Treptow & Shuman, 1985).

Die in TM 6 identifizierten Aminosäuren N₃₇₆, G₃₈₀, Y₃₈₃, deren Substitution zu einem Phänotyp der "Kategorie" Mal⁻Dex⁺ führt, könnten im Fall von Maltose für Substraterkennung, -Bindung und -Transport bedeutende Komponenten darstellen.

Es gibt mehrere Gründe und Beobachtungen, die dafür sprechen:

1. Die genannten Reste liegen an einer Helixseite.
2. Die betreffenden Reste liegen durch jeweils eine Helixwindung voneinander getrennt übereinander angeordnet, so daß eine "Transportlinie" senkrecht zur Membran entsteht.
3. Alle drei Positionen liegen annähernd im Zentrum der Helix und damit in dem Teil der Lipidschicht, der von dem wäßrigen Milieu am weitesten entfernt ist. Eine Erkennung/Bindung an dieser Stelle und damit "Promotion" des Transportes zur "Überbrückung" zwischen den wäßrigen Milieus erscheint plausibel.
4. Der Zentrale Bereich der TM 6 inklusive der drei Positionen ist der am stärksten hydrophile Bereich der Helix (Abbildung 10). Da Hydrophobizitätsmomente auf die gegenüberliegende Helixseite weisen, ist diese polare Helixseite vermutlich dem Proteinzentrum zugewandt. Wird eine stark hydrophobe Aminosäure in diesem hydrophileren Zentrum gegen eine stark hydrophile Aminosäure ausgetauscht (L₃₇₉Q), ist die Auswirkung nicht schwerwiegend. Die Mutation L₃₇₉Q ist tatsächlich die Mutante, die von allen in der TM 6 isolierten Mutanten dem Wildtyp phänotypisch am ähnlichsten ist. Dies ist ein Hinweis für die funktionelle Bedeutung des hydrophileren Zentrums von TM 6. Verschiedene Substitutionen an der Position N₃₇₆ erzeugen verschiedene Abstufungen der Transportauswirkung für Maltose (*malF641* u. *malF652*). Das Wachstum auf Dextrin ist dabei jeweils gleichbleibend wildtypisch.
5. Die Aminosäuren G₃₈₀ und Y₃₈₃ sind im Alignment der MalF-homologen Proteine identisch, die Aminosäure N₃₇₆ ist bei MalC durch Q und bei CymF durch S ersetzt (Abbildung 22).

Die Substraterkennung von Maltose könnte dabei nach einem Mechanismus geschehen, wie er für LamB beschrieben wurde. Sechs aromatische Reste bilden dabei eine Art Rutschbahn für das Substrat durch den

starrten Kanal des Porins hindurch (Schirmer *et al.*, 1995). Der aromatische Rest Y₃₈₃ (TM 6, MalF) in der ungefähren Mitte der Cytoplasmamembran könnte dabei analog zu LamB eine "Durchgangsstation" für Maltose sein, vielleicht zusammen mit anderen aromatischen Resten in der gleichen Höhe relativ zur Membran, z.B. mit Y₁₆₆ in TM 4 in MalG (siehe unter IV.3.14). Bei der Bindung von Maltose im MBP spielen die Aminosäuren Y und N ebenfalls eine Rolle: Ein Tyrosin ist mit einer Wasserstoffbrücke beteiligt, und ein weiteres Tyrosin und ein Asparagin an van der Waals-Kontakten (Spurlino *et al.*, 1991).

Es gibt einige Gründe, die für eine Beteiligung von TM 8 an einer Dextrinerkennung (Maltoheptaose) sprechen:

1. Die meisten Punktmutanten in TM 8 mit dem Mal⁺Dex⁻-Phänotyp liegen in einer eingrenzenden Region an einer Seite von TM 8 (Abbildung 27 u. 31).
2. Die meisten dieser Positionen liegen im Zentrum auf zwei Helixwindungen verteilt.
3. Die Kontaktstellen für Dextrin in TM 8 könnten im Vergleich zu den Kontaktstellen für Maltose in TM 6 etwas näher am Cytoplasma liegen. In etwa dieser Höhe liegt in TM 6 L₃₈₇, welches an der Dextrinerkennung beteiligt sein könnte (siehe Abbildung 27).
4. Alle bekannten Dex^{reduziert}-Phänotypen liegen in oder am Rande der TMs 5-6 in MalF oder der TMs 3-6 in MalG, die im Arbeitsmodell für die Bildung des Kanalbereichs postuliert werden (siehe unter IV.3.14).
5. Eine "Dextrinerkennung" involviert wahrscheinlich mehr Reste als eine "Maltoseerkennung" (sieben Glucoseeinheiten zu zwei), dies könnte den ausgedehnten Bereich in MalF/MalG erklären, in dem diese Mutationen zu finden sind.

Die Maltosebindestelle im MBP ist polar, d.h. das reduzierende Ende und das nicht reduzierende Ende der Zucker besitzen eigene Kontaktstellen (Spurlino *et al.*, 1991). Eine solche Polarität der Kontakte könnte es auch in MalF/MalG geben. Zumindest der Bereich TM 6 in MalF (auch TM 5?) könnte die ersten zwei Glucoseeinheiten mit dem nicht reduzierenden Glukoserest erkennen, während die TMs 7 und 8 Glucoseeinheiten am reduzierenden Ende der Dextrine erkennen (siehe auch Abbildung 26, Arbeitsmodell). Die Bindung des reduzierenden Endes von Maltose am MBP wird im Gegensatz zum nicht reduzierenden Ende durch unspezifische van der Waals-Kontakte bestimmt. Dies könnte auch für die Bindung durch MalF/MalG der Fall zutreffen. Das würde erklären, warum sich unter den Mal⁺Dex⁻-Mutanten in TM 8 etliche finden, die eine Konformationsänderung verursachen, die, auch über eine Entfernung hinweg, van der Waals-Kontakte reduziert.

Die Postulation einer Substratbindestelle durch H. Shuman wird nur indirekt durch die Daten dieser Arbeit gestützt. Bisher wurde die Spezifität der Substraterkennung von Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportern immer dem periplasmatischen Bindeprotein des jeweiligen Systems zugeschrieben (mit Ausnahme der Transporter für Vitamin B12 und Eisen-Chelat-Komplexe, deren spezifische Bindung bereits an einem hochaffinen Rezeptor der äußeren Membran stattfindet). Außerdem gibt es Beispiele für Membrantransportkomponenten, die jeweils zwei unterschiedliche spezifische Bindeproteine erkennen und deren verschiedene Substrate transportieren (beispielsweise HisM/HisQ mit den spezifischen Bindeproteinen für Histidin (HisJ) bzw. für Lysin, Arginin, Ornithin (ArgT) (Higgins & Ames, 1981)). Sie zeigen, daß der Substrattransport durch die Cytoplasmamembran möglicherweise weniger substratspezifisch determiniert ist, als die Bindung durch das Bindeprotein.

So ist die Spezifität der Maltoseerkennung oder Dextrinerkennung durch die identifizierten wildtypischen Aminosäuren in TM 6 und TM 8 völlig offen. Das wildtypische Wachstum der Mal⁻-Mutanten auf Dextrin könnte auch noch mit ca. einer halbmaximalen Transportrate von Dextrin zustande kommen. Transporttests mit markiertem Dextrin wurden nicht durchgeführt, so daß der Vergleich zwischen spezifischem Maltosetransport und spezifischem Dextrintransport schwerfällt. Offen ist zudem, wie Dextrine mit einer Größe zwischen Maltose und Maltoheptaose transportiert werden können.

Ein Hinweis für eine eher unspezifische Substratbindestelle in MalF/MalG ist der Transport von p-Nitrophenyl- α -Maltosid, welches in MBP-unabhängigen Mutanten, nicht aber im wildtypischen System transportiert werden kann. Außerdem hemmen weitere Zucker, die von MBP nicht erkannt werden, den Transport von Maltose in MBP-unabhängigen Mutanten, ein Hinweis dafür, daß auch diese von MalF/MalG erkannt werden (Boos & Lucht, 1995).

Die Alternative zur Annahme der Beteiligung an einer Substratbindestelle für die Reste in TM 6 wäre folglich die Annahme einer speziellen Störung des Transportes von hauptsächlich Maltose durch die substituierten Reste.

Die Gründe dafür, daß die Mutanten in TM 8 nicht an einer Dextrinerkennung beteiligt sein müssen, sind vielfältiger. Zunächst muß betont werden, daß keine Suche nach Dex⁻ oder Dex^{reduziert}-Mutanten beispielsweise auf MacConkey Maltoheptaose-Platten durchgeführt wurde. Solchermaßen identifizierte Mutationen könnten in enger gefaßten Regionen liegen und sich auf weniger Aminosäuren konzentrieren, als die hier vorgestellten Mutanten der Mal⁺Dex⁻-Kategorie, falls es hochspezifische Kontaktstellen gibt. In TM 8 besitzen bis auf die Mal⁻Dex⁻ Mutanten alle einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Dex^{reduziert}-Phänotyp und sind rings um das "helical wheel" verteilt. Diese Mutanten sind meist gekoppelt an eine Reduktion der Hydrophobizität und lösen teilweise Konformationsänderungen aus, die sich in Temperatursensitivität und erhöhter Proteinase K-Sensitivität zeigen. Mehrfachmutanten besitzen wahrscheinlich zumindest teilweise synthetische Phänotypen, analog zu MBP-unabhängigen Mutanten, die ebenfalls überwiegend in die Mal⁺Dex⁻-Kategorie einzuordnen sind. Der überwiegende Eindruck ist folglich der, daß Konformationsänderungen, die weit über die Umgestaltung einer einzelnen Kontaktstelle hinausgehen, den Dex⁻-Phänotyp an verschiedenen Helixseiten von TM 8 auslösen. Das Zustandekommen des Dex^{reduziert} oder Dex⁻-Phänotyps läßt sich durch eine putative Verengung des Transportkanals oder eine reduzierte Flexibilität beim Öffnen und Schließen erklären.

2. Untersuchungen zur Membraninsertion von MalF-PhoA-Fusionsproteinen

2.1 Die Untersuchung der Membraninsertion von Transmembrandomäne 6

Schon früher wurden isolierte Stop-Transfer-Domänen aus polytopen Membranproteinen als bitope Membranproteine auf ihre Membraninsertion und Funktion als Exportsignal untersucht (Audigier *et al.*, 1987; Calamia & Manoil, 1992). Nach den mir vorliegenden Informationen wurde aber bislang noch nicht eine C-terminale Transmembrandomäne im Kontext eines polytopen Membranproteins auf ihre Membraninsertion untersucht und zwar sowohl als Stop-Transfer-Signal als auch als Exportsignal. Das geschah im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal. Dabei wurde ein und dieselbe Sequenz in unterschiedlicher Orientierung untersucht und damit auch die Unterschiede in den Bedingungen für Stop-Transfer und Export einer nachfolgenden C-terminalen Domäne im polytopen Membranprotein analysiert. Die Resultate konnten mit Ergebnissen zur Insertion von abspaltbaren Signalsequenzen und bitoper Membranproteine verglichen werden.

2.1.1 Die Stop-Transfer-Funktion von Transmembrandomäne 6

Die Untersuchung von TM 6 von MalF als Stop-Transfer-Sequenz führt zu mehreren Ergebnissen:

1. Die Hydrophobizität ist ein Hauptkriterium für die Funktionalität von TM 6 als Stop-Transfer-Segment. Die Position einer Substitution (als solche) oder eine benachbarte Position ist offensichtlich nicht relevant für den Insertionsvorgang, wenn nicht die Hydrophobizität des TM-Abschnittes durch eine positive Ladung reduziert wird (Beispiele: 6190AP, 647AP, 615AP, 652AP mit Hydrophobizitätswerten zwischen ca. -35 und -48 kcal/mol).
2. Die TM 6 am C-Terminus des polytopen Membranproteins einer MalF-AP-Fusion verhält sich bezüglich der notwendigen Hydrophobizität wie:
 - die native Stop-Transfer-Sequenz eines bitopen Membranproteins vom Typ Ia (z.B: Gen III Protein (pIII) des Bakteriophagen ϕ 1 (Davis *et al.*, 1985))
 - künstliche bitope Membranproteine vom Typ Ia (z.B: Interleukin 2 (IL2) (Kuroiwa *et al.*, 1991); pIII-Konstrukte (Davis & Model, 1985))
 - die Stop-Transfer-Sequenz eines bitopen Membranproteins vom Typ Ib (z.B: PhoA-Konstrukte (Chen & Kendall, 1995))
 - die Stop-Transfer-Sequenz eines bitopen Membranproteins vom Typ II (z.B: PhoA-Konstrukte (Chen & Kendall, 1995)).

Die Funktionalität der Stop-Transfer-Sequenz sowohl dieser bitopen Membranproteine als auch der TM 6 ist sicher ab ca. -40 kcal/mol. Zwischen ca. -30 und -40 kcal/mol kann es je nach Aminosäuresequenz zu Funktionsverlusten kommen, die sich unter ca. -30 kcal/mol schnell bis zum vollständigen Funktionsverlust ausweiten.

Das ist ein bemerkenswerter Befund, da man annehmen könnte, daß N-terminal von TM 6 liegende TMs zum einen die Insertion durch Coinserter erleichtern und zum anderen eine inserierte TM 6 durch Interaktionen stabilisieren. Beides ist nach wie vor nicht ausgeschlossen, ist aber aufgrund der Vergleiche mit bitopen Membranproteinen offensichtlich nicht der Fall.

3. Die Funktionalität der TM 6 als Stop-Transfer-Domäne unterliegt keiner "Alles-oder-Nichts"-Bestimmung sondern nimmt graduell ab, wenn die Hydrophobizität (durch eingeführte positive Ladungen: 616AP, 64AP, 611AP und 644AP) abnimmt. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Derivate der nativen Stop-Transfer-Domäne von pIII überein (Davis *et al.*, 1985).

