

**Funktion einer HAMP-Domäne
in der Signaltransduktion
am Beispiel der
mykobakteriellen Adenylatcyclase *Rv3645***

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2008

vorgelegt von

Eva Franziska Berndt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2008

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. J. E. Schultz

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. O. Werz

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde zwischen November 2004 und Mai 2007 am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Joachim E. Schultz angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Joachim E. Schultz danke ich für die Überlassung des hoch interessanten Themas, seine wissenschaftliche Betreuung, viele aufschlussreiche Diskussionen, sowie für den Freiraum und die Verantwortung, die er mir bezüglich unserer Kooperationspartner übertragen hat.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Oliver Werz für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Ruth und Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer bedanke ich mich für die Abnahme der Promotionsprüfung.

Herrn Prof. Dr. Andrei N. Lupas vom MPI für Entwicklungsbiologie in Tübingen danke ich für die Motivation und zahlreiche Mutationsvorschläge für die HAMP-Domäne *Afl503*.

Bei Herrn Dr. Kornelius Zeth, Herrn Dr. Jörg Martin, Frau Ines Wanke und Frau Carolin Ewers vom MPI für Entwicklungsbiologie in Tübingen bedanke ich mich für die Unterstützung bei Kristallisationsvorhaben und Strukturaufklärung. Des Weiteren danke ich unseren Kooperationspartnern am MPI für die gute Zusammenarbeit bei folgender Veröffentlichung:

Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J. U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J. E., Lupas, A. N. and Coles, M. (2006) The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell*, **126**, 929-940.

An Herrn Dr. Christoph Schall vom Interfakultären Institut für Biochemie der Universität Tübingen geht mein Dank für die Nutzung seiner SMART-Apparatur.

Innerhalb meines Arbeitskreises am Pharmazeutischen Institut bedanke ich mich besonders bei Herrn PD Dr. Jürgen U. Linder für die Einarbeitung in die Methoden, seine Hilfsbereitschaft und seine wissenschaftlichen Ratschläge.

Bei Frau Anita Schultz bedanke ich mich herzlich für wertvolle Tipps und ihre Unterstützung bei Klonierungsarbeiten.

Frau Ursula Kurz danke ich für ihre hilfreiche Mitarbeit bei der Proteinreinigung und besonders für ihre unterstützenden Ratschläge.

Herrn Gerd Helms danke ich für seine Hilfsbereitschaft in allen technischen Belangen.

Den Doktoranden des Pharmazeutischen Instituts Tübingen danke ich für die angenehme gemeinsame Promotionszeit.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie, bei meinen Eltern Eva und Dieter Berndt, bei meinem Bruder Christian Berndt und bei Dr. Christian Peifer für ihre motivierende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1.	Serin-Rezeptor (Tsr).....	1
1.2.	HAMP-Domänen	2
1.3.	Adenylatcyclasen	4
1.4.	mycobakterielle Adenylatcyclasen.....	5
1.5.	Adenylatcyclase aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	6
2.	Fragestellung	9
3.	Material	10
3.1.	Geräte	10
3.2.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	11
3.3.	Plasmide	13
3.4.	Oligonukleotide (Primer)	13
3.4.1.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Rv3645.....	13
3.4.2.	HAMP Af1503	13
3.4.3.	<i>Corynebacterium glutamicum</i> Cgl0311	15
3.4.4.	Sequenzierprimer	16
3.5.	Puffer und Lösungen	16
3.5.1.	Stammlösungen	16
3.5.2.	Molekularbiologie	16
3.5.2.1.	Puffer und Lösungen für DNA-Arbeiten	16
3.5.2.2.	Medien für <i>E. coli</i>	17
3.5.2.3.	Medium für <i>C. glutamicum</i>	17
3.5.3.	Proteinbiochemie.....	17
3.5.3.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	17
3.5.3.2.	Suspensions-und Lysispuffer für Zellen, Reinigungspuffer für Proteine	18
3.5.3.3.	Suspensions-und Lysispuffer für Membranproteine	19
3.5.3.4.	Puffer zur Vorbereitung für die Kristallisation	19
3.5.3.5.	Western-Blot	19
3.5.3.6.	Lösungen für AC-Assay	20
4.	Methoden.....	21
4.1.	Gentechnologische Methoden.....	21
4.1.1.	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Miniprep).....	21
4.1.2.	Trennung und Detektion von DNA mit Agarose-Gelelektrophorese.....	21
4.1.3.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	21
4.1.4.	Konzentrationsbestimmung.....	21
4.1.5.	Restriktionsverdau.....	22
4.1.6.	Glätten von überhängenden Enden	22
4.1.7.	5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten	22
4.1.8.	5'-Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden	22
4.1.9.	Ligation von DNA.....	23
4.1.10.	Polymerase-chain-reaction (PCR).....	23
4.1.11.	Sequenzierung von DNA	24
4.2.	Mikrobiologische Methoden	25
4.2.1.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	25
4.2.2.	Standardtransformation von <i>E. coli</i>	25
4.2.3.	Schnelltransformation von <i>E. coli</i>	25
4.2.4.	Herstellung von <i>E. coli</i> -Dauerkulturen	25

Inhaltsverzeichnis

4.2.5.	Blau-Weiß-Screen	25
4.3.	Proteinbiochemische Methoden	26
4.3.1.	Proteinbestimmung	26
4.3.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
4.3.3.	Western Blot	27
4.4.	Proteinexpression	28
4.5.	Zellernte	28
4.6.	Zellyse	29
4.7.	Proteinreinigung durch Ni ²⁺ -NTA- und Profinity-IMAC Affinitätschromatografie 29	
4.8.	Säulenchromatografie	30
4.9.	Membranpräparation	30
4.10.	Kristallisation	30
4.10.1.	Konzentrieren	30
4.10.2.	Kristallisation	31
4.11.	Adenylatcyclase-Test (AC-Test)	31
4.12.	Klonierungen	33
4.12.1.	Mycobacterium tuberculosis/ HAMP Af1503	33
4.12.2.	Mutationen der HAMP Af1503	34
4.12.3.	Holoenzym Rv3645-Chimäre	35
4.12.4.	Corynebacterium glutamicum	37
4.12.4.1.	Konstrukt: AC Cgl0311	37
4.12.4.2.	Konstrukt: HAMP-AC Cgl0311	38
4.12.4.3.	Konstrukt: Holoenzyme AC Cgl0311	39
4.12.4.4.	Af1503 HAMP-CgAC	41
4.12.5.	Corynebacterium: Holoenzym-Chimäre	42
4.12.6.	Linker-Austausch	43
4.12.7.	Tsr-Konstrukt	45
5.	Ergebnisse	46
5.1.	Mycobacterium tuberculosis HAMP-AC Rv3645	46
5.1.1.	Optimierung der Expression von HAMP-AC Rv3645	46
5.1.1.1.	IPTG	46
5.1.1.2.	Temperatur	47
5.1.1.3.	Zeit	47
5.1.2.	Reinigung der HAMP-AC Rv3645	48
5.1.3.	Kristallisationsversuche	48
5.1.3.1.	HAMPTON-, WIZARD-Screen	49
5.2.	HAMP aus Archaeoglobus fulgidus ORF Af1503	49
5.2.1.	Die einzigartige Struktur der Af1503 HAMP-Domäne	50
5.2.2.	Funktionsanalyse mit Hilfe der Rv3645 AC als read-out: Af1503 HAMP ₍₂₇₈₋₃₃₁₎ -Rv3645AC ₍₃₃₁₋₅₄₉₎	53
5.2.2.1.	Expression, Reinigung und Aktivitätsvergleich	54
5.2.2.2.	Zeitabhängigkeit	55
5.2.2.3.	Proteinabhängigkeit WT	55
5.2.2.4.	Kinetische Charakterisierung	56
5.3.	Mutationsstudien der HAMP Af1503 via AC Rv3645 und kinetische Charakterisierung	58
5.3.1.	A291V	59
5.3.2.	A291C	60
5.3.3.	A291G	62
5.3.4.	A291I	64