Die bisher publizierten hydrophoben Schwellenwerte für die Funktion der Stop-Transfer-Sequenzen bitoper Membranproteine sind zu verschieden (eine nicht-funktionelle Sequenz besitzt 30,4 kcal/mol und die nächst hydrophobere, funktionelle Sequenz 40,2 kcal/mol (Davis & Model, 1985)). Oder sie sind durch die Aminosäurezusammensetzung bedingt, zu uneinheitlich: eine "Schwelle" mit Poly-leucin (11x, flankiert durch G u. T) liegt bei -33 kcal/mol (Chen & Kendall, 1995), eine weitere "Schwelle" zwischen -39,6 und -42,0 kcal/mol bei Polyalaninsequenzen, die mit Leucin angereichert werden (Chen & Kendall, 1995).

Die Ergebnisse der bei diesen Arbeiten angewandte Methode der Alkalischen Fraktionierung sind zudem vermutlich weniger genau als der enzymatische Assay mit Alkalischer Phosphatase, der die graduelle Abnahme der Stop-Transfer-Funktion bei gleichzeitiger Reduktion der Hydrophobizität gut sichtbar machen kann.

4. Die positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin unterscheiden sich nicht wesentlich in ihrer Wirkung auf die Stop-Transfer-Sequenz der TM 6. Für ihre Wirkung ist ihre Position entscheidend (vergleiche 616AP, 64AP und 611AP). Das steht im Gegensatz zu ihrem Einfluß auf die TM 6 als Exportsignal.

5. Negativ geladene Substitutionen unterscheiden sich in ihrer Wirkung deutlich von der Wirkung positiver Substitutionen (623AP und 644AP).

Die AP-Aktivität der Fusion 623AP unterscheidet sich nicht von der des Wildtyps. Zwei Erklärungsmöglichkeiten sind denkbar. a) Asp₃₈₀ wird neutralisiert und in der Membran positioniert. b) Asp₃₈₀ ist aufgrund des elektrochemischen Gradienten an der stärker positiven periplasmatischen Membranaußenseite positioniert bzw. erreicht dort die Grenze des hydrophoben Kernbereichs. Die N-terminale Teilsequenz durchspannt die Membran.

Folgende Gründe sprechen für die zweite Möglichkeit: Die Neutralisierung des Aspartat für die Lokalisation in der Membran ist energetisch ungünstig. Die Membraninsertion wäre möglicherweise verlangsamt und die Stabilität der TM 6 wäre reduziert. Das Protein wird aber stabil und in vergleichsweise gut sichtbarer Menge (Westernblot) exprimiert (Abbildung 13). Außerdem wäre der N-terminale TM 6-Abschnitt durch den elektrochemischen Gradienten zweifach in der Membran stabilisiert: durch das positiv geladene Arginin an der negativ aufgeladenen cytoplasmatischen Membranseite und durch das negativ geladene Aspartat an der positiv aufgeladenen periplasmatischen Membranseite.

Die benachbart liegenden gegensätzlichen Ladungen bei 644AP (L₃₇₂R, V₃₇₅D) könnten sich neutralisieren, dies muß aber nicht unbedingt der Fall sein (Andersson & von Heijne, 1993a). Daß keine Neutralisation vorliegt, zeigt die hohe AP-Aktivität im Vergleich zu 616AP (L₃₇₂R). Die Ursache der im Vergleich sehr schlechten Stop-Transfer-Funktion kann mit der vergleichsweise geringen Hydrophobizität des restlichen TM 6-Abschnitts von -25,2 kcal/mol erklärt werden.

6. Eine positive Ladung am C-terminalen Ende von TM 6 zeigt eine gegensätzliche Wirkung gegenüber einer solchen am N-terminalen Ende: Die Fusion 626AP zeigt die niedrigste AP-Aktivität aller Fusionen.

Die Gründe könnten entweder eine sehr gute cytoplasmatische Verankerung oder ein Abbau des kompletten Fusionsproteins sein. Beide Möglichkeiten erklären, daß im Westernblot kein Fusionsprotein 626AP zu sehen ist (Abbildung 13).

Für die Instabilität von 626AP sprechen die sehr hydrophilen Aminosäuren Asn₃₇₆, His₃₈₃ und Arg₃₈₉, die die TM 6 in drei gleich große Teilstücke "zerteilen". Die Hydrophobizität der Teilstücke liegen bei -11,4 kcal/mol (Thr₃₇₀ bis Asn₃₇₆), -3,0 kcal/mol (Thr₃₇₇ bis His₃₈₃) und -14,7 kcal/mol (Met₃₈₄ bis Cys₃₈₈). Eine möglicherweise unterbleibende Membraninsertion von TM 6 erklärt aber nicht, warum diese TM 6 dann nicht einfach im Periplasma lokalisiert ist, sondern das ganze Fusionsprotein abgebaut wird.

Für die Möglichkeit der stabilen Insertion dieser TM 6 spricht folgendes:

Arg₃₈₉ nahe dem C-terminalen Ende der TM 6 von 626AP verkürzt den ladungsfreien TM 6-Abschnitt zwar auf 19 Aminosäuren (inkl. His₃₈₃) mit der Gesamthydrophobizität von -29,1 kcal/mol. Eine potentielle stabile Verankerung durch die positiven Ladungen Arg₃₈₉ und Lys₃₉₃ könnte jedoch über die vergleichsweise niedrige Hydrophobizität dominieren. Außerdem liegt der Hydrophobizitätswert zwischen den Werten der TM 6 der Fusionen 611AP und 64AP, die beide nicht komplett abgebaut werden, sondern bei denen im Westernblot Protein zu sehen ist (Abbildung 13). Schließlich ist das Proteinprodukt von *malF626* im Vergleich zu allen Mutanten von TM 6 am wenigsten sensitiv für Proteinase K (Abbildung 9 u. 7).

Eine sichere Unterscheidung zwischen stabiler Verankerung und Instabilität von 626AP könnte durch ein Pulsmarkierungsexperiment getroffen werden.

2.1.2 Die Exportfunktion von Transmembrandomäne 6

Die natürliche Orientierung von TM 6 (N_{out}C_{in}) wurde durch die Deletion von TM 3 des Fusionsproteins zur Orientierung N_{in}C_{out} invertiert. Der Nachweis genau dieser Topologieinversion wurde schon früher erbracht (McGovern *et al.*, 1991).

Die Untersuchung von TM 6 von MalF als Stop-Transfer-Sequenz liefert folgende Ergebnisse:

1. Es ist bemerkenswert, daß die Sequenz von TM 6 tatsächlich als Exportsignal funktionell ist. Das bestätigt, daß hydrophobe, membrandurchspannende Sequenzen eines polytopen Membranproteins an sich keine Information über ihre Orientierung in der Membran besitzen. Die Orientierung wird demnach durch den Sequenzkontext bestimmt (McGovern *et al.*, 1991).

2. Im Gegensatz zur Stop-Transfer-Sequenz ist keine der Substitutionen mit geladener Aminosäure in der Lage, die TM 6 in ihrer Exportfunktion zu beeinträchtigen. Das stimmt mit einem Befund an der TM 1 (Exportdomäne) des Serin-Chemorezeptor Tsr von *E. coli* überein, wo keine einzelne positive Ladung, gleichgültig an welcher Position in der TM 1 sie sich befand, in der Lage war, den Export einer C-terminalen Sequenz zu verhindern. Erst zwei positive Ladungen konnten hier die Exportfunktion blockieren (Lee & Manoil, 1994).

Der hydrophobe Schwellenwert von -23 kcal/mol, der von Lee & Manoil für die TM 1 von Tsr festgestellt wurde (Lee & Manoil, 1994), konnte durch Substitutionen positiver Reste nicht erreicht werden (Mindesthydrophobizität 644 IIIAP: -25,2 kcal/mol).

3. Eine positive Ladung (durch Arginin) steigert den Export. Entscheidend ist die Position am N-Terminus von TM 6 (Vergleich von 611AP III mit 616AP III und 644AP III). Dies stellt eine bemerkenswerte Übereinstimmung mit der Steigerung der Exporteffizienz durch positive Ladungen am N-Terminus von abspaltbaren Signalsequenzen dar (Boyd & Beckwith, 1990; von Heijne, 1990b). Falls der Mechanismus der

Effizienzsteigerung jeweils derselbe ist (beispielsweise durch den Sec-Apparat oder die elektrostatische Affinität der positiven Ladungen an das elektrochemische Potential an der Innenseite der Cytoplasmamembran), ist er weder an eine abspaltbare Signalsequenz gebunden, noch an den im Vergleich zu einer Transmembrandomäne kurzen hydrophoben Kernbereich von vielleicht 7-15 Aminosäuren, und auch nicht an den kurzen N-Terminus einer Signalsequenz.

4. Lysin hat offenbar eine erheblich geringere Auswirkung als Arginin auf die Exportsequenz (vergleiche 64 IIIAP mit 616 IIIAP und 611 IIIAP). Das steht im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der TM 6 als Stop-Transfer-Signal.

5. Geringere Längen der hydrophoben Abschnitte der TM 6-Derivate sind im Gegensatz zur Stop-Transfer-Funktion bei der Exportfunktion offensichtlich voll ausreichend. Sie bestehen aus mindestens 12 Aminosäuren (623 IIIAP) und liegen damit weit oberhalb der Mindestzahl von sieben hydrophoben Aminosäuren für abspaltbare Signalsequenzen von exportierten Proteinen aus *E. coli* (von Heijne, 1990b).

6. Die Exportleistung durch TM 6 kann, ohne Veränderung des N-terminalen Proteinteils, direkt durch Veränderung der TM 6-Sequenz moduliert bzw. gesteigert werden. Das ist ein Hinweis auf ein unabhängiges Insertionsverhalten der TM 6 als Exportdomäne entsprechend der Vorhersage der 'Helical hairpin Hypothese' (Engelman & Steitz, 1981). Der Befund stimmt auch damit überein, daß voneinander unabhängige 'topogene Signale' in MalF in verschiedenen Teilen der Sequenz vorliegen (McGovern *et al.*, 1991).

7. Negativ geladene Substitutionen (623 IIIAP und 644 IIIAP) unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wirkung in der Exportsequenz der TM 6 auffällig von der positiver Substitutionen.

Die Fusion 623 IIIAP: Die Exporteffizienz ist um ein 3-faches im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Asp380 liegt ungefähr in der Mitte von TM 6 und unterteilt diese in zwei Abschnitte von zehn N-terminalen Resten mit -17,3 kcal/mol und zwölf C-terminalen Resten mit -16,9 kcal/mol.

Wegen der energetisch aufwendigen Neutralisierung liegt die negative Ladung vermutlich nicht im hydrophoben Kernbereich der Membran. Drei Punkte sprechen dafür, daß sich zumindest der N-terminale hydrophobe Abschnitt in der Membran verankert. a) Die Hydrophobizität dieses Abschnitts ist insgesamt und vor allem pro Aminosäure etwas größer. b) Die negative Ladung des Aspartat könnte von dem positiven Ladungsgradienten der periplasmatischen Membranseite elektrostatisch angezogen werden. Der elektrochemische Gradient würde die Membraninsertion hier "elektrophoretisch" fördern (Cao *et al.*, 1995), so daß die negative Ladung von Asp380 die periplasmatische Membranoberfläche erreichen könnte. c) Mit zehn hydrophoben Aminosäuren besitzt der N-terminale Abschnitt zudem eine typische Länge für den hydrophoben Bereich einer Signalsequenz (von Heijne, 1990b).

Der N-terminale hydrophobe TM 6-Abschnitt unterschreitet mit -17,3 kcal/mol deutlich die von Lee und Manoil vermutete Hydrophobizitätsgrenze für funktionstüchtige Exportsignale von -23 kcal/mol (Lee & Manoil, 1994). Wenn dieser Abschnitt tatsächlich die Membran durchquert, kann der hydrophobe Schwellenwert einer funktionsfähigen Exportsequenz korrigiert werden: Niedrigere Hydrophobizitäten sind möglich, wenn ein hydrophober TM-Abschnitt durch eine negative Ladung C-terminal begrenzt wird.

Die Fusion 644AP III:

Gegenüber der Fusion 616AP III (Arg372) weist die Fusion 644AP III (Arg372, Asp375) fast eine Verdoppelung der Exportaktivität auf. Das zeigt, daß sich Arg372 und Asp375 trotz ihrer relativen Nähe nicht gegenseitig neutralisieren. Es ist unklar, ob die Steigerung der Exporteffizienz durch eine neue, bisher unbekannt funktionelle Rolle der negativen Ladung zustandekommt oder nur die Ladung als solche (pos.

oder neg.) die Steigerung ausmacht. Die Substitution des Asp³⁷⁵ durch ein Arginin könnte helfen, diese Frage zu lösen.

2.1.3 Ausblick: Weitere mögliche Untersuchungen zur Membraninsertion von TM 6

Die Fusion 626AP^{III} könnte noch konstruiert werden. Die Untersuchung dieser Fusion kann zeigen, ob die Gültigkeit des hydrophoben Schwellenwerts für Exportsignale von Lee & Manoil weiter eingeschränkt werden muß. Trotz eines Hydrophobizitätswertes von -29,1 kcal/mol der TM 6 von 626AP^{III} könnten Arg³⁸⁹ und Arg³⁹³ den Export völlig blockieren. Eine solche Blockadewirkung von positiven Resten am C-Terminus von Signalsequenzen ist bekannt bei einem Hybridprotein aus Muskel Triosephosphat Isomerase des Huhns und der Signalsequenz der β -Lactamase (Summers *et al.*, 1989) und bei PhoA (Li *et al.*, 1988). Vielleicht war die Suche nach der Fusion 626AP^{III} deshalb nicht erfolgreich, weil sie mit dem verwendeten Suchsystem (Blaufärbung auf XP-Platten) aufgrund der Exportblockade der AP nicht identifiziert werden konnte.