Inhaltsverzeichnis

5.3.5.	A291L.....	65
5.3.6.	A291F.....	65
5.3.7.	A291W.....	66
5.3.8.	Zusammenfassung der Einzelmutationen an Position A291.....	68
5.3.9.	Die x-Positionen – Versuch einer Charakterisierung.....	70
5.3.10.	Die kanonische Packung einer coiled-coil.....	74
5.3.11.	Hoch konservierte Bereiche in HAMP <i>Af1503</i>	80
5.4.	Kristallisation WT.....	83
5.4.1.	Umstellung von Ni ²⁺ -NTA (Qiagen®) auf Profinity™ IMAC Resin (Biorad) für die Proteinreinigung.....	83
5.4.2.	Gelfiltration mit ÄKTA.....	85
5.4.3.	Versuche mit einer SMART-Apparatur.....	86
5.4.4.	Inhibitoren.....	91
5.4.4.1.	Substratanaloga und Phosphate.....	91
5.4.4.2.	Hemmung durch Ölsäure.....	92
5.4.5.	Kristallisation.....	94
5.4.5.1.	Kristallisation ohne Inhibitor.....	94
5.4.5.2.	Kristallisation mit Inhibitor.....	95
5.5.	Holoenzyme: Rv3645 und <i>Corynebacterium glutamicum</i>	96
5.5.1.	Expression und Aktivitätstest.....	96
5.5.2.	Adenylatcyclaseaktivität in <i>C. glutamicum</i> Cgl0311.....	98
5.5.3.	Einfluss von Detergenzien.....	98
5.5.4.	Chimären.....	99
5.6.	<i>Corynebacterium glutamicum</i> Cgl0311.....	101
5.6.1.	Expressionsbedingungen AC und HAMP-AC aus <i>Cgl0311</i>	101
5.6.2.	Aktivitätstests.....	102
5.6.3.	Af1503 HAMP- <i>Corynebacterium</i> AC.....	103
5.6.3.1.	Expression und Reinigung.....	103
5.6.3.2.	Proteinabhängigkeit.....	104
5.6.3.3.	Temperaturabhängigkeit.....	104
5.6.3.4.	pH-Optimum.....	105
5.6.3.5.	Kinetische Charakterisierung.....	105
5.6.4.	'Linker'-Austausch.....	106
5.6.4.1.	Linker Cgl0311 und Linker Af1503.....	107
5.6.4.2.	Kinetik Linker Cgl0311.....	107
5.7.	Tsr-Rezeptor.....	108
5.7.1.	Triple-Chimäre.....	110
5.7.2.	Tsr: sensitiv für Serin?.....	112
6.	Diskussion.....	114
6.1.	Expression und Reinigung von WT.....	114
6.2.	Kinetik von WT.....	115
6.3.	Charakterisierung der Mutanten.....	115
6.4.	Die Bedeutung des Linkers.....	118
6.5.	Modulatoren des WT.....	119
6.5.1.	Ölsäure.....	119
6.5.2.	Inhibitoren der Adenylatcyclase Rv3645.....	119
6.6.	Rotation?.....	120
6.7.	Cgl0311 Adenylatcyclase.....	122
6.7.1.	HAMP-Domäne und Adenylatcyclase Cgl0311.....	122
6.7.2.	Holoenzym.....	123
6.8.	Tsr – Rezeptor.....	125

Inhaltsverzeichnis

6.9.	Offene Fragen und Ausblick	127
7.	Zusammenfassung	128
8.	Anhang	129
8.1.	Rv3645, DNA- und Proteinsequenz: TM, HAMP, AC.....	129
8.2.	Af1503, DNA-und Proteinsequenz	131
8.3.	Corynebacterium glutamicum, DNA-und Proteinsequenz: TM, HAMP, AC	132
8.4.	Tsr, DNA-und Proteinsequenz: Rezeptor, HAMP, Kinase.....	134
8.5.	Vorhersage der TM aus Corynebacterium glutamicum	135
9.	Literatur	136

Abkürzungen

Abkürzungen

AC(n)	Adenylatcyclase(n)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS(n)	Aminosäuren
AU	arbitrary units
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (counts per minute)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	De(s)oxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Dide(s)oxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
FPLC	fast protein liquid chromatography
IPTG	Isopropylthiogalactosid
LB-Medium	Luria-Bertani Kulturmedium für Bakterien
MCS	multiple cloning site
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
Ni ²⁺ -IDA	Nickel-Iminodiacetic acid
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid
ORF	open reading frame
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tsr	Serin-Rezeptor von <i>E. coli</i>
ü.N.	über Nacht
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Glossar der Konstruktnamen

Verwendeter Konstruktnamen	Konstrukt mit Angabe der AS
AC Cgl0311	Cgl0311 AC ₍₂₉₈₋₅₀₈₎
AC Rv3645	Rv3645 AC ₍₃₃₁₋₅₄₉₎
Af1503 _{HAMP} -AC _{Cgl0311}	Af1503 HAMP ₍₂₇₈₋₃₃₁₎ -Cgl0311 AC ₍₂₉₈₋₅₀₈₎
Chimäre 1	Cgl0311 TM ₍₁₋₂₄₄₎ - Af1503 HAMP ₍₂₇₈₋₃₃₁₎ - Cgl0311 AC ₍₂₉₈₋₅₀₈₎
Chimäre 2	Rv3645 TM ₍₁₋₂₇₇₎ - Af1503 HAMP ₍₂₇₈₋₃₃₁₎ - Rv3645 AC ₍₃₃₁₋₅₄₉₎
HAMP-AC Cgl0311	Cgl0311 HAMP ₍₂₄₅₋₂₉₇₎ -AC ₍₂₉₈₋₅₀₈₎
HAMP-AC Rv3645	Rv3645 HAMP ₍₂₇₈₋₃₃₀₎ -AC ₍₃₃₁₋₅₄₉₎
Holoenzym Cgl0311	Cgl0311 TM ₍₁₋₂₄₄₎ -HAMP ₍₂₄₅₋₂₉₇₎ -AC ₍₂₉₈₋₅₀₈₎
Holoenzym Rv3645	Rv3645 TM ₍₁₋₂₇₇₎ -HAMP ₍₂₇₈₋₃₃₀₎ -AC ₍₃₃₁₋₅₄₉₎
Linker Af1503	Cgl0311 HAMP _(245-264 und 276-297) -Linker Af1503 HAMP ₍₂₉₈₋₃₀₉₎ -Cgl0311 AC ₍₂₉₈₋₅₀₈₎
Linker Cgl0311	Af1503 HAMP _(278-297 und 310-331) -Linker Cgl0311 ₍₂₆₅₋₂₇₅₎ -Rv3645 AC ₍₃₃₁₋₅₄₉₎
Tsr-HAMP _{Af1503} -AC _{Rv3645}	Tsr Rezeptor ₍₁₋₂₁₅₎ -Af1503 HAMP ₍₂₇₈₋₃₃₁₎ -Rv3645 AC ₍₃₃₁₋₅₄₉₎
Tsr-HAMP _{Af1503mut.KonstruktC} -AC _{Rv3645}	Tsr Rezeptor ₍₁₋₂₁₅₎ -Af1503 HAMP _{msIC} ₍₂₇₈₋₃₃₁₎ -Rv3645 AC ₍₃₃₁₋₅₄₉₎ (<i>ms: mutation set s. 4.12.2</i>)
Tsr-HAMP _{Tsr} -AC _{Rv3645}	Tsr Rezeptor ₍₁₋₂₁₅₎ -HAMP ₍₂₁₆₋₂₆₈₎ -Rv3645 AC ₍₃₃₁₋₅₄₉₎
WT	Af1503 HAMP _{WT} ₍₂₇₈₋₃₃₁₎ -Rv3645 AC ₍₃₃₁₋₅₄₉₎
alle weiteren Konstrukte haben selbsterklärende Namen und orientieren sich an obigen AS-Angaben.	

Einleitung

1. Einleitung

Um auf Umwelteinflüsse zu reagieren, besitzen Zellen ein ausgeklügeltes System, das Antwort und Reaktion auf Reize ermöglicht. Diese Signaltransduktionswege sind von essentieller Bedeutung, da sie überlebenswichtige Vorgänge wie Stoffwechselregulation oder Genexpression steuern. Dabei sind die Transduktionswege bekanntermaßen quer durch die Evolution grundsätzlich sehr ähnlich. In dieser Arbeit wird daher mit einem bakteriellen Signaltransduktionssystem als Modell gearbeitet. Dieses Modell umfasst folgende drei Komponenten: 1) Rezeptor/Membrananker, 2) HAMP-Domäne, 3) Adenylatcyclase.

1.1. Serin-Rezeptor (Tsr)

Das Nachrichtensystem in *E. coli* besteht aus Rezeptorkomplexen, die vorwiegend an den Zellpolen lokalisiert sind (Maddock and Shapiro, 1993; Sourjik and Berg, 2004). Dabei handelt es sich um Aspartat- (Tar), Serin- (Tsr), Dipeptid- (Tap), Galaktose/Ribose- (Trg) und Sauerstoffrezeptoren (Aer). Von Kim et al. wurde die Kristallstruktur der cytoplasmatischen Domäne des Tsr-Rezeptors gelöst (Kim et al., 1999), Abbildung 1-1.