Um den Einfluß der N-terminalen TMs der polytopen MalF-AP-Fusionen und MalF^{III}-AP-Fusionen auf Insertion und Stabilität von TM 6 zu untersuchen, könnten N-terminale TMs deletiert und resultierende Export- bzw. Stop-Transfer-Funktionen bestimmt werden.

Die Expression der MalF-AP- und MalF-AP^{III}-Fusionen wurde mit Westernblots untersucht. Über Pulsmarkierung und Immunopräzipitation könnte zusätzlich eine "relative AP-Aktivität" berechnet werden, die sich auf den Syntheseelevel des Proteins bezieht. Damit kann ausgeschlossen werden, daß die AP-Aktivitäten von verschiedenen Fusionen sich nicht aufgrund unterschiedlicher Syntheseelevels unterscheiden. Dieses Vorgehen ist ein essentieller Teil der Topologiestudie eines Membranproteins, bei dem sich über die Länge des Proteins hinweg an verschiedenen Stellen Fusionspunkte befinden, die auch unterschiedlich stabil sein können. Drastische Unterschiede zwischen gemessener und relativer AP-Aktivität ergaben sich beispielsweise bei Fusionen, mit denen die Topologie der Leader Peptidase von *E. coli* bestimmt wurden (San Millan *et al.*, 1989). Solche großen Unterschiede sind allerdings mit dem verwendeten MalF-AP(III)-System nicht zu erwarten: Das Expressionssystem, die Fusionspunkte und die Größe der Fusionsproteine (jeweils AP-Fusionen und AP^{III}-Fusionen) sind immer identisch.

Im Falle der Fusionen 611AP und 644^{III}AP, die beide eine höhere AP-Aktivität zeigen als es von der Proteinmenge zu erwarten wäre, könnte man durch Pulsmarkierung feststellen, ob die Fusionen stabil sind. Das MalF-Derivat von *malF644* ist in der Tat instabil *in vivo* und das MalF-Derivat *malF611* besitzt die am weitesten in der TM-Mitte liegende Arginin-Substitution, die die C-terminale TM 6 der Fusion am schwersten destabilisieren könnte.

2.2 Ist die Hydrophobizität von Transmembrandomänen überdimensioniert?

Eine durchschnittliche Transmembrandomäne besitzt ca. zwanzig hydrophobe Aminosäuren. Die Gesamthydrophobizität einer solchen Sequenz liegt meistens oberhalb von -40 kcal/mol (TM 6: -41,4 kcal/mol, GES-Skala) und ist damit mindestens doppelt so hoch wie die putativ minimale Hydrophobizität einer exportierenden TM (Lee & Manoil, 1994). Als plausible Funktion für die scheinbar überdimensionierte Hydrophobizität der TMs wurden andere Assembly-Schritte als die Insertion vorgeschlagen, nämlich "eine stabile Verankerung und Positionierung des Polypeptids in der Membran" (Lee & Manoil, 1994).

Durch den direkten Vergleich von TM 6 von MalF zum einen als Stop-Transfer-Sequenz und zum anderen als Exportsequenz konnte gezeigt werden (IV.2.1.1 und 2.1.2; Tabellen 11 und 12), daß für die Funktion der Exportsequenz tatsächlich beträchtlich weniger Hydrophobizität und kürzere hydrophobe Sequenzabschnitte notwendig sind. Dagegen ist die Membraninsertion der Stop-Transfer-Sequenz von der vollen Hydrophobizität abhängig, da ihre Funktion in dem Maße reduziert wird, wie die Hydrophobizität der Sequenz abnimmt (Abbildung 14). Für eine Stop-Transfer-Sequenz gibt es deshalb keine Überdimensionierung der Hydrophobizität.

2.3 Wie verhält sich eine veränderte Membraninsertion einer mutierten TM 6 im Kontext der vollständigen MalF-Sequenz?

Die Untersuchungen von Punktmutationen mit geladenen Aminosäuren in TM 6 durch MalF-AP- und MalF III-AP-Fusionen zeigen eine veränderte Membraninsertion des Stop-Transfer-Signals TM 6. Es stellt sich die Frage, wie sich solche Punktmutationen auf das ganze MalF-Protein auswirken.

Es gibt vier denkbare Möglichkeiten, die in Abbildung 32 schematisch dargestellt sind. 1. Die Topologie wird verändert (Abb. 32 B): Die TM 6 inseriert nicht mehr vollständig in die Membran, dadurch kommt die nachfolgende hydrophile Domäne im Periplasma zu liegen. Auch die TM 7 durchspannt nicht die Membran und bleibt an der periplasmatischen Membranseite, da die TM 8 und die letzte cytoplasmatische Domäne ihre ursprüngliche Lokalisation beibehalten. 2. Die Topologie wird verändert (Abb. 32 C): Durch die unvollständige Insertion von TM 6 kann die dritte cytoplasmatische Domäne nicht mehr exportiert werden und bleibt im Cytoplasma. Auch die TM 5 kann somit nicht vollständig in die Membran inserieren. 3. Die Topologie wird verändert (Abb. 32 D): Da die TM 6 nicht mehr vollständig in die Membran inseriert, erfolgt die Inversion aller nachfolgenden C-terminalen Domänen. 4. Die Topologie von MalF bleibt unverändert (Abb. 32 E): Es gibt Interaktionsstörungen, z.B. durch unvollständige Insertion mit resultierender Längsverschiebung der TM 6 oder durch Interaktionsveränderungen mit im Protein oder im Komplex benachbarten Helices.

Folgende Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden, sprechen gegen eine Topologieänderung:

Alle MalF-Mutanten, die durch AP-Fusionen untersucht wurden, erlauben ein zumindest reduziertes Wachstum mit entweder Maltose oder Maltodextrin (Ausnahme *malF623*). Eine Topologieinversion hydrophiler Domänen (wie die Translokation der vierten cytoplasmatischen Domäne mit dem stark konservierten "EAA-Motiv" oder Inversion von TM 7 und TM 8) (Abbildung 32 B, C und D) würde dies vermutlich nicht zulassen.

Für das einschneidende Resultat einer Topologieänderung sind Punktmutationen vermutlich nicht ausreichend (Manoil & Traxler, 1995). Offenbar sind dazu Deletionen ganzer TMs notwendig, wie das Beispiel der Selektion *in vivo* zur cytoplasmatischen Lokalisation Alkalischer Phosphatase der MalF-AP*J-Fusion (siehe unten unter V.2.4) oder das Beispiel der Deletion von TM 3 bei den MalF III-AP-Fusionen zeigt.

Folgende Befunde anderer Arbeiten sprechen gegen eine Topologieänderung:

Um die Verankerungsfunktion ursprünglich cytoplasmatischer Domänen aufzuheben, müßte eine gerichtete Umverteilung positiver Reste stattfinden (Andersson *et al.*, 1992; Nilsson & von Heijne, 1990; von Heijne, 1989).

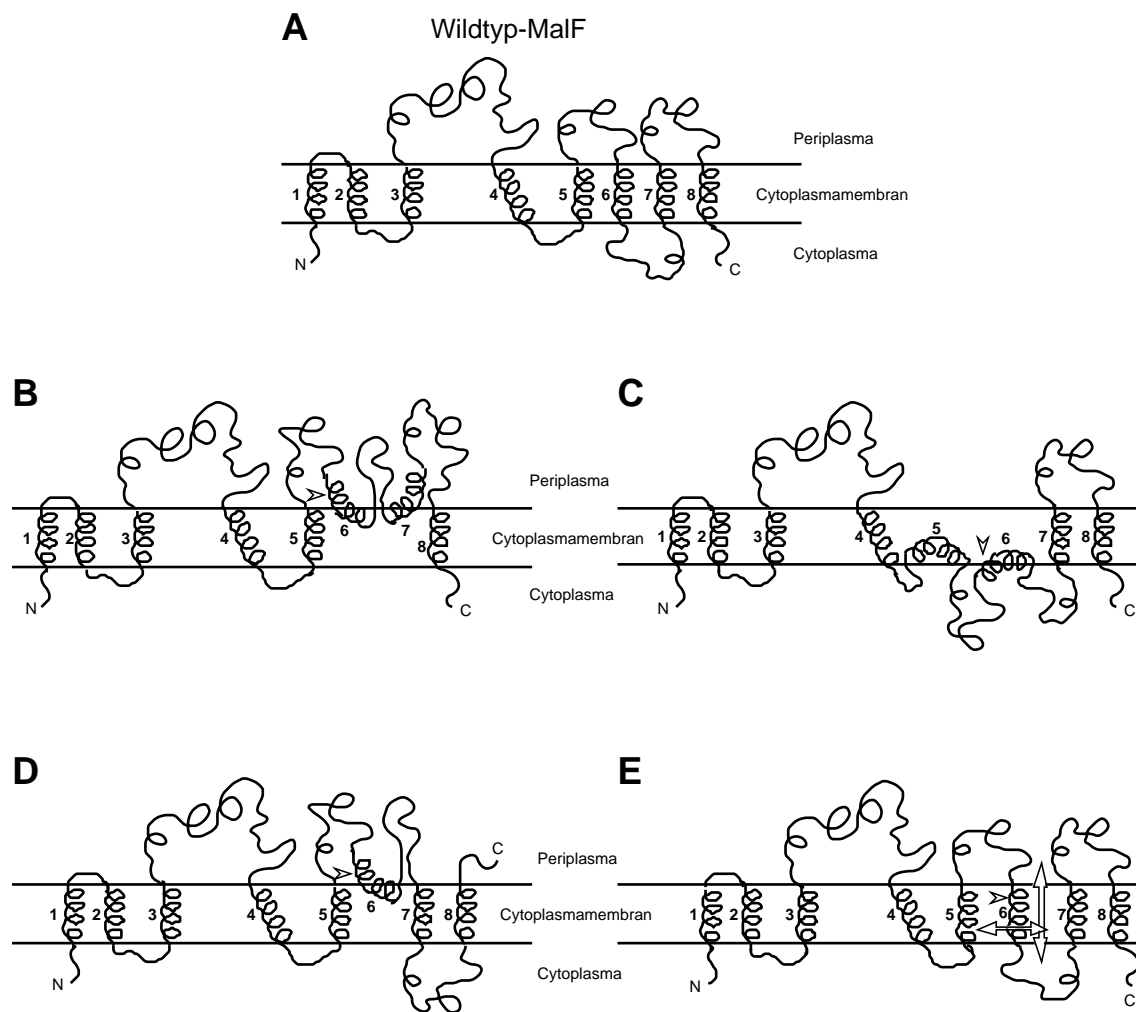


Abbildung 32. Hypothetische Auswirkungen von Mutationen in TM 6 auf die Topologie von MalF.

A. Wildtypische Topologie von MalF. B. Eine Mutation (kleiner Pfeil) in TM 6 führt dazu, daß TM 6 und TM 7 nicht mehr vollständig in die Membran inserieren. Die dazwischenliegende hydrophile Domäne ist im Periplasma lokalisiert. C. Durch die unvollständige Membraninsertion von TM 6 kann die ursprünglich dritte periplasmatische Domäne durch TM 5 nicht mehr exportiert werden und liegt im Cytoplasma vor. Die Insertion von TM 5 ist unvollständig. D. Durch die unvollständige Membraninsertion von TM 6 ist die Topologie des C-Terminus von MalF ab TM 6 invertiert. E. Eine Mutation (kleiner Pfeil) in TM 6 führt zu Interaktionsstörungen, nicht aber zu einer Veränderung der Topologie. Längsverschiebung: senkrechter Doppelpfeil; Beeinträchtigung der Interaktion mit benachbarten Helices: waagerechter Doppelpfeil.

Die Möglichkeit der Inversion des C-Terminus nach Abbildung 32 D ist unwahrscheinlich: Wird die TM 2 mit der zweiten cytoplasmatischen Domäne, oder alternativ nur die TM 3 deletiert, so invertiert der C-Terminus von MalF bis zu TM 7 (bei MalF-AP-Fusion Q); dies geschieht aber nicht, wenn das starke topogene Signal der letzten cytoplasmatischen Domäne (drei pos. Reste) und die TM 8 vorhanden sind (McGovern *et al.*, 1991).

Bei den MalF-AP-Fusionen *K und *L (Boyd *et al.*, 1987) fehlt der C-Terminus von MalF, was zu einer reduzierten Funktion der TM 4 als C-terminales Stop-Transfer-Signal führt. Jedoch wird bei Sandwichfusionen mit denselben Fusionspunkten *K und *L die TM 4 durch den wildtypischen C-Terminus von MalF stabil verankert (Ehrmann *et al.*, 1990). Analog hierzu wird angenommen, daß der C-Terminus von MalF (TM 7, TM 8, die 4. und 5. cytoplasmatische Domäne) die Mutationen in der TM 6 stabilisiert. Durch die Konstruktion entsprechender Sandwichfusionen könnte diese Annahme überprüft werden.

Als Ursache der beobachteten Phänotypen sind daher Störungen der Zusammenlagerung zum Protein und zum Transportkomplex am wahrscheinlichsten (Abbildung 32 E). Längsverschiebungen der hydrophoben Transmembransequenz senkrecht zur Membran kommen in Betracht (Manoil & Traxler, 1995). Auch die Interaktion mit benachbarten Helices könnte (dadurch) beeinträchtigt sein. Im Fall der Mutation *malF644* mit einer Instabilität *in vivo* würden diese Auswirkungen strukturelle Veränderungen dergestalt hervorrufen, daß zelluläre Proteasen dieses Protein vorzeitig abbauen.