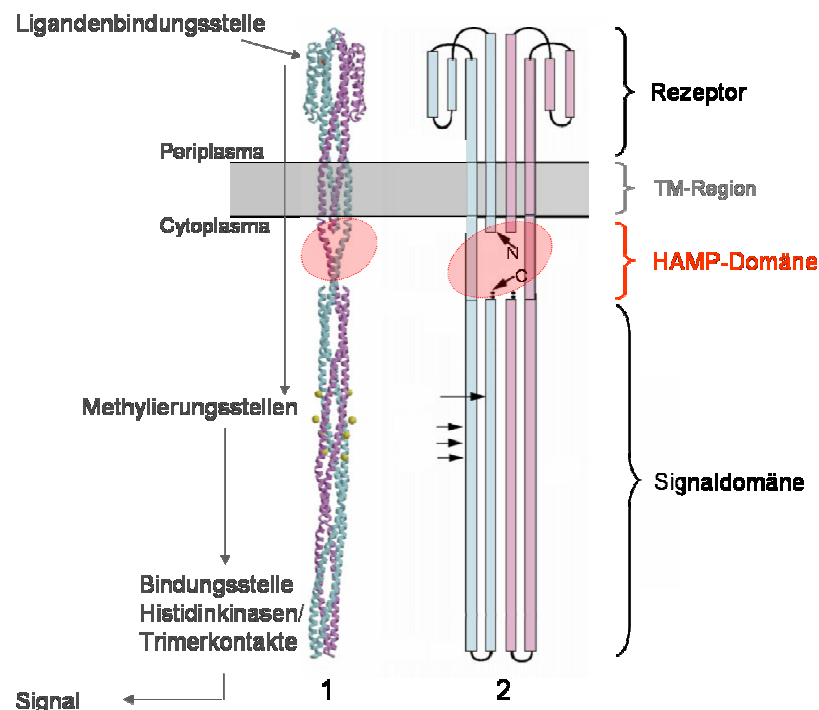


Abbildung 1-1 Modell des *E. coli* Tsr-Rezeptor Dimers, nach Kim et al. (1999).

1: Band-Modell des Tsr-Dimers, Monomere in blau und lila. Die monomere cytoplasmatische Domäne besitzt eine coiled-coil-Struktur, bestehend aus zwei antiparallelen Helixen, die durch einen „U-turn“ verbunden sind. Zwei Monomere ergeben ein verdrehtes, tetrahelicales Bündel. Gelbe Kugeln: Methylierungsstellen. Die

Einleitung

Dimensionen sind Modell 2 angepasst.

2: Schematisches Modell, Farbgebung wie bei 1. Aufbau: Rezeptorteil mit Ligandenbindungsstelle, TM-Region (grau) als Bindeglied zwischen Peri- und Cytoplasma, HAMP-Domäne (rot unterlegt) mit anschließender Signaldomäne. Diese besteht aus Methylierungsstellen (kleine Pfeile) und den Bindungsstellen für Histidinkinasen, sowie Kontaktstellen für kooperative Signaltransduktion. Der Signalweg ist links beschrieben (graue Pfeile).

Das vollständige Tsr-Modell wurde durch Kombination der Kristallstrukturen der cytoplasmatischen Domäne aus Tsr und des *E. coli* Aspartatrezeptors (Chi et al., 1997) erstellt, das dabei als Modell für die Ligandenbindungsstelle fungiert. Die Kopplung von Rezeptoreinheit an Signaldomäne erfolgt über ein Transmittermodul. Ein solches Modul stellt die HAMP-Domäne dar, die für die Regulation der Signalweiterleitung verantwortlich ist. Bisher gelang es nicht, die Kristallstruktur von HAMP in Zusammenhang mit dem Tsr-Rezeptor oder einer Effektordomäne zu lösen. Weitergehende Untersuchungen des in Abbildung 1-1 dargestellten Signalweges zeigten u.a., dass die Chemorezeptoren in kooperativen Einheiten (Clustern) zusammenarbeiten (Ames et al., 2002; Bibikov et al., 2004; Falke et al., 1997; Parkinson et al., 2005).

1.2. HAMP-Domänen

HAMP-Domänen gibt es in über 8000 Proteinen. Sie kommen in Histidin-Kinasen, Adenylatcyclasen, Methyl-akzeptierenden Chemotaxisrezeptoren und Phosphatasen vor, HAMP: (Aravind and Ponting, 1999). Es sind kleine Domänen von 53 bis 63 AS, die oft das Bindeglied zwischen Rezeptor- und Signaldomäne darstellen (Jin and Inouye, 1994). Zunächst vermutete man, dass HAMP zwei α -Helices besitzt (Butler and Falke, 1998). Dabei handelt es sich um zwei amphipatische Helices, wie von Williams et al. für die Tsr-HAMP-Domäne (Williams and Stewart, 1999) und von Linder et al. für die HAMP-Domäne aus *M. tuberculosis* Rv3645 beschrieben wird (Linder et al., 2004), Abbildung 1-2.

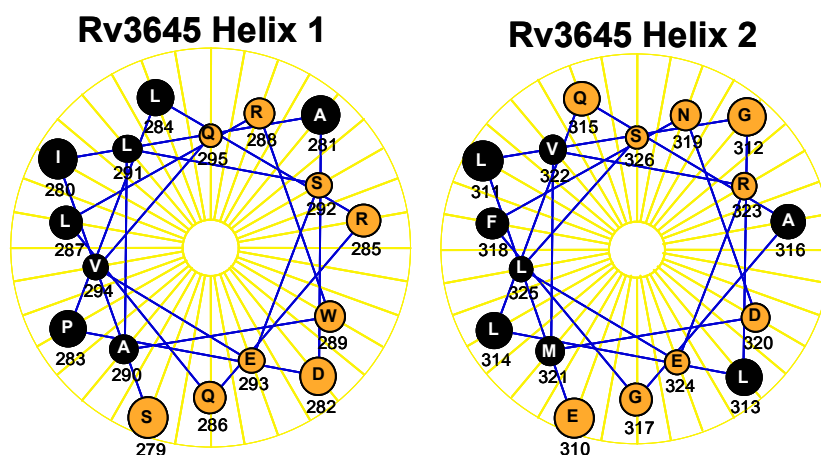


Abbildung 1-2

Radmodell der α -Helices 1 und 2 der HAMP-Domäne aus *Mycobacterium tuberculosis* Rv3645 (Linder et al., 2004), Ansicht von oben, fluchtpunktartige Darstellung.

Invers: hydrophobe AS; gelb unterlegt: polare und geladene AS. Die AS-Positionen sind angegeben, α -Helix 1 beginnt in dieser Abb. bei S279, α -Helix 2 bei E310.

Einleitung

In (Abbildung 1-2) wird die Verteilung der hydrophilen/hydrophoben AS und vor allem der hydrophobe Charakter der beiden Helices deutlich. Zwischen G297 und A308 sind die beiden Helices über einen Linker verbunden (Abbildung 1-3). Die Struktur von HAMP-Domänen wurde von Lupas et al. 1991 aufgrund ihrer Sequenz vorhergesagt: es handelt sich um coiled-coil-Strukturen (Lupas et al., 1991). Coiled-coil zeigen ein Heptadenmuster von hydrophoben AS, die in HAMP-Domänen (Abbildung 1-3) konserviert sind.

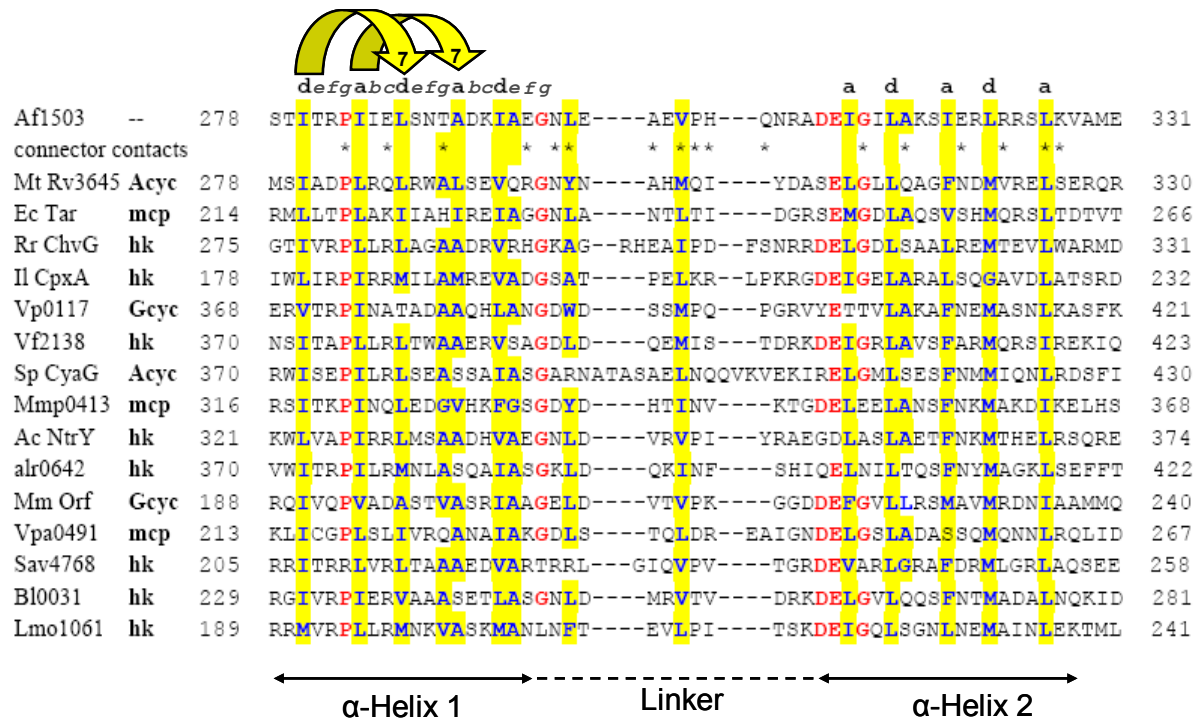


Abbildung 1-3 Repräsentativer Auszug eines Clustal-Alignments von 250 HAMP-Domänen, aus: (Hulko et al., 2006). α -Helices 1 und 2, verknüpft durch Linker.

Rot: AS, die in 70% der Sequenzen hochkonserviert sind, vor allem am Anfang und am Ende der beiden Helices positioniert (Appleman and Stewart, 2003). Blaue AS, gelb unterlegt: Positionen mit hydrophoben AS. Buchstaben a-g: coiled-coil-Nomenklatur. Gelbe Pfeile: wiederkehrende Abfolge von a, d nach 7 AS (Heptadenmuster).

*: Kontakt-AS zwischen Helices und Linker. Sequenzen: Af1503: *Archaeoglobus fulgidus*; MtRv3645: *Mycobacterium tuberculosis*; EcTar: *Escherichia coli*; RrChvG: *Rhodospirillum rubrum*; IlCpxA: *Idiomarina Ioihiensis*; Vp0117: *Vibrio parahaemolyticus*; Vf2138: *Vibrio fischeri*; SpCyaG: *Arthrospira platensis*; Mmp0413: *Methanococcus maripaludis*; AcNtrY: *Azorhizobium caulinodans*; alr0642: *Nostoc PCC7120*; MmOrf: *Magnetospirillum magnetotacticum*; Vpa0491: *Photobacterium profundum*; Sav4768: *Streptomyces avermitilis*; Bl0031: *Bifidobacterium longum*; Lmo1061: *Listeria monocytogenes*. Die HAMP-Domänen haben folgende Effektor-domänen: Histidinkinase (hk), Adenylatcyclase (Acyc), Guanylatcyclase (Gcyc), methylakzeptierender Chemotaxisrezeptor (mcp)

Die coiled-coil-Nomenklatur beschreibt die wiederkehrende Abfolge von sieben AS mit *abcdefg* (Abbildung 1-3). Die Positionen *e* und *g* sind meist polare AS; *b*, *c* und *f* sind hydrophil und zeigen nach außen. Die Positionen *a* und *d* sind mit hydrophoben AS, bevorzugt Leu und Ile, besetzt. Diese Anordnung stabilisiert die Dimerisierung der Helices durch hydrophobe Wechselwirkungen. Diese kanonische Anordnung wurde 1953 von F.

Einleitung

Crick als Merkmal einer coiled-coil Struktur postuliert (Crick, 1953). Dabei kommunizieren die *d* und *a*-Positionen der beiden Helices dergestalt miteinander, dass eine hydrophobe AS einer α -Helix von vier AS der zugewandten Helix so umgeben wird, dass ein Hohlraum entsteht, in den diese hydrophobe AS hineinpasst. Man spricht von einer *knobs-into-holes* Anordnung (Gruber and Lupas, 2003).

Lupas et al. lösten 2006 die Struktur der HAMP-Domäne eines Archaeobakteriums per NMR. Dabei beobachteten sie eine nicht-kanonische *knobs-into-knobs*-Anordnung der α -Helices (Hulko et al. 2006; Kap. 5.2.1). Hier sind, im Gegensatz zur kanonischen Anordnung, drei Positionen per Heptadenwiederholung an der Helixpackung beteiligt: in α -Helix 1 die Positionen *a*, *d* und *e* und in α -Helix 2 *a*, *d* und *g*. Mit der Struktur der HAMP-Domäne aus *Archaeoglobus fulgidus Af1503* war es möglich, den Signaltransduktionsmechanismus von HAMP zu untersuchen und im Sinne eines Homologiemodells auf andere HAMP-Domänen zu übertragen (Yoshida et al., 2007).

1.3. Adenylatcyclasen

Adenylatcyclasen stellen aus ATP cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) her, ein wichtiger *second messenger* für u.a. Gentranskription, Stoffwechselfvorgänge, Zelldifferenzierung. Externe oder interne Signale modulieren direkt, oder indirekt über zwischengeschaltete Proteine, die Aktivität von ACn. Aufgrund ihrer Sequenzen werden ACn in 6 Klassen eingeteilt (Barzu and Danchin, 1994):

Klasse	Vorkommen	Bemerkung
I	Gramnegative Bakterien	Enterobacteriaceae
II	<i>Bordetella pertussis</i> (Leppla, 1982), <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Yahr et al., 1998)	meist toxisch
III	Prokaryonten, Eukaryonten (Linder and Schultz, 2003)	Subklassen a bis d
IV	<i>Aeromonas hydrophila</i> (Sismeiro et al., 1998), <i>Yersinia pestis</i> (Gallagher et al., 2006)	Kristallstruktur
V	<i>Prevotella ruminicola</i> (Cotta et al., 1998)	einzigste Cyclase der Klasse
VI	z.B. <i>Rhizobium etli</i> (Tellez-Sosa et al., 2002)	einzig charakterisierte AC

Die Cyclasen der Klasse III sind am weitesten verbreitet. Sie sind grundsätzlich als Dimer katalytisch aktiv. Sie werden aufgrund von Sequenzeigenheiten in die Subklassen a – d unterteilt (Linder and Schultz, 2003). Dabei spielen sechs konservierte AS eine wichtige Rolle bei der Bildung des aktiven Zentrums: Lysin und Aspartat sind verantwortlich für die

Einleitung

Substratspezifität, zwei Aspartat-Reste binden metallische Cofaktoren, Asparagin und Arginin stabilisieren den Übergangszustand (Tang and Hurley, 1998; Tesmer and Sprang, 1998; Tesmer et al., 1999; Yan et al., 1997). Ein Charakteristikum der Klasse IIIb ist Threonin oder Serin anstatt Aspartat für die Substratspezifität. Dadurch existiert in dieser Unterklasse eine spezifische Variante der Purinerkennung (Linder, 2005).

Bakterielle ACn haben i. d. R. *eine* katalytische Schleife. Durch Bildung eines Homodimers wird das aktive Zentrum ausgebildet (Guo et al., 2001; Steegborn et al., 2005b). Die katalytischen AS werden von beiden Monomeren beigetragen.

1.4. mycobakterielle Adenylatcyclasen

Mycobacterium tuberculosis ist ein grampositives, aerobes, stäbchenförmiges Bakterium mit einer dicken, wachsartigen Zellwand. Es gehört zum Stamm der Actinobacteriae, dem auch *M. leprae* sowie das industriell interessante *Corynebacterium glutamicum* angehören.

Durch die Genomprojekte (Cole, 1994; Cole, 1998; Cole and Barrell, 1998; Cole et al., 1998) wurden die Sequenzen von 15 Klasse III ACn bekannt (McCue et al., 2000). Diese werden in Subklassen eingeteilt (Abbildung 1-4):

III a	III b	III c	
Rv1625c Rv2435c	Rv1318c Rv1319c Rv1320c Rv3645	Rv1264 Rv2212 Rv1647 Rv1900c Rv0891c Rv1359	Rv0386 Rv1358 Rv2488c
Membrangebundene (m) ACn	lösliche (l) ACn	DNA-bindende ACn mit HTH-Motiv (helix-turn-helix)	

Abbildung 1-4 Einteilung der mycobakteriellen ACn vom Stamm H37Rv, v=virulent. Grau unterlegt: die ACn, welche nach Expression in *E. coli* Aktivität aufwiesen (Abdel Motaal et al., 2006; Castro et al., 2005; Findeisen et al., 2007; Guo et al., 2001; Linder et al., 2004; Reddy et al., 2001; Shenoy et al., 2005; Sinha et al., 2005); eingekreist: Rv3645, mit der sich die vorliegende Arbeit beschäftigt.

Bei den membrangebundenen ACn unterscheidet man solche Klasse IIIa ACn, die eine katalytische Schleife und einen 6TM-Anker besitzen (Guo et al., 2001; Shenoy et al., 2003), während Klasse IIIb mit ebenfalls 6 Transmembranspannen, einem katalytischem Zentrum und zusätzlich einer HAMP-Domäne als Verbindungsmodul der beiden Einheiten ausgestattet

Einleitung

ist (Abbildung 1-5). Welche Rolle die Membrananker noch spielen, ist bisher ungeklärt. Die HAMP-Domäne ist höchstwahrscheinlich wesentlich an der molekularen Signaltransduktion beteiligt (Linder et al., 2004).