2.4 Wie verhindert die Zelle den Export der C-terminalen Domäne eines polytopen Membranproteins?

Gegenstand dieser Frage war das Fusionsprotein MalF-AP*J (Abbildung 18), ein polytopes Membranprotein mit drei Transmembrandomänen und der Orientierung $N_{in}C_{out}$ (Boyd *et al.*, 1987). Welche Mutationen in welchen Proteinen würden bei einer *in vivo*-Selektion auftreten, damit der C-Terminus des Fusionsproteins (die zweite periplasmatische Domäne mit fusionierter Alkalischer Phosphatase, AP) gezwungen würde, im Cytoplasma zu bleiben, um Wachstum der Zellen zu ermöglichen?

Das Selektionssystem des *E. coli*-Stamms KU8 mit den Mutationen *serB* und *trxB* (Abbildung 18) wurde bereits von Kerstin Uhland diskutiert, worauf hier verwiesen wird: (Uhland, 1994; Uhland *et al.*, 1995).

Im folgenden wird darüber nachgedacht, welche Mutationen erwartet werden konnten und dieses Ergebnis verglichen mit den Mutationen, die tatsächlich aufgetreten sind.

Grundsätzlich können mehrere Klassen von Mutationen erwartet werden, die den Export der Alkalischen Phosphatase ins Periplasma verhindern. Wenn man von *serB*-Rückmutationen und Mutationen, die generell besseres Wachstum ermöglichen, absieht, sind das Mutationen, die den Sec-Translokationsapparat betreffen oder neue, bisher unbekannte Proteine, die direkt oder indirekt an Exportvorgängen beteiligt sind.

Solche zellulären Mutationen wurden nicht entdeckt. Wahrscheinlich sind sie sehr schwer zu isolieren, da die jeweiligen Proteine Funktionen ausüben, die für das Überleben der Zelle wichtig sind, wie beispielsweise bestimmte Sec-Proteine (Schatz & Beckwith, 1990).

Eine weitere Klasse von Mutationen kann für das Fusionsprotein selbst erwartet werden. Es müssen Mutationen sein, die eine Translokation der AP verhindern und somit eine Topologieänderung an MalF-AP*J herbeiführen.

Eine Topologieänderung ist hypothetisch (mit den bis jetzt bekannten Daten) auf mehrere Arten möglich. Viele verschiedene Punktmutationen könnten positiv geladene Aminosäuren umverteilen, so daß eine $N_{out}C_{in}$ -Topologie von MalF-AP*J entsteht. Eine solche "zufällige", dennoch zielgerichtete, vielfältige Veränderung des Proteins erscheint aber statistisch als sehr unwahrscheinlich. Das gilt auch für die weitere Möglichkeit, nämlich die Kombination aus Deletion und zielgerichteter Umverteilung positiver Ladungen. Die wahrscheinlichste "Lösung" des Problems durch Punktmutationen wäre die unspezifische, ungerichtete "Auflösung" der hydrophoben Transmembrandomänen (beispielsweise TM 2 oder TM 3) durch polare oder geladene Aminosäuresubstitutionen.

Durch Deletionen von einer oder mehreren TMs könnte die Translokation der AP verhindert werden.

Die Elimination der TM 2 wäre ausreichend, wenn dabei gleichzeitig ein bis zwei positive Reste der zweiten cytoplasmatischen Ankerdomäne verloren gingen, die vermutlich ihre Translokation ins Periplasma blockieren würden (vergleiche Abbildung 2). Der Verlust von TM 1 allein würde wahrscheinlich nicht ausreichen, die Orientierung von TM 3 zu verändern, da die Ankerfunktion der zweiten cytoplasmatischen Domäne über der ersten dominiert (McGovern *et al.*, 1991). Eine Deletion von zwei TMs wäre vermutlich eine schwierige Lösung, da die übrigbleibende TM immer als Signalsequenz fungieren könnte, es sei denn, sie würde als reverse Signalsequenz funktionieren (Membranproteintyp Ib). Dafür ist eine einigermaßen präzise Deletion von wenigstens drei verschiedenen Domänen notwendig, die nicht alle direkt aufeinanderfolgend angeordnet sind.

Die "einfachste" Lösung des Problems wäre die Deletion von TM 3, die unmittelbar N-terminal zum C-Terminus vorliegt oder schlicht die Deletion aller drei Transmembrandomänen von MalF-AP*J.

Tatsächlich sind nur solche Mutationen entdeckt worden.

Insgesamt wurden sieben Mutanten isoliert, bei denen die dritte TM deletiert war, so daß ein Membranprotein mit den ersten beiden N-terminalen TMs von MalF-AP*J entstanden ist. Außerdem konnten vier Mutanten gefunden werden, bei denen alle TMs eliminiert sind. Die Westernblot-Daten zeigen (Abbildung 19), daß gerade diese Proteine am schwächsten in der Cytoplasmamembran exprimiert sind, was darauf hinweist, daß sie am instabilsten sind. Interessanterweise wurde keine Mutanten entdeckt, bei denen eine TM durch hydrophile oder geladene Punkt- oder Mehrfachmutationen zerstört wurde. Das deutet darauf hin, daß der zellulär wahrscheinlichste Mechanismus zur Topologieänderung polytooper Membranproteine die Einführung großer Deletionen ist.

Dieser Befund ist ein Hinweis dafür, daß die Substitutionen geladener Aminosäuren in TM 6, die auf ihre Membraninsertion hin untersucht wurden, keine Topologieänderung verursachen.

3. Das Arbeitsmodell von MalF/MalG

3.1 Grundzüge der Herleitung des Arbeitsmodells von MalF/MalG

Für das hier entworfene Modell von MalF/MalG gibt es kein anderes, dessen Anordnung von Helices eine Grundlage gewesen ist. Das Grundmodell für die Transporter-Proteine der Uniporter, Symporter und Antiporter (USA), das mit Hilfe der Daten zur Lactose-Permease (LacY) aufgestellt wurde (Goswitz & Brooker, 1995), hätte sich aber als Grundlage für die Modellbildung verwenden lassen.

Etlche Modelle für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPGR) wurden durch die Überlagerung der bekannten Helixpositionen von Bacteriorhodopsin entworfen, beides Proteine mit sieben TMs. Erst das Verlassen der Vorgaben des funktionell von GPGRs sehr verschiedenen Bacteriorhodopsins führte zur Entwicklung eines neuen und wegweisenden Modells für die GPGRs (Baldwin, 1993). Die Transportmechanismen von LacY und MalF/MalG sind ebenfalls zu verschieden und der Transporter von Maltose ist durch seine Zusammensetzung aus vier verschiedenen Proteinen (MalE mit MalFGK₂) um einiges komplexer als die Lactose-Permease, so daß es mir schließlich nicht als geeigneter Weg erschien, für die Helices von MalF/MalG die Helixpositionen des Modells von Goswitz & Brooker als Grundlage für die Modellbildung heranzuziehen.

Eine Grundlage für die Erstellung des Modells ist die Herleitung der Aufeinanderfolge der Helices. Sie erfolgt durch die Kriterien der Looplänge und der Suppressordaten der TMs 6, 7 und 8 von MalF (Ulrich, 1996; Ehrle *et al.*, 1996). Entscheidend für die Anwendung des Kriteriums der Looplänge ist dabei die Annahme der Homologie zwischen MalF und MalG und der Homologie der Funktionen und Positionen ihrer Helices aufgrund der vorgenommenen Charakterisierung (siehe unter IV.3.10 und Tabelle 14). So konnte die Einstufung zweier Helices als "benachbart" von MalF auf MalG und umgekehrt übertragen werden. Dadurch wurde die Reihenfolge aller N-terminalen Helices bis auf die drei C-terminalen Helices in MalF und MalG festgelegt. Deren putative Anordnung war durch die Suppressoranalyse in MalF gegeben, die aufgrund des Homologiekriteriums auf MalG übertragen wurde.

Eine weitere Grundlage für das Arrangement der Helices ist ihre Einteilung in insgesamt sehr hydrophobe und insgesamt wenig hydrophobe Helices, die eher membranexponierten Positionen bzw. eher dem Komplexinneren oder der Kanalauskleidung zugehörigen Positionen zugeordnet werden (Goswitz & Brooker, 1995). Dieses Vorgehen führt - unter Berücksichtigung der Aufeinanderfolge der Helices - zu einem sehr einfachen schematischen Modell, das aber nicht ausreichend in der Lage ist, die realtiven Positionen der Helixlängsachsen zueinander zu bestimmen. Auch die Rotationsorientierung um die zentrale Helixlängsachse kann dadurch nicht bestimmt werden.

Die Bestimmung der putativ lipidzugewandten Seite der Helices ist ein Hauptproblem, das im folgenden gelöst werden mußte.

Dafür ist eine genaue Bestimmung der Schnittfläche zwischen Proteinkomplex und Membran notwendig, um im Membranbereich die Oberflächenreste und inneren Reste des Membranproteins zu erfassen. Leider gibt es hierfür kaum experimentelle Daten. In elektronenmikroskopischen Analysen von Bacteriorhodopsin-Proben (Henderson *et al.*, 1990) und Röntgenstrukturanalysen von die in Detergens gelösten Photosynthese-

reaktionszentren (RC) (Deisenhofer & Michel, 1989b; Yeates *et al.*, 1988) sind viele der Phospholipide und die Detergens-Moleküle ungeordnet und deshalb nicht beobachtbar.

Das Vorgehen des Auswählens der 18 am stärksten hydrophoben Aminosäuren für die Orientierungsbewertung der MalF/MalG-Helices geht auf die Ergebnisse von zwei einander ähnlichen Modellberechnungen zurück, die für die Identifikation der membranspannenden Region der RCs von *Rhodobacter sphaeroides* und *Rhodospseudomonas viridis* entwickelt und auch für Bacteriorhodopsin (Rees *et al.*, 1994) angewendet wurden. Die erste Modellberechnung beruht auf einer 5 Å dicken Platte, die durch den Proteinkomplex geführt wird. Von allen in der Platte enthaltenen Oberflächenatomen wird die Freie Energie G_H berechnet (Freie Energie des Transfers von der Membran ins Wasser). Es ergibt sich eine hydrophobe Region im Komplex der RCs mit einer Dicke von 35-40 Å, von der angenommen wird, daß sie in der Membran eingebettet ist (Rees *et al.*, 1989a; Yeates *et al.*, 1987). Die zweite Modellberechnung verwendet dünne Schnitte von 1-3 Å Dicke, die ebenfalls durch den Proteinkomplex geführt werden (Deisenhofer & Michel, 1989b). Für diese Schnitte wird der Anteil der Kohlenstoffatome in der verfügbaren Oberflächenregion des Komplexes berechnet. Der Anteil von Kohlenstoffatomen wird in nichtpolaren Oberflächen als signifikant höher eingeschätzt als bei polaren Oberflächen, an welchen der Anteil von polaren Sauerstoff- und Stickstoffatomen deutlich höher sein müßte. Mit dieser Methode ergibt sich ein ca. 35 Å dicker hydrophober Bereich, der die membranspannende Region des Komplexes repräsentieren müßte und der mit der Dicke der membranspannenden Region der energetischen Berechnungen übereinstimmt. Diese Dicke entspricht außerdem der Länge des Kohlenwasserstoffzentrums einer Lipidmembran (White & Wimley, 1994).

Für die Durchquerung dieser Dicke von 35-40 Å reicht eine Helixlänge von ca. 20 Aminosäuren aus (Reithmeier, 1995; White & Wimley, 1994), weshalb für die Bewertung der Helices im Rahmen des Modells von MalF/MalG die 18 am stärksten hydrophoben Aminosäuren identifiziert und verwendet wurden. Sie wurden immer aus dem von TopPred II vorgeschlagenen 21 Aminosäuren langen TM-Abschnitt ausgewählt (Ausnahme TM 7 von MalF), so daß in den TMs 6-8 von MalF die isolierten Mutationen enthalten waren und in den restlichen TMs möglichst identische oder konservierte (also putativ wichtige) Reste eingeschlossen waren.

An diesen 18 Aminosäuren langen Helices wurden die Helixseiten bestimmt, die mit der größten Wahrscheinlichkeit lipidexponiert sind.

Sequenzvergleiche, mit denen "nicht identische Positionen" in Helices identifiziert werden (die mit großer Wahrscheinlichkeit dem Lipid zugewandt sind (Baldwin, 1993)), ergeben keine ausreichende Anzahl dieser Positionen. Im benötigten Homologiebereich von ca. 50% und höher sind bis jetzt zu wenig verwandte Sequenzen zu MalF und MalG bekannt.

Dieses Problem konnte durch die Berechnung der Amphiphilizität der Helices nach Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1982a) gelöst werden. Je größer die Amphiphilizität einer Helix, desto größer ist ihr "Moment". Es wird durch die Länge der aus dem Mittelpunkt der 'helical wheels' herausragenden Pfeile, die auf die hydrophobe Helixseite weisen (Abbildungen 24-26), dargestellt. Um die mögliche Einseitigkeit einer Hydrophobizitätsskala zu vermeiden, wurde außer der Skala von Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1982b) die GES-Skala (Engelman *et al.*, 1986) verwendet. Entsprechend einem Vorschlag von Etchebest (Etchebest & Popot, *in the press*) wurde zusätzlich ein Mutabilitätsmoment mit den Werten von Jones *et al.* (1994) berechnet, das statistisch weniger stark konservierte Reste in Transmembranhelices anzeigt, die an der lipidexponierten Helixseite erwartet werden.