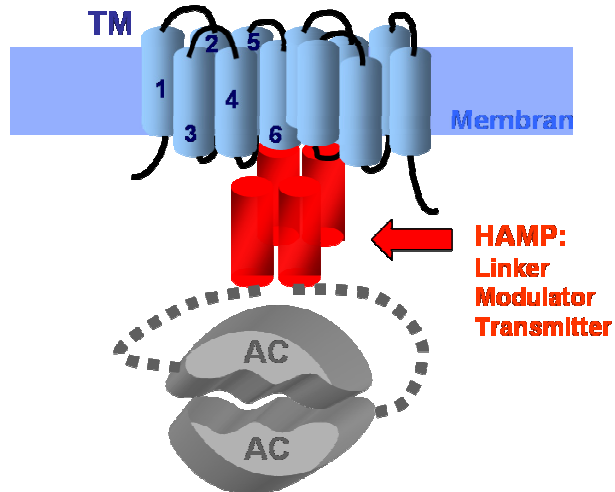


Abbildung 1-5

Schematische Darstellung der membrangebundenen AC *Rv3645* aus *M. tuberculosis* als Dimer.

Blau: Membranregion mit sechs Transmembranspannen (TM) je Monomer. An die letzte TM ist direkt α -Helix 1 der HAMP-Domäne geknüpft (rot). Am C-terminalen Ende von HAMP folgt die AC (grau) als antiparalleles Dimer. HAMP und AC sind über einen zur AC gehörenden Linker verknüpft (grau gestrichelt).

1.5. Adenylatcyclase aus *Corynebacterium glutamicum*

C. glutamicum *Cgl0311* wird zur industriellen Aminosäureproduktion hauptsächlich von L-Lysin und L-Glutamat im großtechnischen Maßstab genutzt. Das Genom von *C. glutamicum* wurde von Kalinowski et al. entschlüsselt (Kalinowski et al., 2003). Im Gegensatz zu *M. tuberculosis* gibt es in *C. glutamicum* nur eine Klasse IIIb Isoform, bestehend aus einem Membrananker, einer nachgeschalteten HAMP-Domäne und der sich anschließenden AC (Abbildung 1-6).

```

Cg10311      : -----MS-----RLLRALKWLWGTS : 15
Rv3645      : ----MDAEAFVGFROVPAARYCGLMATTAA---LPRRIHAFVRWVVRTP : 42
Rv1318c    : MSAKKSTAQRLGRVLETVTRQSGRLPETPAYGSWLLGRVSESOFRRRVRI : 50
Rv1319c    : MPAKKTMAQRLGQALETMTRQCGQLPETPAYGSWLLGRVSESPSRRWVRI : 50
Rv1320c    : MPSEKATTRHLPGAVETLSPRTCRRPETPAYGSWLLGRVSESPMRRVRI : 50
  
```

Intrazellulärer Bereich (intra)

```

Cg10311      : WPLYAATVLGTVNVEFGALAVMLFVRFLLIPQPDASNFNAEISYLPVAVGFAYL : 65
Rv3645      : WPLFSLSMLOSDIIGALFVLGFLRYGLPPQDNIQLQDLPPVNLLEFVSTV : 92
Rv1318c    : QVMLTALVVTANLLGIGVALLLVTTIAIPEP-SIVRDTPRWLTFGVVPGYV : 99
Rv1319c    : KRIVTVYIMTANLTGIVVALLVVTFAFPVP-SIYTDAPWVVTFGVAPAYA : 99
Rv1320c    : QGMLTVAILVTNVIGLIVGAMLLTVAFPKP-SVILDAPHVWVSEFIVPGYC : 99
  
```

TM 1

extra

TM 2

Einleitung

Cg10311 : AF¹AI²VAG³-ML⁴VT⁵FLMFRPVL⁶DW⁷Q⁸R-----S⁹PE¹⁰D¹¹H¹²DR¹³N¹⁴M¹⁵VR¹⁶N¹⁷L¹⁸V¹⁹M²⁰R²¹I²²PI²³Y : 108
 Rv3645 : I¹IL²FL³AG⁴-AV⁵N⁶L⁷K⁸LL⁹M¹⁰P¹¹V¹²FR¹³W¹⁴Q¹⁵RR¹⁶D¹⁷N¹⁸LL¹⁹TE²⁰PD²¹PA²²TEL²³ARS²⁴R²⁵AL²⁶R²⁷M²⁸PLY : 141
 Rv1318c : LL¹AL²AL³G⁴SY⁵AL⁶TR⁷QT⁸V⁹QA¹⁰-LR¹¹WA¹²IE-----GR¹³K¹⁴P¹⁵T¹⁶REE¹⁷ER¹⁸RT¹⁹FL²⁰AP²¹WR : 141
 Rv1319c : TL¹AL²AI³G⁴TY⁵W⁶IT⁷TR⁸IV⁹RAS¹⁰IR¹¹WA¹²IE-----ER¹³AP¹⁴S¹⁵Q¹⁶AD¹⁷GR¹⁸NT¹⁹LL²⁰LP²¹FR : 142
 Rv1320c : VL¹AF²IL³G⁴TY⁵WL⁶TR⁷QT⁸ARA⁹-LR¹⁰WA¹¹IE-----ER¹²TP¹³SH¹⁴DE¹⁵ARS¹⁶AF¹⁷LV¹⁸PL¹⁹R : 141

intra

Cg10311 : QA¹IL²CA³V⁴V⁵WL⁶IG⁷IA⁸I⁹AT¹⁰L¹¹IS¹²AS¹³V¹⁴ST¹⁵SL¹⁶AL¹⁷V¹⁸V¹⁹AF²⁰ST²¹LM²²AA²³IV²⁴V²⁵LL²⁶TY²⁷LEA : 158
 Rv3645 : RT¹L²IS³LA⁴V⁵W⁶AT⁷GG⁸GV⁹FIL¹⁰AS¹¹WS¹²V¹³AK¹⁴HA¹⁵AP¹⁶V¹⁷V¹⁸AV¹⁹ATA²⁰L²¹GAT²²ATA²³I²⁴IG²⁵Y²⁶L²⁷QS : 191
 Rv1318c : VA¹V²GH³LM⁴FW⁵GV⁶GT⁷ALL⁸T⁹LY¹⁰GL¹¹IN¹²NA¹³F¹⁴I¹⁵PR¹⁶FL¹⁷FA¹⁸VS¹⁹FC²⁰GV²¹L²²VAT²³AT²⁴YL²⁵HT : 191
 Rv1319c : VA¹AV²HL³IL⁴WD⁵IG⁶GALL⁷AT⁸LY⁹GL¹⁰AN¹¹RV¹²FV¹³T¹⁴I¹⁵IL¹⁶SV¹⁷T¹⁸IC¹⁹GV²⁰L²¹VAT²²NC²³YL²⁴FT : 192
 Rv1320c : VA¹LAV²FL³WG⁴AAA⁵AL⁶WT⁷I⁸I⁹Y¹⁰GL¹¹AN¹²RL¹³F¹⁴I¹⁵PR¹⁶FL¹⁷SM¹⁸GV¹⁹IG²⁰V²¹VAA²²TS²³CY²⁴LL²⁵T : 191

TM 3

extra

TM 4

Cg10311 : ER¹L²VR³P⁴V⁵A⁶AS⁷AL⁸ARR⁹FED¹⁰ST¹¹LE¹²PP¹³V¹⁴S¹⁵Q¹⁶RL¹⁷R¹⁸MT¹⁹W²⁰LL²¹TL²²G²³IP²⁴V²⁵M²⁶G²⁷IL²⁸LL²⁹I³⁰W³¹ : 208
 Rv3645 : ER¹V²LR³P⁴V⁵AVA⁶AL⁷RS⁸GV⁹PEN¹⁰V¹¹NAP¹²GV¹³IL¹⁴R¹⁵LM¹⁶LAW¹⁷IP¹⁸ST¹⁹GV²⁰PL²¹LAI²²V²³LAV²⁴AA : 241
 Rv1318c : EF¹AL²RP³F⁴AA⁵Q⁶AL⁷EAG⁸PP⁹RR¹⁰LAP¹¹G¹²IL¹³GR¹⁴TM¹⁵V¹⁶W¹⁷LG¹⁸SG¹⁹VP²⁰V²¹G²²IAL²³MAM- : 240
 Rv1319c : EF¹AL²RP³V⁴AA⁵K⁶AL⁷EAG⁸R⁹PP¹⁰RF¹¹AP¹²G¹³IM¹⁴GR¹⁵T¹⁶TV¹⁷WS¹⁸LG¹⁹SG²⁰VP²¹VG²²IAT²³TAL- : 241
 Rv1320c : EF¹AL²RP³M⁴AA⁵Q⁶AL⁷EV⁸GAT⁹PR¹⁰SL¹¹V¹²RG¹³IV¹⁴GR¹⁵TM¹⁶LV¹⁷LL¹⁸CS¹⁹GV²⁰PN²¹VC²²V²³AL²⁴TAI- : 240