Die Bedeutung der hydrophoben Momente für die Rotationsorientierung muß relativiert betrachtet werden. Sie können bis zu ca. 90° aufgefächert sein und sind manchmal entsprechend den Eigenschaften der Helices nicht sehr ausgeprägt. Die Verschiebung des hydrophoben 18-Reste-Abschnitts um zwei oder drei

Aminosäuren könnte die Winkel der Momente nicht unbedeutend verändern. Wichtig ist, daß die Rotationsorientierung maßgeblich durch weitere Faktoren bestimmt wird. Das sind zum einen sehr hydrophile Aminosäuren ("Klasse 2" wie Asparagin, Glutamin, Lysin etc.) und das Kriterium von Prolin. Zum anderen liefern die Sequenzalignments die wichtige Informationen der "nicht identischen Positionen", der "Positionen, an denen polare Reste stehen können" und konservierte Positionen. Alle diese Kriterien zusammengenommen charakterisieren die Rotationsorientierung einer Helix ausreichend gut (siehe Tabelle 14).

3.2 Das Arbeitsmodell ergibt neue Aspekte zur Funktion und Organisation des Transporters

a) Der Bereich der Clusterung der Punktmutationen in Helix 6 von MalF ist im Modell kanalzugewandt positioniert. Das steht im Einklang mit der Auswirkung dieser Mutanten auf den selektiven Nichttransport von entweder Maltose oder Maltodextrin.

Der Bereich mit einer Häufung von Punktmutationen in Helix 7 von MalF liegt im Modell im Interaktionsbereich von TM 7 und 8. Das stimmt überein mit den Positionen der temperatursensitiven und den proteasesensitiven Mutationen. Dextrin reduziert transportierende Mutanten im Clusterbereich könnten sowohl durch Interaktionsstörungen als auch durch Beteiligung am Substrattransport beim Öffnen des Kanals erklärt werden. Die Lage von TM 6, 7 und 8 wurde außerdem durch die Position von Mutanten und ihren Suppressormutanten bestimmt.

b) Die im Transmembrankomplex des Transporters postulierte Substratbindestelle (Covitz *et al.*, 1994; Shuman, 1982) könnte aus Substratkontaktstellen entlang der Kanalwand bestehen (wenigstens TM 6 von MalF und TM 4 von MalG). Die folgenden Reste sind bei allen MalF-homologen Proteinen stark konserviert (Abbildung 22). An ihnen entlang könnte das Substrat nach dem Entlassen aus dem Bindeprotein durch den Transporter geleitet oder "gepumpt" werden:

			N ₃₇₆ - G ₃₈₀ - Y ₃₈₃ - L ₃₈₇	(MalF, TM 6)		
Periplasma	->	->	->	->	->	Cytoplasma
	(H ₁₅₉ -)		V ₁₆₂ - Y ₁₆₆ - G ₁₆₉ - H ₁₇₃	(MalG, TM 4)		

Diese Kanalwände stehen sich im Modell diagonal gegenüber. Histidin und Asparagin könnten an der H-Brückenbildung zu Hydroxylgruppen am Zucker am Eingang und Ausgang des Kanals beteiligt sein, Tyrosin könnte hier genauso wie bei LamB Mitglied der Substratkontaktstellen durch den Kanal hindurch sein (Schirmer *et al.*, 1995). Sowohl MalF als auch MalG werden wahrscheinlich gleichermaßen für den Substrattransportvorgang benötigt.

c) Es gibt Aminosäuremotive am "helical wheel", die vielleicht von funktioneller und/oder struktureller Bedeutung sind.

Das Motiv F₄₃₉-L₄₂₉-L₄₂₂-S₄₃₃ in MalF, TM 7, könnte an Interaktionen mit TM 8 und TM 6 (MalF) beteiligt sein. Hinweise dafür sind temperatursensitive Mutationen und Dextrin reduziert transportierende Mutanten mit entsprechenden Veränderungen an F₄₃₆ und L₄₂₉. Diese Mutanten sind auch proteasesensitiver als der Wildtyp. Ein entsprechendes Motiv ist mit F₂₁₉-A₂₂₆-L₂₁₅-S₂₂₂ in TM 5 in MalG vorhanden, das man vergleichbar positionieren kann.

Das Motiv A₄₈₈-F₄₉₅-A₅₀₂-A₄₉₁ in MalF, TM 8, könnte am Transport langkettiger Dextrine (Maltoheptaose) beteiligt sein. Hinweise sind eine temperatursensitive Mutation in A₄₈₈ und Dextrin reduziert transportierende Mutanten mit entsprechenden Positionen in A₄₈₈, F₄₉₅ und A₄₉₁. (Vergleiche hierzu die Abbildungen 27, 30 und 31). Postuliert wird hier, daß diese Helix beim Transportvorgang, d.h. am flexiblen Öffnen des Kanals (Verschiebung und Rotation der Helices), eine Beteiligung am Transportkanal erfährt. Eine alternative Erklärung für Dextrin reduziert transportierende Mutanten ist die Störung der Interaktion der Helices (Einschränkung der Flexibilität des Transportvorgangs) durch diese Mutationen. Dieses Motiv AFAA (A₂₆₇-F₂₇₈-A₂₇₁-A₂₆₄) ist in MalG, TM 6, in homologer Position vorhanden (Abbildung 26) und außerdem bei den MalG-homologen Proteinen stark konserviert.

d) Die Positionen der MBP-unabhängigen Mutanten von MalF wurden einer "distalen" oder einer "proximalen" Region zugeteilt (Covitz *et al.*, 1994). Im Modell liegen die Positionen der "distalen" Region von MalF im Interaktionsbereich der TMs 6, 7 und 8 oder am C-Terminus von TM 8 (Grenze zum Cytoplasma). Das Modell zeigt, daß die "proximale" Region (N-Terminus von TM 5) direkt an die "distale" Region angrenzt und so eine zusammenhängende transmembrane Region in MalF schafft. In der "proximalen" Region liegen die relevanten Positionen an der Grenze zum Periplasma. Hier könnten initiale Interaktionen mit dem MBP stattfinden, die sich im distalen Bereich fortsetzen, beispielsweise mit dem Öffnen der putativen Substratkontaktstelle. Auf die relative räumliche Nähe zwischen Positionen in TM 6 und TM 8, deren Mutation an einer MBP-Unabhängigkeit beteiligt sind, und Positionen, deren Mutation die Substratspezifität verändern, wird unter V.1.3.1 und in Abbildung 27 hingewiesen. Die TMs 6-8 des distalen Bereichs kommen auch für die Ausführung eines Transmembransignals an MalK in Frage, was durch die Position des konservierten EAA-Motivs zwischen TM 6 und TM 7 bestätigt wird.

Die Position der bekannten, bei Mutation zu MBP-unabhängigen Transportern führenden Reste in MalG liegen in TM 3 und im angrenzenden Periplasma N-terminal der TM 4. Dieser Bereich ist klein im Vergleich zur "distalen" und "proximalen" Region von MalF. Es ist möglich, daß im Bereich der TMs 4, 5 und 6 weitere Positionen bei entsprechender Mutation zur MBP-Unabhängigkeit führen.

e) Der für den eigentlichen Substrattransport verantwortliche Kanalbereich könnte aus den im Modell aneinandergrenzenden Helices 5, 6, 7 und 8 von MalF und den Helices 3, 4, 5 und 6 von MalG gebildet werden. Dafür gibt es einige Hinweise: aa) Die Konservierung der Aminosäuresequenz findet sich überwiegend im C-Terminus der Proteine (siehe Alignments). bb) Der Bereich, der bei Veränderung MBP-unabhängige Transporter hervorbringt, bei deren Funktion wahrscheinlich eine Art "Substratbindestelle" in der Membran exponiert wird, beschränkt sich auf diese Helices. cc) Mutationen, die den Maltose- oder Dextrintransport beeinflussen, liegen, soweit bekannt, nur in diesen Transmembranbereichen (MalF TM 5, 6, 7, 8 und MalG TM 8).

f) Das Modell MalF/MalG, im geschlossenen Zustand dargestellt, weist eine Art S-förmige "Kanalrinne" zwischen MalF und MalG auf. Die Kanalrinne des MBP, ebenfalls im geschlossenen Zustand, würde beim Andocken gerade über dieser Rinne zum Liegen kommen. Vorausgesetzt wird die Bindung der C-Domäne des MBP an MalF und die Bindung der N-Domäne an MalG (Hor & Shuman, 1993; Sharff *et al.*, 1992; Spurlino *et al.*, 1991). Die Positionen an der Oberfläche des MBP, an denen Mutationen den Maltose-/Maltodextrintransport beeinflussen, liegen zu beiden Seiten des substratbindenden Spaltes, aber einander nicht direkt gegenüber, sondern etwas seitlich versetzt (Sharff *et al.*, 1992). Dies steht im Einklang mit einer

seitlichen Versetzung der kanalständigen Helices (TM 5, 6, 7 von MalF und TM 3, 4, 5 von MalG) im Modell, die sich auf beiden Seiten der Kanalrinne ebenfalls nicht direkt gegenüberstehen.

g) Ob die S-förmige "Kanalrinne" des geschlossenen MalF/MalG-Komplexes einen Kontakt zwischen den Helices von MalF und MalG gestattet oder ob eine Art Spalt zwischen beiden Proteinen bestehen bleibt, kann hier nicht geklärt werden. Im Fall des Vorliegens eines Spaltes könnte dieser durch die stark konservierten periplasmatischen Domänen zwischen TM 7 und TM 8 von MalF und zwischen TM 5 und TM 6 von MalG (siehe IV.3.8) verdeckt werden.

h) Die große periplasmatische Domäne in MalF zwischen den TMs 3 und 4, zu der es in homologen Proteinen keine Entsprechung bezüglich der Größe gibt, liegt im Modell mit ihrem Anfangs- und Endpunkt am Randbereich des Kanals. Sie muß damit für den Transport nicht essentiell sein, könnte jedoch ihrer Position gemäß noch einen räumlich-strukturellen Einfluß auf den Transportprozess ausüben.

i) Die TM 1 von MalF ist für die Funktion des Transporters nicht essentiell. Ein Transporter mit der Deletion der Aminosäuren 2-34 (komplette TM 1) in MalF transportiert Maltose immer noch mit 61% der Wildtyptrate (Ehrmann & Beckwith, 1991). Im Modell liegt diese Domäne am Randbereich des Komplexes, und damit deutlich entfernt von dem vermuteten Transportkanal. TM 1 könnte mit TM 2, 3 und 4 zusammen ein vier-Helix-Bündel ausbilden, welches die Helices "lediglich" stabilisieren würde.

j) Die MalF-AP-Sandwichfusion B (siehe auch Abbildung 2) ist bifunktionell. Sowohl die Alkalische Phosphatase als auch MalF im Transportkomplex sind aktiv (Ehrmann *et al.*, 1990). Dies unterstützt die Annahme der geringen Bedeutung von TM 1 und möglicherweise auch der ersten periplasmatischen Domäne für die Funktion des Transporters. Die Alkalische Phosphatase liegt nach dem Arbeitsmodell am äußersten Rand des Komplexes, so daß eine Störung des Transportvorgangs (z.B. auch die Interaktion mit MBP) nicht gegeben sein muß oder zumindest nicht wesentlich ist.

Alkalische Phosphatase ist nur als Dimer aktiv. Die erfolgreiche Faltung und Dimerisierung zum aktiven Enzym steht im Einklang mit der Randposition von Alkalischer Phosphatase an MalF.

k) Die MalF-AP-Fusion R faltet sich zum aktiven Maltosetransporter mit MalG/MalK. Nach dem Arbeitsmodell befindet sich die fusionierte Alkalische Phosphatase an dem Randbereich des Transporters, so daß eine Störung des Transportvorgangs (z.B. auch die Interaktion mit MalK) nicht gegeben sein muß oder zumindest nicht wesentlich ist.

l) Die Interaktionsstellen der Transporteruntereinheiten, MalF und MalG, werden durch das Modell vorgeschlagen. Danach kontaktiert an einer Stelle der N-Terminus von MalG den C-Terminus von MalF. Das stimmt mit experimentellen Befunden überein: Ein Fusionsprotein mit der Fusionsstelle des C-terminalen Restes von MalF und dem N-terminalen Rest von MalG ergibt ein Hybridprotein, das eine partielle Funktion von MalF, von MalG und beider Proteine zusammen gestattet. Wenn der C-Terminus von MalF normalerweise vom N-Terminus von MalG weit entfernt wäre, könnte das Hybridprotein wahrscheinlich überhaupt nicht aktiv werden (Yan, S.-F. & Shuman, H. A., unveröffentlichte Ergebnisse, zitiert in: (Shuman & Panagiotidis, 1993)).

3.3 Grenzen der Aussagefähigkeit des Arbeitsmodells von MalF/MalG

Das Modell von MalF/MalG ist "nur" ein Arbeitsmodell und soll als solches verstanden werden. Es beinhaltet eine Interpretation einschlägiger Daten und liefert Ansätze für weitere Experimente.

Das Arbeitsmodell ist in der Lage, die bis jetzt bekannten experimentellen Daten zur Funktion von MalF und MalG plausibel zu deuten, zusammenzufassen und darzustellen. Die Phänotypen der in dieser Arbeit isolierten und beschriebenen Mutanten können in den Kontext des Transporterkomplexes eingeordnet und damit plausibel erklärt werden.

Die Gültigkeit einer essentiellen Grundlage für die Herleitung der Aufeinanderfolge der Helices in ihrer Anordnung im Arbeitsmodell muß noch nachgewiesen werden. Es ist die Annahme der Homologie zwischen MalF und MalG und der Homologie der Funktionen und Positionen ihrer Helices. Durch weiterführende Experimente (siehe unten) kann dieser Punkt geklärt werden.

Die Positionierung der Helices in diesem Modell kann nur eine äußerst grobe Annäherung an die Wirklichkeit sein. So stehen im Modell die Helices wie parallele Stäbe nebeneinander, was sicherlich für die Mehrheit der Helices nicht korrekt ist. Die angewendeten Kriterien können folgende Punkte nicht erfassen: Acht der vierzehn Helices im Komplex enthalten ein Prolin, das die Helices knickt. In der Aufsicht gesehen würde das periplasmatische Ende der Helix seitlich versetzt zum cytoplasmatischen Ende liegen. Die beiden Helixenden könnten verschiedene Nachbarhelices kontaktieren. Das wäre auch bei einer geneigten Helix der Fall, die mit den Kriterien nicht erkannt werden kann. Beispielsweise könnte die vertikale Schichtung der "Funktionsebenen" von TM 8 (Abbildung 27) ein Hinweis auf eine geneigte Helix sein. Interaktionen mit Nachbarhelices können superspiralisiert ("supercoiled") vorliegen, so zum Beispiel rechtsgewunden bei Glycophorin A (Treutlein *et al.*, 1992) und linksgewunden bei der Leader Peptidase (Lep) von *E. coli* (Whitley *et al.*, 1993). Solche Interaktionen können mit diesem Modell weder erfaßt noch dargestellt werden.

Die Position der Helices relativ zum Komplexzentrum kann variieren: Nicht allein die Hydrophobizität der Helices ist entscheidend, sondern die Sättigung von hydrophilen Aminosäureseitenketten durch Wasserstoffbrücken. Diese Bindungen sind im Gegensatz zu den van der Waals-Kräften gerichtet und bestimmen die "Architektur" der inneren Proteinpäckung. Aminosäureseitenkettenpaare, die interhelicale H-Brücken im MalF/MalG-Komplex miteinander ausbilden, sind zur Zeit nicht verläßlich bestimmbar und deshalb völlig unbekannt. Ionenbindungen zwischen gegensätzlich geladenen Aminosäuren, wie sie in der Membranregion von LacY bekannt sind (Carrasco *et al.*, 1986; King *et al.*, 1991), scheint es weder in MalF noch in MalG noch zwischen ihnen zu geben.

Die Anordnung der Helices wurde für einen Transporter bestimmt, der in Ruhestellung und geschlossen vorliegt. Es wurde vorausgesetzt, daß die geschlossene Konformation dem energetisch günstigsten Zustand des Komplexes entspricht. Es wird hier postuliert, daß bei der energetisierten Öffnung des Kanals vermutlich einige der Helices ihre Positionen, putative Neigungen und Rotationsorientierungen um die eigene Längsachse verändern. So könnte die TM 8 beispielsweise zwischen der TM 7 und der TM 6 zu liegen kommen. Die am stärksten hydrophobe Helixseite wäre dann nicht mehr gegen das Lipid orientiert, würde aber die Rückbewegung der Helix in die Ruhestellung energetisch begünstigen.

3.4 Ausblick: Das Arbeitsmodell von MalF/MalG bietet Ansatzpunkte für weiterführende Experimente.

Als ein nächster Schritt könnte gezielt überprüft werden, ob Helices tatsächlich benachbart sind und miteinander interagieren. Einige der in TM 6 und TM 8 isolierten Punktmutationen eignen sich für die Suche nach Suppressoren an putativ benachbarten Helices. Interessant wäre es herauszufinden, ob für die die Substratspezifität verändernde Mutationen an der putativ kanalauskleidenden TM 6 vielleicht Suppressoren an der vermuteten gegenüberliegenden Kanalseite in MalG zu finden sind. Eine andere geeignete Methode für die Identifizierung benachbarter Helices wäre das "Disulfid-Mapping" über Disulfidbrückenbildung durch Cysteine (Pakula & Simon, 1992; Whitley *et al.*, 1993). Auch die im Modell postulierten Kontaktstellen zwischen MalF und MalG könnten durch diese Methoden nachgewiesen werden.

Für die die Substratspezifität verändernden Mutationen muß noch gezeigt werden, daß eine Interaktion mit Maltose oder Maltoheptaose tatsächlich stattfindet. Ein entsprechender Nachweis steht noch aus.

Die Suche nach weiteren substratspezifisch veränderten Mutationen könnte fortgesetzt werden. Die TM 5 in MalF und die TMs 3-6 in MalG sind aussichtsreiche Kandidaten hierfür. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Frage, wie groß der "Kanal" wirklich ist, bzw. welche Helices an einer "Substraterkennung" beteiligt sind. Sind in MalF die Helices 3 und 4 noch beteiligt?

Die "Motive" in MalF TM 6 und TM 8 (siehe V.3.2), die an einer Art Substraterkennung beteiligt sein könnten, besitzen je ein fast identisches bzw. identisches Pendant in MalG TM 4 und TM 6. Diese Aminosäuren könnten gezielt mutagenisiert werden. Die Ergebnisse könnten zeigen, ob homolog aufgebaute Helices auch homologe Funktionen im Transporter wahrnehmen.

Die TMs 1 und 2 von MalF liegen am Außenbereich des Arbeitsmodells. TM 1 ist nicht essentiell für den Transporter, vielleicht genausowenig TM 2. Diese beiden TMs könnten zusammen deletiert werden und, falls nötig, mittels unspezifischer Mutagenese nach Mal⁺-Revertanten des resultierenden 12 TM-Transporters gesucht werden.

Das Arbeitsmodell selbst könnte über entsprechende Computerprogramme überarbeitet werden. Die Anordnung und Packung der Helices könnte 'Energie-minimiert' und durch 'Molecular Dynamics'-Simulationen überprüft werden.

Die Integration von MalK in einem Nachfolgemodell wäre ein Schritt auf dem Weg zu einem weitergehenden Verständnis von Funktion und Struktur des Maltose-Transporters und verwandter Bindeprotein-abhängiger ABC-Transporter.

VI. Literatur

- Akita, M., Sasaki, S., Matsuyama, S. & Mizushima, S. (1990). SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 8164-8169.
- Akita, M., Shinkai, A., Matsuyama, S. & Mizushima, S. (1991). SecA, an essential component of the secretory machinery of *Escherichia coli*, exists as homodimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 211-216.
- Andersson, H., Bakker, E. & von Heijne, G. (1992). Different positively charged amino acids have similar effects on the topology of a polytopic transmembrane protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**(3), 1491-5.
- Andersson, H. & von Heijne, G. (1993a). Position-specific Asp-Lys pairing can affect signal sequence function and membrane protein topology. *J Biol Chem* **268**(28), 21389-93.
- Andersson, H. & von Heijne, G. (1993b). Sec dependent and sec independent assembly of *E. coli* inner membrane proteins: the topological rules depend on chain length. *Embo J* **12**(2), 683-91.
- Andersson, H. & von Heijne, G. (1994). Membrane protein topology: effects of μ_{H}^+ on the translocation of charged residues explain the 'positive inside' rule. *Embo J* **13**(10), 2267-72.
- Arkowitz, R. A., Joly, J. C. & Wickner, W. (1993). Translocation can drive the unfolding of a preprotein domain. *Embo J* **12**(1), 243-53.
- Arkowitz, R. A. & Wickner, W. (1994). SecD and SecF are required for the proton electrochemical gradient stimulation of preprotein translocation. *Embo J* **13**(4), 954-63.
- Audigier, Y., Friedlander, M. & Blobel, G. (1987). Multiple topogenic sequences in bovine opsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(16), 5783-7.
- Bachmann, B. J. (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**, 130-197.
- Baldwin, J. M. (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **12**(4), 1693-1703.
- Bardwell, J. C., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* **67**(3), 581-9.
- Barlow, D. J. & Thornton, J. M. (1988). Helix geometry in proteins. *J. Mol. Biol.* **201**, 601-619.
- Benz, R., Schmid, A., Nakae, T. & Vos-Scheperkeuter, G. H. (1986). Pore formation by LamB of *Escherichia coli* in lipid bilayer membranes. *J Bacteriol* **165**(3), 978-86.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**(3), 1496-1500.
- Blobel, G. & Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell. Biol.* **67**, 835-851.
- Boos, W. & Lucht, J. M. (1995). Periplasmic binding-protein-dependent ABC transporters. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium; cellular and molecular biology* (Neidhardt, F. C., ed.), Vol. 1. American Society of Microbiology, Washington, DC.
- Boyd, D. (1993). Use of gene fusions to determine membrane protein topology. In *Membrane Protein Structure: Experimental Approaches*. (White, S., ed.), pp. 144-63. Oxford University Press, New York.
- Boyd, D. & Beckwith, J. (1989). Positively charged amino acid residues can act as topogenic determinants in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23), 9446-50.
- Boyd, D. & Beckwith, J. (1990). The role of charged amino acids in the localization of secreted and membrane proteins. *Cell* **62**(6), 1031-1033.
- Boyd, D., Manoil, C. & Beckwith, J. (1987). Determinants of membrane protein topology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(23), 8525-9.
- Boyd, D., Traxler, B. & Beckwith, J. (1993). Analysis of the topology of a membrane protein by using a minimum number of alkaline phosphatase fusions. *J. Bacteriol.* **175**(2), 553-556.
- Brass, J. M., Ehmann, U. & Bukau, B. (1983). Reconstitution of maltose transport in *Escherichia coli*: conditions affecting import of maltose-binding protein into the periplasm of calcium-treated cells. *J. Bacteriol.* **155**, 97-106.

- Breukink, E., Demel, R. A., De Kort-Kool, G. & De Kruijff, B. (1992). SecA insertion into phospholipids is stimulated by negatively charged lipids and inhibited by ATP: a monolayer study. *Biochemistry* **31**, 1119-1124.
- Breukink, E., Nouwen, N., Van Raalte, A., Mizushima, S., Tommassen, J. & De Kruijff, B. (1995). The C terminus of SecA is involved in both lipid binding and SecB binding. *J. Biol. Chem.* **270**, 7902-7907.
- Broome-Smith, J. K. & Spratt, B. G. (1986). A vector for the construction of translational fusions to TEM beta-lactamase and the analysis of protein export signals and membrane protein topology. *Gene* **49**, 341-349.
- Broome-Smith, J. K., Tadayyon, M. & Zhang, Y. (1990). Beta-Lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export. *Mol. Microbiol.* **4**, 1637-1644.
- Brundage, L., Fimmel, C. J., Mizushima, S. & Wickner, W. (1992). SecY, SecE, and band 1 form the membrane-embedded domain of *Escherichia coli* preprotein translocase. *J Biol Chem* **267**(6), 4166-70.
- Cabelli, R. J., Dolan, K. M., Qian, L. P. & Oliver, D. B. (1991). Characterization of membrane-associated and soluble states of SecA protein from wild-type and SecA51(T^S) mutant strains of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**(36), 24420-7.
- Cafiso, D. S. (1993). Experimental determination of the topography of membrane proteins: Lessons from the nicotinic acetylcholine receptor, a multisubunit polytopic protein. In *Membrane Protein Structure: Experimental Approaches*. (White, S., ed.). Oxford University Press, New York.
- Calamia, J. & Manoil, C. (1992). Membrane protein spanning segments as export signals. *J Mol Biol* **224**(3), 539-43.
- Cao, G., Kuhn, A. & Dalbey, R. E. (1995). The translocation of negatively charged residues across the membrane is driven by the electrochemical potential: evidence for an electrophoresis-like membrane transfer mechanism. *Embo J* **14**(5), 866-875.
- Carrasco, N., Antes, L. M., Poonian, M. S. & Kaback, H. R. (1986). Lac permease of *Escherichia coli*: histidine-322 and glutamic acid-325 may be components of a charge-relay system. *Biochemistry* **25**(16), 4486-4488.
- Chapon, C. (1982). Role of the catabolite activator protein in the maltose regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **150**, 722-729.
- Chen, H. & Kendall, D. A. (1995). Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer and polypeptide orientation. *J Biol Chem* **270**(23), 14115-14122.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989). One step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175.
- Claros, M. G. & von Heijne, G. (1994). TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput Appl Biosci* **10**(6), 685-686.
- Covitz, K.-M. Y., Panagiotidis, C. H., Hor, L.-I., Reyes, M., Treptow, N. A. & Shuman, H. A. (1994). Mutations that alter the transmembrane signalling pathway in an ATP binding cassette (ABC) transporter. *Embo J* **13**(7), 1752-9.
- Cowan, S. W. & Rosenbusch, J. P. (1994). Folding pattern diversity of integral membrane proteins. *Science* **264**(5161), 914-6.
- Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Paupit, R. A., Jansonius, J. N. & Rosenbusch, J. P. (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**(6389), 727-33.
- Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*. Freeman, New York
- Dalbey, R. E. (1990). Positively charged residues are important determinants of membrane protein topology. *TIBS* **15**, 253-257.
- Dassa, E. (1993). Sequence-function relationships in MalG, an inner membrane protein from the maltose transport system in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **7**, 39-47.
- Dassa, E. & Muir, S. (1993). Membrane topology of MalG, an inner membrane protein from the maltose transport system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **7**(1), 29-38.
- Davidson, A. & Nikaido, H. (1990). Overproduction, solubilization, and reconstitution of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 4254-4260.
- Davidson, A. L. & Nikaido, H. (1991). Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**(14), 8946-8951.