intra

TM 5

Cg10311 : Y¹S²Q³I⁴F⁵G⁶S⁷D⁸AS⁹G¹⁰IMP¹¹ATA¹²AA¹³L¹⁴AF¹⁵AS¹⁶LV¹⁷T¹⁸G¹⁹YL²⁰GN²¹RL²²V²³SS²⁴V²⁵VD²⁶PI²⁷RE²⁸L²⁹Q³⁰E³¹AI : 258
 Rv3645 : DK¹I²ALL³HAT⁴PE⁵AL⁶FN⁷PI⁸IL⁹MM¹⁰ALA¹¹AL¹²G¹³IG¹⁴SV¹⁵ST¹⁶LL¹⁷V¹⁸AMS¹⁹IAD²⁰PL²¹R²²QL²³RW²⁴AI : 291
 Rv1318c : FEM¹V²LL³NL⁴TR⁵M⁶Q⁷FAT⁸GV⁹LI¹⁰ISM¹¹V¹²TL¹³V¹⁴FG¹⁵FIL¹⁶M¹⁷W¹⁸IL¹⁹AW²⁰LT²¹TAT²²P²³VR²⁴V²⁵RAAL : 290
 Rv1319c : YV¹LL²V³H⁴N⁵L⁶TET⁷QL⁸AS⁹AV¹⁰L¹¹IL¹²SIT¹³T¹⁴LIF¹⁵GF¹⁶LV¹⁷M¹⁸W¹⁹IL²⁰AW²¹LT²²AA²³P²⁴VR²⁵V²⁶RAAL : 291
 Rv1320c : FDD¹TF²W³EL⁴S⁵ND⁶Q⁷FMIT⁸V⁹L¹⁰L¹¹W¹²AP¹³LL¹⁴IF¹⁵GF¹⁶FIL¹⁷M¹⁸W¹⁹IL²⁰AW²¹LT²²TAT²³P²⁴VR²⁵V²⁶REAL : 290

extra

TM 6

HAMP-

Cg10311 : NR¹V²RR³GEN⁴D⁵VQ⁶VD⁷IY⁸DG⁹SE¹⁰IG¹¹V¹²LQ¹³AG¹⁴FN¹⁵EM¹⁶MR¹⁷GL¹⁸RER¹⁹QR²⁰VR²¹DL²²FG²³RY²⁴VGA : 308
 Rv3645 : SE¹V²OR³GN⁴Y⁵NA⁶H⁷MO⁸IY⁹DASE¹⁰L¹¹G¹²LL¹³Q¹⁴AG¹⁵FN¹⁶DM¹⁷V¹⁸RE¹⁹LSER²⁰Q²¹RL²²RD²³LF²⁴GR²⁵YVGE : 341
 Rv1318c : RR¹VER²GEL³RT⁴NL⁵V⁶FD⁷GT⁸EL⁹GEL¹⁰Q¹¹RG¹²FN¹³AM¹⁴V¹⁵ACL¹⁶RER¹⁷ER¹⁸VR¹⁹DL²⁰FG²¹RHVGR : 340
 Rv1319c : KR¹VE²Q³GD⁴LR⁵GD⁶LV⁷FD⁸GT⁹EL¹⁰GEL¹¹Q¹²RG¹³FN¹⁴AM¹⁵V¹⁶N¹⁷CL¹⁸RER¹⁹ER²⁰VR²¹DL²²FG²³RHVGR : 341
 Rv1320c : NR¹VE²Q³GD⁴LS⁵GD⁶LV⁷FD⁸GT⁹EL¹⁰GEL¹¹Q¹²RG¹³FN¹⁴RM¹⁵VE¹⁶GL¹⁷RER¹⁸ER¹⁹VR²⁰DL²¹FG²²RHVGR : 340

-Domäne

Cyclase-

Cg10311 : EV¹AK²RA³LE⁴ER⁵PT⁶LG⁷GED⁸DR⁹KV¹⁰AV¹¹LV¹²FD¹³VIG¹⁴ST¹⁵TF¹⁶AV¹⁷N¹⁸HT¹⁹PE²⁰EV²¹VE²²AL²³NE²⁴FF : 358
 Rv3645 : DV¹ARR²AL³ERG⁴TEL⁵GG⁶Q⁷ER⁸DV⁹AV¹⁰LV¹¹FD¹²LV¹³G¹⁴ST¹⁵QL¹⁶AAT¹⁷RP¹⁸PA¹⁹EV²⁰V²¹QL²²NE²³FF : 391
 Rv1318c : EV¹AAAA²AER³ERS⁴KL⁵GGE⁶ER⁷HV⁸AV⁹V¹⁰F¹¹D¹²IV¹³G¹⁴ST¹⁵QL¹⁶V¹⁷TS¹⁸RP¹⁹PA²⁰D²¹V²²V²³K²⁴LL²⁵N²⁶K²⁷FF : 390
 Rv1319c : EV¹AAAA²AER³ER⁴P⁵QL⁶GGE⁷DR⁸HA⁹AV¹⁰V¹¹F¹²D¹³IV¹⁴G¹⁵ST¹⁶QL¹⁷V¹⁸DN¹⁹Q²⁰PA²¹AH²²V²³V²⁴K²⁵LL²⁶N²⁷R²⁸FF : 391
 Rv1320c : EV¹AAAA²AER³ER⁴PK⁵L⁶GGE⁷ER⁸HV⁹AV¹⁰V¹¹F¹²D¹³IV¹⁴G¹⁵ST¹⁶QL¹⁷V¹⁸TS¹⁹RP²⁰AA²¹EV²²V²³M²⁴LL²⁵N²⁶R²⁷FF : 390

-Domäne

Einleitung

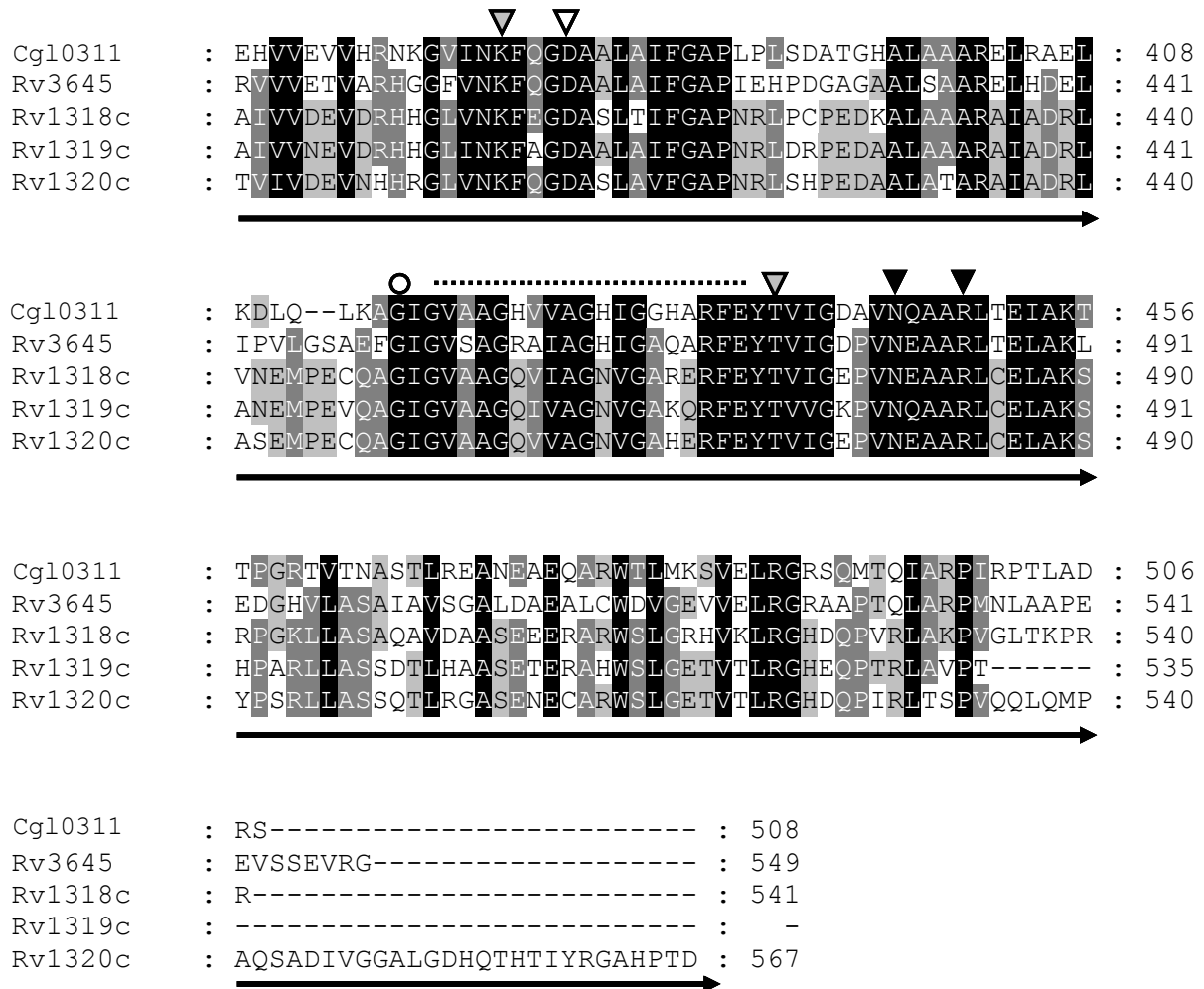


Abbildung 1-6 Alignment (Clustal W) der vier Klasse IIIb AC-Isoformen aus *M. tuberculosis* sowie der AC von *C. glutamicum*.

TM1-6: Transmembranspannen, extra/intra: Verknüpfungsbereiche, die abwechselnd cytosolisch oder periplasmatisch sind; doppelter Pfeil: HAMP-Domänen mit *a*, *d*-Anordnung der hydrophoben AS; schwarzer Pfeil: AC-Domäne. ▽: AS zur Bindung des Me²⁺-Cofaktors, ▽: Substratselektion durch Thr/Lys, ▼: Stabilisierung des Übergangszustandes durch Arg/Asn; ○: konserviertes Gly, typisch für Kl.III ACn;: Region für die Dimerenbildung (Tesmer et al., 1997), deren Länge unterscheidet sich nach Subklasse (Linder and Schultz, 2003).

Im Corynebakterium wurde ein Zusammenhang zwischen cAMP und dem Glyoxylat-Weg gefunden (Kim et al., 2004; Letek et al., 2006; Spreadbury et al., 2005). Da *C. glutamicum* nur eine einzige AC besitzt, ist es zur Klärung der Funktion der Membranregion für einen knock-out Ansatz gegenüber *M. tuberculosis* zu bevorzugen.

2. Fragestellung

Eingangs war geplant, ein Holoenzym der Klasse IIIb (*Rv3645*) und das dazugehörige lösliche Protein, bestehend aus HAMP-Domäne und Cyclase, zu isolieren (Grundlage: Dissertation Hammer, 2004). Insbesondere mit dem löslichen Protein sollten die Expressions- und Reinigungsbedingungen optimiert werden, um durch Kristallisation zu einer Struktur einer ersten HAMP-Domäne zu gelangen. Der Cyclase *Rv3645* sollte dabei die Funktion eines read-out-Systems zukommen, damit die Eigenschaften der HAMP-Domäne genauer untersucht werden konnten. Die Struktur einer HAMP-Domäne aus *A. fulgidus* wurde allerdings durch NMR schneller aufgeklärt. Hier fehlte jedoch jede Möglichkeit, die Funktion biochemisch zu charakterisieren. Deshalb wurde im Weiteren die mykobakterielle HAMP-Domäne durch die von *A. fulgidus* ersetzt. Welchen Einfluss hat HAMP *Af1503* auf die Cyclase *Rv3645*? Wie ändern sich die biochemischen Eigenschaften der AC durch Mutationen in der HAMP-Domäne? Durch Kristallisation sollte die Struktur von HAMP *Af1503* – verknüpft mit der mykobakteriellen AC *Rv3645* - gelöst werden, um die Funktion von HAMP im Zusammenspiel mit einer Effektor-Domäne zu verstehen und einen Nachweis für die Hypothese des Signalweiterleitungsmechanismus (Kap. 5.2.1) zu liefern. Dazu waren Verbesserungen der Reinigungsbedingungen erforderlich.

Um sowohl die Funktion der HAMP-Domäne in einem größeren Zusammenhang zu verstehen als auch der im weitesten Sinne unbekanntesten Funktion der Transmembranregion von Klasse III ACn nachzugehen, sollte die singuläre AC aus *C. glutamicum* kloniert werden. Diese ist den vier Holoenzymen aus *M. tuberculosis* sehr ähnlich (Abbildung 1-6). Haben die Transmembranspannen außer der eines Membranankers weitere Funktionen? Findet man bei der singulären AC aus *C. glutamicum* einen Stimulus für die sechs Transmembranspannen, der sich auf die TM-Region aus *M. tuberculosis* übertragen lässt? Könnte man den Signaltransduktionsweg dieser bakteriellen Holoenzyme verstehen, würde das zur Aufklärung einer Rezeptorfunktion von tierischen ACn beitragen.

Da der Signalweg des Serin-Rezeptors aus *E. coli* bekannt ist, konnte die Funktion der HAMP-Domäne in diesem Kontext untersucht werden. Dazu wurden Chimären des Tsr-Rezeptors kloniert, die unterschiedliche HAMP-Domänen enthielten; die Cyclase *Rv3645* wurde als read-out beibehalten. Findet die Regulation via Serin nur mit der Tsr-HAMP-Domäne statt? Ist der Tsr-Rezeptor für Serin sensitiv oder reagiert er auch auf andere AS?

Material

3. Material

3.1. Geräte

BECKMAN, München: Ultrazentrifuge *Optima L-60*, Rotor *Ti50.2*

Bender & Hobein, Ulm: *Vortex Genie 2*

Biometra, Göttingen: TRIO-Thermoblock thermocycler mit Deckel

BIO-RAD, München: Blotapparatur Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell

Biosciences GmbH, Bad Homburg: LI-COR DNA sequencer model 4000, BaseImageIR, version 4.0

Branson, Danbury (USA): Ultraschallsonde *Sonifier B-12*, Ultraschallbad *Bransonic 12*

Eppendorf, Hamburg: *Thermostat 3401* und *5320*, Thermoschüttler *5436*, Tischzentrifugen *3200* und *mini spin*, Kühlzentrifuge *5402*, *BioPhotometer*, Pipetten, Multipette, *ZK 401* Zentrifuge

Fröbel, Lindau: Consort Microcomputer Elektrophoresis Power Supply E411

GE Healthcare, Freiburg: Liquid Scintillation Counter Rackbeta 1209 (LKB), Elektrophorese-Spannungsquelle *EPS 301*, *ÄKTA-FPLC-Proteinreinigungsanlage* mit Gelfiltrationssäulen (Superdex 200 (16/60) und (10/30)), FPLC-Controller LCC500, FPLC-Fraktionssammler *Frac100*, FPLC-Pumpen *P500*, Monitor *UVM*

Gilson: Pipetten

Heidolph: MR 2002 Laborrührer

Heraeus, Osterode: Megafuge 1.0R (BS4402/A), Varifuge 3.0, Tischzentrifuge Biofuge A, Laminair HLB2448

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt: *pipetus-akku*-Pipettierhilfe

Hofer, San Francisco (USA): Gelgießapparatur *Mighty Small SE245*, zugehörige Glas-und Keramikplatten, Gellaufkammer *SE250*

H. Saur Laborbedarf, Reutlingen: Vakuumzentrifuge *Typ BA-VC-300H*

Idaho Technology (USA): Capillary Air Thermocycler 1605

INFORS AG, Bottmingen (Schweiz): Heiz-/Kühlwasserbad mit Schüttler und Thermofühler

Institutswerkstatt Tübingen: Flachbett-Gelelektrophorese-Kammern, Käme, Spacer für Gelelektrophorese

Kontron-Hermle, Gosheim: Centrikon H401, Rotoren A6.14 (SS34) und A8.24 (GSA)

KSG Sterilisatoren, Olching: Hochdruck-Dampfsterilisator *KSG 40-2-1*

LTF Labortechnik, Wasserburg: Videoprinter Mitsubishi *Video Copy Processor P91* mit Sony CCD Video Camera Modul XC-ST500E, Verbrauchsmaterial, Software BioCapt Version 99.01s

Material

Metrohm, Herisau (Schweiz): pH-Meter *E 512* und *605*

Mettler-Toledo, Steinbach: Waage *Mettler PL200*, pH-Elektrode

Millipore, Molsheim (Frankreich): Reinstwasseranlage *Milli-Q UF Plus*, *Elix 3*
(Vorreinigung), *Amicon Ultra-15*-Proteinkonzentratoren

Promega, Madison (USA): *Vac-Man* (Vakuuman schlüsse zur Plasmidpräparation), *Wizard Minicolumns* (zur Proteinreinigung)

Sartorius, Göttingen: Tischwaage *BP 2100S*, Analysenwaage *handy*, Sterilfilter 0,22µm