- Davidson, A. L., Shuman, H. A. & Nikaido, H. (1992). Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(6), 2360-2364.
- Davis, N. G., Boeke, J. D. & Model, P. (1985). Fine structure of a membrane anchor domain. *J Mol Biol* **181**(1), 111-21.
- Davis, N. G. & Model, P. (1985). An artificial anchor domain: hydrophobicity suffices to stop transfer. *Cell* **41**(2), 607-14.
- Débarbouillé, M. & Schwartz, M. (1979). The use of gene fusions to study the expression of *maltT*, the positive regulator gene of the maltose regulon. *J. Mol. Biol.* **132**(521-534).
- Deisenhofer, J. & Michel, H. (1989a). Nobel lecture. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *Embo J.* **8**(8), 2149-70.
- Deisenhofer, J. & Michel, H. (1989b). The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *EMBO J.* **8**, 2149-2170.
- Derman, A. I. & Beckwith, J. (1991). *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J. Bacteriol.* **173**(23), 7719-7722.
- Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D. & Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* **262**(5140), 1744-1747.
- DuBose, R. F. & Hartl, D. L. (1990). The molecular evolution of bacterial alkaline phosphatase: correlating variation among enteric bacteria to experimental manipulations of the protein. *Mol. Biol. Evol.* **7**(547-577).
- Duplay, P., Szmelcman, S., Bedouelle, H. & Hofnung, M. (1987). Silent and functional changes in the periplasmic maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. I. Transport of maltose. *J. Mol. Biol.* **194**, 663-673.
- Economou, A. & Wickner, W. (1994). SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**(5), 835-43.
- Ehrle, R., Pick, C., Ulrich, R., Hofmann, E. & Ehrmann, M. (1996). Characterization of transmembrane domains 6, 7, and 8 of MalF by mutational analysis. *J Bacteriol* **178**(8), 2255-62.
- Ehrmann, M. & Beckwith, J. (1991). Proper insertion of a complex membrane protein in the absence of its amino-terminal export signal. *J. Biol. Chem.* **266**(25), 16530-16533.
- Ehrmann, M., Boyd, D. & Beckwith, J. (1990). Genetic analysis of membrane protein topology by a sandwich gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(19), 7574-8.
- Eisenberg, D., Weiss, R. M. & Terwilliger, T. C. (1982a). The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* **299**(5881), 371-4.
- Eisenberg, D., Weiss, R. M. & Terwilliger, T. C. (1984). The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(1), 140-4.
- Eisenberg, R. M., Weiss, T. C. & Terwilliger, W. (1982b). *Faraday Symp. Chem. Soc.* **17**, 109.
- Engelman, D. M. & Steitz, T. A. (1981). The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell* **23**(2), 411-22.
- Engelman, D. M., Steitz, T. A. & Goldman, A. (1986). Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **15**, 321-53.
- Engelman, D. M. & Zaccai, G. (1980). Bacteriorhodopsin is an inside-out protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**(10), 5894-5898.
- Etchebest, C. & Popot, J.-L. (*in the press*). *Packing transmembrane alpha-helices into bundles: Computational vs. experimental approaches*. von Heijne, G. edit. Membrane protein assembly, R. G. Landes, Austin.
- Ferenci, T. (1980). The recognition of maltodextrins by *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **108**, 631-636.
- Ferenci, T., Muir, M., Lee, K.-S. & Maris, D. (1986). Substrate specificity of the *Escherichia coli* maltodextrin transport system and its component proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **860**, 44-50.
- Fiedler, G., Pajatsch, M. & Böck, A. (1996). Genetics of a novel starch utilisation pathway in *Klebsiella oxytoca*. *in press*.
- Flewelling, R. F. & Hubbell, W. L. (1986). The membrane dipole potential in a total membrane potential model. Applications to hydrophobic ion interactions with membranes. *Biophys. J.* **49**, 541-552.
- Flower, A. M., Doebele, R. C. & Silhavy, T. J. (1994). *PrlA* and *PrlG* suppressors reduce the requirement for signal sequence recognition. *J. Bacteriol.* **176**, 5607-5614.
- Flower, A. M., Osborne, R. S. & Silhavy, T. J. (1995). The allele-specific synthetic lethality of *prlA-prlG* double mutants predicts interactive domains of SecY and SecE. *EMBO J.* **14**, 884-893.

- Foster, D. L., Boublik, M. & Kaback, H. R. (1983). Structure of the *lac* carrier protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **258**, 31-34.
- Freundlieb, S., Ehmann, U. & Boos, W. (1988). Facilitated diffusion of p-nitrophenyl- α -D-maltohexaoside through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 314-320.
- Froshauer, S. & Beckwith, J. (1984). The nucleotide sequence of the gene for MalF protein, an inner membrane component of the maltose transport system of *Escherichia coli*. Repeated DNA sequences are found in the *malE-malF* intercistronic region. *J. Biol. Chem.* **259**(17), 10896-903.
- Froshauer, S., Green, G. N., Boyd, D., McGovern, K. & Beckwith, J. (1988). Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, a cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **200**(3), 501-11.
- Gallusser, A. & Kuhn, A. (1990). Initial steps in protein membrane insertion. Bacteriophage M13 procoat protein binds to the membrane surface by electrostatic interaction. *EMBO J.* **9**, 2723-2729.
- Gannon, P. M. & Kumamoto, C. A. (1988). Effects of *Escherichia coli* mutations on pre- maltose binding protein conformation and export kinetics. *J. Biol. Chem.* **263**, 11554-11558.
- Gavel, Y., Steppuhn, J., Herrmann, R. & von Heijne, G. (1991). The 'positive-inside rule' applies to thylakoid membrane proteins. *FEBS Lett* **282**(1), 41-6.
- Gebert, J. F., Overhoff, B., Manson, M. D. & Boos, W. (1988). The Tsr chemosensory transducer of *Escherichia coli* assembles into the cytoplasmic membrane via a SecA-dependent process. *J. Biol. Chem.* **263**, 16652-16660.
- Geller, B., Zhu, H. Y., Cheng, S., Kuhn, A. & Dalbey, R. E. (1993). Charged residues render pro-OmpA potential dependent for initiation of membrane translocation. *J Biol Chem* **268**(13), 9442-7.
- Geller, B. L. (1991). Energy requirements for protein translocation across the *Escherichia coli* inner Membrane. *Mol. Microbiol.* **5**(9), 2093-2098.
- Geller, B. L. & Wickner, W. (1985). M13 procoat inserts into liposomes in the absence of other membrane proteins. *J Biol Chem* **260**(24), 13281-5.
- Goswitz, V. C. & Brooker, R. J. (1995). Structural features of the uniporter/symporter/antiporter superfamily. *Protein Sci.* **4**, 534-37.
- Gray, T. M. & Matthews, B. W. (1984). Intrahelical hydrogen bonding of serine, threonine and cysteine residues within alpha-helices and its relevance to membrane-bound proteins. *J. Mol. Biol.* **175**(1), 75-81.
- Hartmann, E., Rapoport, T. A. & Lodish, H. F. (1989). Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5786-5790.
- Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E. & Downing, K. H. (1990). Model for the Structure of Bacteriorhodopsin Based on High-resolution Electron Cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**, 899-929.
- Higgins, C. F. & Ames, G. F.-L. (1981). Two periplasmic transport proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: complete nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6038-6042.
- Hofnung, M. (1974). Divergent operons and the genetic structure of the maltose B region in *Escherichia coli* K12. *Genetics* **76**, 169-184.
- Hofnung, M. & Schwartz, M. (1971). Mutations allowing growth on maltose of *Escherichia coli* K12 strains with a deleted *malT* gene. *Mol. Gen. Genet.* **112**, 117-132.
- Hor, L. I. & Shuman, H. A. (1993). Genetic analysis of periplasmic binding protein dependent transport in *Escherichia coli*. Each lobe of maltose-binding protein interacts with a different subunit of the MalFGK₂ membrane transport complex. *J Mol Biol* **233**(4), 659-70.
- Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E. & Higgins, C. F. (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**, 362-5.
- Inouye, M. & Halegoua, S. (1980). Secretion and membrane localization of proteins in *Escherichia coli*. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **7**, 339-371.
- Jander, G., Cronan, J. E. J. & Beckwith, J. (1996). Biotinylation *in vivo* as a sensitive indicator of protein secretion and membrane protein insertion. *J Bacteriol* **178**(11), 3049-58.
- Janin, J., Wodak, S., Levitt, M. & Maigret, B. (1978). Conformation of amino acid side-chains in proteins. *J. Mol. Biol.* **125**, 357-386.
- Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1994a). A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *1994* **33**(10), 3038-49.

- Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1994b). A mutation data matrix for transmembrane proteins. *FEBS Lett* **339**(3), 269-75.
- Kellermann, O. & Szmelcman, S. (1974). Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12: involvement of a "periplasmic" maltose binding protein. *Eur. J. Biochem.* **47**, 139-149.
- Kerppola, R. E. & Ames, G. F. (1992). Topology of the hydrophobic membrane-bound components of the histidine periplasmic permease. Comparison with other members of the family. *J Biol Chem* **267**(4), 2329-36.
- King, S. C., Hansen, C. L. & Wilson, T. H. (1991). The interaction between aspartic acid 237 and lysine 358 in the lactose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1062**, 177-186.
- Kuhn, A., Kiefer, D., Kohne, C., Zhu, H. Y., Tschantz, W. R. & Dalbey, R. E. (1994). Evidence for a loop-like insertion mechanism of pro-Omp A into the inner membrane of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **226**(3), 891-897.
- Kuhn, A., Wickner, W. & Kreil, G. (1986). The cytoplasmic carboxy terminus of M13 procoat is required for the membrane insertion of its central domain. *Nature* **322**(6077), 335-9.
- Kuroiwa, T., Sakaguchi, M., Mihara, K. & Omura, T. (1991). Systematic analysis of stop-transfer sequence for microsomal membrane. *J Biol Chem* **266**(14), 9251-5.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landolt-Marticorena, C., Williams, K. A., Deber, C. M. & Reithmeier, R. A. F. (1993). Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins. *J. Mol. Biol.* **229**, 602-608.
- Laws, J. K. & Dalbey, R. E. (1989). Positive charges in the cytoplasmic domain of *Escherichia coli* leader peptidase prevent an apolar domain from functioning as a signal. *Embo J* **8**(7), 2095-9.
- Lecker, S. H., Driessen, A. J. & Wickner, W. (1990). ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein. *Embo J* **9**(7), 2309-14.
- Lee, C., Li, P., Inouye, H., Brickman, E. R. & Beckwith, J. (1989). Genetic studies on the inability of beta-galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *J Bacteriol* **171**(9), 4609-16.
- Lee, E. & Manoil, C. (1994). Mutations eliminating the protein export function of a membrane-spanning sequence. *J. Biol. Chem.* **269**(46), 28822-28828.
- Lee, J. I., Kuhn, A. & Dalbey, R. E. (1992). Distinct domains of an oligotopic membrane protein are Sec-dependent and Sec-independent for membrane insertion. *J Biol Chem* **267**(2), 938-43.
- Li, P., Beckwith, J. & Inouye, H. (1988). Alteration of the amino terminus of the mature sequence of a periplasmic protein can severely affect protein export in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(20), 7685-9.
- Manoil, C. (1990). Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties. *J Bacteriol* **172**(2), 1035-42.
- Manoil, C. (1991). Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and beta-galactosidase gene fusions. *Methods Cell Biol* **34**, 61-75.
- Manoil, C. & Traxler, B. (1995). Membrane Protein Assembly: Genetic, Evolutionary And Medical Perspectives. *Annu. Rev. Genetics.* **29**, 131-150.
- Marger, M. D. & Saier, M. H. J. (1993). A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 13-20.
- Matsuyama, S., Kimura, E. & Mizushima, S. (1990). Complementation of two overlapping fragments of SecA, a protein translocation ATPase of *Escherichia coli*, allows ATP binding to its Amino-terminal region. *J. Biol. Chem.* **265**, 8760-8765.
- McGovern, K. & Beckwith, J. (1991). Membrane insertion of the *Escherichia coli* MalF protein in cells with impaired secretion machinery. *J. Biol. Chem.* **266**(31), 20870-20876.
- McGovern, K., Ehrmann, M. & Beckwith, J. (1991). Decoding signals for membrane protein assembly using alkaline phosphatase fusions. *EMBO J.* **10**(10), 2773-2782.
- Michaelis, S. & Beckwith, J. (1982). Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **36**, 435-65.

- Michaelis, S., Hunt, J. F. & Beckwith, J. (1986). Effects of signal sequence mutations on the kinetics of alkaline phosphatase export to the periplasm in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **167**(1), 160-7.
- Michaelis, S., Inouye, H., Oliver, D. & Beckwith, J. (1983). Mutations that alter the signal sequence of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **154**(1), 366-374.
- Milstein, C., Brownlee, G. G., Harrison, T. M. & Mathews, M. B. (1972). A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nature New Biol.* **239**, 117-120.
- Molla, A., Charbit, A., Le Guern, A., Ryter, A. & Hofnung, M. (1989). Antibodies against synthetic peptides and the topology of LamB, an outer membrane protein from *Escherichia coli* K12. *Biochemistry* **28**, 8254-8241.
- Monod, J. & Torrinai, A. M. (1950). De l'amylo maltose d'*Escherichia coli*. *Ann. Inst. Pasteur* **78**, 65-77.
- Neuhaus, J. M., Schindler, H. & Rosenbusch, J. P. (1983). The periplasmic maltose-binding protein modifies the channel-forming characteristics of maltoporin. *Embo J* **2**(11), 1987-91.
- Nilsson, I. & von Heijne, G. (1990). Fine-tuning the topology of a polytopic membrane protein: role of positively and negatively charged amino acids. *Cell* **62**(6), 1135-41.
- Pakula, A. & Simon, M. I. (1992). Determination of transmembrane protein structure by disulfide cross-linking: the *Escherichia coli* Tar receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4144-4148.
- Palmer, T. N., Ryman, B. E. & Whelan, W. J. (1976). The action pattern of amylo maltase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **69**, 105-115.
- Panagiotidis, C. H., Reyes, M., Sievertsen, A., Boos, W. & Shuman, H. A. (1993). Characterization of the structural requirements for assembly and nucleotide binding of an ATP-binding cassette transporter. The maltose transport system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**(31), 23685-96.
- Pedersen, S., Bridgman, P. C., Sharp, S. D. & Cohen, J. B. (1990). Identification of a cytoplasmic region of the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **265**, 569-581.
- Pick, C. (1995). *Genetische Untersuchungen zur Struktur und Funktion eines integralen Membranproteins*. Dissertationsarbeit, Universität Konstanz.
- Popot, J.-L., de Vitry, C. & Atteia, A. (1992). Folding and assembly of integral membrane proteins: an introduction. In *Membrane Protein Structure: Experimental Approaches*. (White, S., ed.). Oxford University Press.
- Popot, J. L. & Engelman, D. M. (1990). Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* **29**(17), 4031-7.
- Popot, J. L., Engelman, D. M., Gurel, O. & Zaccari, G. (1989). Tertiary structure of bacteriorhodopsin. Positions and orientations of helices A and B in the structural map determined by neutron diffraction. *J Mol Biol* **210**(4), 829-47.
- Popot, J. L., Gerchman, S. E. & Engelman, D. M. (1987). Refolding of bacteriorhodopsin in lipid bilayers. A thermodynamically controlled two-stage process. *J Mol Biol* **198**(4), 655-76.
- Prinz, W. A. & Beckwith, J. (1994). Gene fusion analysis of membrane protein topology: a direct comparison of alkaline phosphatase and beta-lactamase fusions. *J Bacteriol* **176**(20), 6410-6413.
- Pugsley, A. P. (1993). The Complete General Secretory Pathway in Gram-Negative Bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**(1), 50-108.
- Puyet, A. & Espinosa, M. (1993). Structure of the Maltodextrin-uptake Locus of *Streptococcus pneumoniae*. Correlation to the *Escherichia coli* Maltose Regulon. *J. Mol. Biol.* **230**, 800-811.
- Puziss, J. W., Strobel, S. M. & Bassford, P. J. (1992). Export of maltose-binding protein species with altered charge distribution surrounding the signal peptide hydrophobic core in *Escherichia coli* cells harboring *prl* suppressor mutations. *J. Bacteriol.* **174**(1), 92-101.
- Raibaud, O. & Richet, E. (1987). Maltotriose is the inducer of the maltose regulon. *J. Bacteriol.* **169**, 3059-3061.
- Raibaud, O., Vidal-Ingigliardi, D. & Richet, E. (1989). A complex nucleoprotein structure involved in activation of transcription of two divergent *Escherichia coli* promoters. *J. Mol. Biol.* **205**, 471-485.
- Rees, D. C., Chirino, A. J., Kim, K.-H. & Komya, H. (1994). *Membrane Protein Structure: 1. Membrane protein structure and stability: Implications of the first crystallographic analyses*. White, S. H. edit, Oxford University Press, Inc., New York.
- Rees, D. C., DeAntonio, L. & Eisenberg, D. (1989a). Hydrophobic organization of membrane proteins. *Science* **245**(4917), 510-3.
- Rees, D. C., Komiyama, H., Yeates, T. O., Allen, J. P. & Feher, G. (1989b). The bacterial photosynthetic reaction center as a model for membrane proteins. *Annu Rev Biochem* **58**, 607-33.

- Reithmeier, R. A. F. (1995). Characterization and modeling of membrane proteins using sequence analysis. *Curr. Opin. in Struct. Biol.* **5**, 491-500.
- Reyes, M., Treptow, N. A. & Shuman, H. A. (1986). Transport of p-nitrophenyl-alpha-maltoside by the maltose transport system of *Escherichia coli* and its subsequent hydrolysis by a cytoplasmic alpha-maltosidase. *J Bacteriol* **165**(3), 918-22.
- Rothman, J. E. & Lenard, J. (1977). Membrane asymmetry. *Science* **195**(4280), 743-753.
- Sääf, A., Andersson, H., Gafvelin, G. & von Heijne, G. (1995). SecA-dependence of the translocation of a large periplasmic loop in the *Escherichia coli* MalF inner membrane protein is a function of sequence context. *Mol Membr Biol* **12**(2), 209-215.
- Saier, M. H., JR. (1994). Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleanig evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiol Rev* **58**(1), 71-93.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- San Millan, J. L., Boyd, D., Dalbey, R., Wickner, W. & Beckwith, J. (1989). Use of *phoA* fusions to study the topology of the *Escherichia coli* inner membrane protein leader peptidase. *J Bacteriol* **171**(10), 5536-41.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schatz, P. J. & Beckwith, J. (1990). Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **24**, 215-48.
- Schiebel, E., Driessen, A. J., Hartl, F. U. & Wickner, W. (1991). μ_{H^+} and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* **64**(5), 927-39.
- Schiffer, M., Chang, C.-H. & Stevens, F. J. (1992). The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Eng.* **5**(3), 213-214.
- 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**(5197), 512-514.
- Schlesinger, M. J., Reynolds, J. A. & Schlesinger, S. S. (1969). Formation and localization of alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **166**, 368-379.
- Schneider, E., Freundlieb, S., Tapio, S. & Boos, W. (1992). Molecular characterization of the MalT-dependent periplasmic alpha-amylase of *Escherichia coli* encoded by *malS*. *J. Biol. Chem.* **267**(8), 5148-5154.
- Schneider, E., Hunke, S. & Tebbe, S. (1995). The MalK protein of the ATP-binding cassette transporter for maltose of *Escherichia coli* is accessible to protease digestion from the periplasmic side of the membrane. *J Bacteriol* **177**(18), 5364-5367.
- Schwartz, M. (1967). Sur l'existence chez *Escherichia coli* K12 d'une régulation commune à la biosynthèse des récepteurs des bacteriophage lambda et au métabolisme du maltose. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **113**, 685-704.
- Schwartz, M. & Hofnung, M. (1967). La maltodextrine phosphorylase d'*Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **2**, 132-145.
- Seligman, L. & Manoil, C. (1994). An amphipathic sequence determinant of membrane protein topology. *J Biol Chem* **269**(31), 19888-19896.
- Sharff, A. J., Rodseth, L. E., Spurlino, J. C. & Quioco, F. A. (1992). Crystallographic Evidence of a Large Ligand-induced Hinge-Twist Motion between the Two Domains of the Maltodextrin Binding Protein Involved in Active Transport and Chemotaxis. *Biochemistry* **31**(44), 10657-10663.
- Shuman, H. A. (1982). Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. Role of the periplasmic maltose-binding protein and evidence for a substrate recognition site in the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* **257**(10), 5455-61.
- Shuman, H. A. & Panagiotidis, C. H. (1993). Tinkering with transporters: periplasmic binding protein-dependent maltose transport in *E. coli*. *J Bioenerg Biomembr* **25**(6), 613-20.
- Silhavy, T. J., Berman, M. L. & Enquist, L. W. (1984). *Experiments with gene fusions.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Silhavy, T. J., Brickman, E., Bassford, P. J., Jr., Casadaban, M. J., Shuman, H. A., Schwartz, V., Guarente, L., Schwartz, M. & Beckwith, J. R. (1979). Structure of the malB region in *Escherichia coli* K12. II. Genetic map of the malE,F,G operon. *Mol Gen Genet* **174**(3), 249-59.

- Spurlino, J. C., Lu, G.-Y. & Quioco, F. A. (1991). The 2.3-Å Resolution Structure of the Maltose- or Maltodextrin-binding Protein, A Primary Receptor of Bacterial Active Transport and Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **266**, 5202-5219.
- Spurlino, J. C., Rodseth, L. E. & Quioco, F. A. (1992). Atomic interactions in protein-carbohydrate complexes - tryptophan residues in the periplasmic maltodextrin receptor for active transport and chemotaxis. *J. Mol. Biol.* **226**(1), 15-22.
- Summers, R. G., Harris, C. R. & Knowles, J. R. (1989). A conservative amino acid substitution, arginine for lysine, abolishes export of a hybrid protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **264**(33), 20082-20088.
- Szmelcman, S. & Hofnung, M. (1975). Maltose transport in *Escherichia coli* K12. Involvement of the bacteriophage lambda receptor. *J. Bacteriol.* **124**, 112-118.
- Szmelcman, S., Schwartz, M., Silhavy, T. J. & Boos, W. (1976). Maltose transport in *Escherichia coli* K12. A comparison of transport kinetics in wild-type and λ -resistant mutants with the dissociation constant of the maltose-binding protein as measured by fluorescence quenching. *Eur. J. Biochem.* **65**, 13-19.
- Tapio, S., Yeh, F., Shuman, H. A. & Boos, W. (1991). The *malZ* gene of *Escherichia coli*, a member of the maltose regulon, encodes a maltodextrin glucosidase. *J. Biol. Chem.* **266**(29), 19450-8.
- Towbin, H., Staehlin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 488-493.
- Traxler, B. & Beckwith, J. (1992). Assembly of a hetero-oligomeric membrane protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(22), 10852-10856.
- Traxler, B., Lee, C., Boyd, D. & Beckwith, J. (1992). The dynamics of assembly of a cytoplasmic membrane protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**(8), 5339-5345.
- Traxler, B. & Murphy, C. (1996). Insertion of the polytopic membrane protein MalF is dependent on the bacterial secretion machinery. *J. Biol. Chem.* **271**(21), 12394-12400.
- Treptow, N. A. & Shuman, H. A. (1985). Genetic evidence for substrate and periplasmic-binding-protein recognition by the MalF and MalG proteins, cytoplasmic membrane components of the *Escherichia coli* maltose transport system. *J Bacteriol* **163**(2), 654-60.
- Treptow, N. A. & Shuman, H. A. (1988). Allele-specific *malE* mutations that restore interactions between maltose-binding protein and the inner-membrane components of the maltose transport system. *J. Mol. Biol.* **202**(4), 809-822.
- Treutlein, H. R., Lemmon, M. A., Engelman, D. M. & Brunger, A. T. (1992). The glycoporphin A transmembrane domain dimer: sequence-specific propensity for a right-handed supercoil of helices. *Biochemistry* **31**(51), 12726-32.
- Uhland, K. (1994). *Genetische Analyse eines integralen Membranproteins von Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität Konstanz.
- Uhland, K., Ehrle, R., Zander, T. & Ehrmann, M. (1994). Requirements for translocation of periplasmic domains in polytopic membrane proteins. *J. Bacteriol.* **176**(15), 4565-4571.
- Uhland, K., Zander, T. & Ehrmann, M. (1995). A plate assay to detect kinetics of membrane insertion. *Res. Microbiol.* **146**(2).
- Ulrich, R. (1996). *Studien zur Struktur und Funktion des Maltosetransportsystems von Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität Konstanz.
- von Heijne, G. (1986a). The distribution of positively charged residues in bacteria inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J.* **5**, 3021-3027.
- von Heijne, G. (1986b). Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J Mol Biol* **189**(1), 239-42.
- von Heijne, G. (1988). Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes. *Biochim Biophys Acta* **947**(2), 307-33.
- von Heijne, G. (1989). Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* **341**(6241), 456-458.
- von Heijne, G. (1990a). Protein targeting signals. *Curr Opin Cell Biol* **2**(4), 604-8.
- von Heijne, G. (1990b). The signal peptide. *J Membr Biol* **115**(3), 195-201.
- von Heijne, G. (1991). Proline kinks in transmembrane alpha-helices. *J. Mol. Biol.* **218**(3), 499-503.
- von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* **225**(2), 487-94.

- von Heijne, G. & Blomberg, C. (1979). Trans-membrane translocation of proteins. The direct transfer model. *Eur J Biochem* **97**(1), 175-81.
- von Heijne, G. & Gavel, Y. (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **174**(4), 671-8.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-951.
- Walter, C., Höner zu Bentrup, K. & Schneider, E. (1992). Large scale purification, nucleotide binding properties, and ATPase activity of the MalK subunit of *Salmonella typhimurium* maltose transport complex. *J. Biol. Chem.* **267**, 8863-8869.
- Wandersman, C. & Schwartz, M. (1982). Mutations that alter the transport function of the LamB protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **151**(1), 15-21.
- Watanabe, M. & Blobel, G. (1989). Cytosolic factor purified from *Escherichia coli* is necessary and sufficient for the export of a preprotein and is a homotetramer of SecB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2728-2732.
- 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.
- White, S. H. & Wimley, W. C. (1994). Peptides in lipid bilayers: structural and thermodynamic basis for partitioning and folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 79-86.
- Whitley, P., Gafvelin, G. & von Heijne, G. (1995). SecA-independent translocation of the periplasmic N-terminal tail of an *Escherichia coli* inner membrane protein. Position-specific effects on translocation of positively charged residues and construction of a protein with a C-terminal translocation signal. *J Biol Chem* **270**(50), 29831-29835.
- Whitley, P., Nilsson, L. & von Heijne, G. (1993). Three-dimensional model for the membrane domain of *Escherichia coli* leader peptidase based on disulfide mapping. *Biochemistry* **32**(33), 8534-9.
- Whitley, P., Zander, T., Ehrmann, M., Haardt, M., Bremer, E. & von Heijne, G. (1994). Sec-independent translocation of a 100-residue periplasmic N-terminal tail in the *E. coli* inner membrane protein ProW. *Embo J.* **13**(19), 4653-4661.
- Wickner, W. (1979). The assembly of proteins into biological membranes: the membrane trigger hypothesis. *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 23-45.
- Wickner, W., Driessen, A. J. M. & Hartl, F. U. (1991). The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 101-124.
- Wickner, W. & Lodish, H. F. (1985). Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* **230**(4724), 400-407.
- Wolfe, P. B., Rice, M. & Wickner, W. (1985). Effects of two sec genes on protein assembly into the plasma membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **260**(3), 1836-41.
- Yeates, T. O., Komiyama, H., Chirino, A., Rees, D. C., Allen, J. P. & Feher, G. (1988). Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 and 2.4.1: protein-cofactor (bacteriochlorophyll, bacteriopheophytin, and carotenoid) interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21), 7993-7.
- Yeates, T. O., Komiyama, H., Rees, D. C., Allen, J. P. & Feher, G. (1987). Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: membrane-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(18), 6438-42.
- Zhu, H. Y. & Dalbey, R. E. (1989). Both a short hydrophobic domain and a carboxyl-terminal hydrophilic region are important for signal function in the *Escherichia coli* leader peptidase. *J Biol Chem* **264**(20), 11833-8.