Scotsman: Eismaschine *AF100*

SLM Instruments, Urbana (USA): *French Press* mit Zubehör

Techne, Princeton (USA): *DRI-Block DB 2D*-Heizblöcke

Vetter, Wiesloch: UV-Kontaktlampe *Chroma 43*

Wolf, Geißlingen: *Sanoclav* Tischautoklav

WTB Binder, Tuttlingen: Kühlbrutschrank *KB 240*, Wärmeschränke

3.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

AGS, Heidelberg: Restriktionsendonukleasen mit 10x Puffern

American National Can (USA): *PARAFILM M*

AppliChem, Darmstadt: Acrylamid 4K-Lösung 30% (37,5 : 1 Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung)

Becton-Dickinson, Heidelberg: *Falcon Tubes*, Einmalspritzen

BIO-RAD, München: BIO-RAD Protein Assay-Reagenz, Ni²⁺-IDA-Agarose

Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf: Sequagel XR, Sequagel Complete Buffer Reagent, Chill Out 14 Liquid Wax von MJ Research

Dianova, Hamburg: Sekundärer Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Fc, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase

Fluka Biochemika, Buchs (Schweiz) : Formamid, Natriumdodecylsulfat

GE Healthcare, Freiburg: *ECL Plus Western Blot Detection System*,
Hyperfilm ECL, Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit, [2,8-³H]-cAMP
(1,29 TBq/mmol), *OnePhorAll-Buffer* für Restriktionsendonukleasen

Gibco-BRL-Life-Technologies, Eggenstein: LB-Agar

Greiner Labortechnik, Nürtingen: Micro-Platten mit Abdeckplatte, Petrischalen, steril

Hampton Research, Laguna Niguel (USA): Reagenzienkits zur Proteinkristallisation

Hartmann Analytik, Braunschweig: [α -³²P]-ATP

Material

ICN, Eschwege: Ethidiumbromid Tabletten

Kodak: Röntgenfilme Biomax MR

Macherey-Nagel, Düren: *Nucleotrap Kit*, Blotmembran *porablot PVDF* (2µM Porenweite)

MERCK; Darmstadt: Aluminiumoxid 90% aktiv, Ethanol, Methanol, 2-Mercaptoethanol, DMSO, Glycerol 87%, Natriumchlorid, Imidazol, Essigsäure 100%, Aminosäuren, alle nicht aufgeführten Chemikalien in p.a.-Qualität

MWG-Biotech GmbH, Ebersberg: Oligonukleotide (PCR-Primer und Fluoreszenzmarkierte Sequenzierprimer [5'-IRD 800-Markierung])

New England Biolabs (NEB), Frankfurt a.M.: Restriktionsendonukleasen mit 10x Reaktionspuffern, *T4-Polynukleotid-Kinase*, BSA 100x für Molekularbiologie, Ligase mit Puffern

Novagen, Wiesbaden: *E. coli BL21 (DE3) [pLysS]-* und *[pRep4]-*Zellen, Vektor *pET16b*

Pall Life Sciences, Ann Arbor (USA): Proteinkonzentratoren *Nanosep 10K blue*

PeqLab, Erlangen: PeqGOLD Agarose, PeqGOLD Protein Marker

Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston (USA): *Ultima Gold XR LSC-*Szintillator, Super Polyethylene Vials

Promega, Madison (USA): *Wizard Plus Plasmid Purification Kit* (Minipreps), *Pfu-DNA-Polymerase*

Qbiogene, Heidelberg: *Taq-DNA-Polymerase* mit Reaktionspuffer

Qiagen, Hilden: Expressionsvektoren, Ni²⁺-NTA-Agarose, *anti-RGS-His4-* Antikörper

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Basel: 1,4-Dithiothreitol, Restriktionsendonukleasen mit 10x Reaktionspuffern, Alkalische Phosphatase, Klenow-Polymerase, *Rapid DNA Ligation Kit*, dNTPs, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, ATP, *Complete-EDTA-free-Proteaseinhibitortabletten*

Roth, Karlsruhe: Ampicillin, Kanamycin, Glycin, Brilliantblau G250

Schleicher & Schuell, Dassel: *PROTRAN*-Blotmembran, Whatmanpaper 3MM

Serva, Heidelberg: TES, *Visking* Dialyseschlauch 8/32 (Ø 6mm) und 27/32 (Ø 21 mm)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen: APS, Glycerol 99%, MOPS, TRIS, EDTA, X-Gal, IPTG, Dowex 50WX4-400, Ponceau S, Tween 20, TEMED, LB-Agar Fertigpulver, LB Broth Fertigpulver, Xylencyanol, Harnstoff, Kanamycin, Tetracyclin, Bromphenolblau, α-Monothioglycerol, Aminosäuren, alle nicht aufgeführten Chemikalien in p.a.-Qualität

Stratagene, Heidelberg: *pBlueskriptII SK(-)*, *E. coli XL1 Blue-Zellen*

Vetter, Entringen: Eppicups, Pipettenspitzen und Plastik-Verbrauchsmaterial

Material

3.3. Plasmide

Für Klonierungszwecke wurde *pBluescript II SK (-)* (pBSKII(-)) von *Stratagene* verwendet.

Zur Expression dienten folgende Vektoren der Firma *Qiagen*: *pQE30* und *pQE31*; *pQE80 L* (4,7 kb) mit MCS wie *pQE30*, der ein zusätzliches *lacI^P*-repressor-gen besitzt; *pET16b* von *Novagen* (mit MCS von *pQE30*).

Übersichtskarten und Sequenzen der Plasmide befinden sich auf den Homepages der Hersteller.

3.4. Oligonukleotide (Primer)

3.4.1. Mycobacterium tuberculosis Rv3645

Klein: Basenabfolge. Unterstrichen, Druckbuchstaben: Schnittstellen, eingeführt.

Primer-Name	Position	Sequenz (5' - 3')	Schnittstelle
HAMP Rv3645			
Rv3645HAMPBamHIs	831	aa <u>GGA TCC</u> gcc atg tcg atc gcc gac	BamH I
Rv3645HAMPHindIIIas	990	ag <u>AAG CTT</u> cta ccg ctg ccg ctc gga	Hind III
Holoenzym-Chimären			
Rv3645-Start-s	1	aa <u>AGA TCT</u> atg gat gcc gag geg ttc	Bgl II
Myco6TMSal1Lu-as	831	aaa <u>GTC GAC</u> gcc acc aac agg gtg ct	Sal I

3.4.2. HAMP Af1503

Die Startposition ist immer das ATG der NdeI-Schnittstelle, entsprechend Met278 im Gen von *Af1503*. Basenabfolge: kleine Buchstaben. Druckbuchstaben kennzeichnen in die Sequenz eingeführte Mutationen. Schnittstellen sind unterstrichen.

Primer-Name	Sequenz (5' - 3')	Schnittstellen
Lup-HAMP-sense-neu	aaa <u>GGA TCC</u> <u>CAT ATG</u> tcg acc att acg	BamHI, NdeI, SalI
Lup-HAMP-BglII-as	aac <u>aGA tcT</u> CGC AAc <u>tcc atg</u> gcg acc ttg ag	Bgl II, NcoI
3645-ms1A-sense	aaa <u>GGA TCC</u> <u>CAT ATG</u> tcg acc att acg aga ccc ata atc gag ctg agc aac act ATc gac aag CtC gcc gaa g	BamHI, NdeI, SalI

Material

3645-ms1B-sense	aaa <u>GGA TCC CAT ATG</u> <u>tcg acc</u> att acg aga ccc Cta atc gag AtT agc aac ac	BamHI, NdeI, Sall
3645-ms1C-sense	aaa <u>GGA TCC CAT ATG</u> <u>tcg acc</u> att acg aga ccc Cta atc gag AtT agc aac act CTc gac aag	BamHI, NdeI, Sall
3645-ms1BC-antisense	aaa <u>AGA TCT CGC</u> AAc <u>tcc atg gcg</u> acc ttg agg etc ctt ctA aTc ctt tcg aGa ctc ttt gca aTa ata ccg aGt tca tca g	Bgl II, NcoI
3645-ms-2A-sense	aaa <u>GGA TCC CAT ATG</u> <u>tcg acc</u> att acg aga ccc Gea atc gag ctg agc aac act ATc gac aag	BamHI, NdeI, Sall
3645-ms-2B-sense	aaa <u>GGA TCC CAT ATG</u> <u>tcg acc</u> att acg aga ccc ata atc gag ctg agc aac act ATc gac aag	BamHI, NdeI, Sall
3645-ms-2C-sense	aaa <u>GGA TCC CAT ATG</u> <u>tcg acc</u> att acg aga ccc ata atc gag ctg agc aac act CTc gac aag	BamHI, NdeI, Sall
ms-2-Schultz-sense	aaa <u>GGA TCC CAT ATG</u> <u>tcg acc</u> att acg aga ccc ata atc gag ctg agc aac act gGc gac aag	BamHI, NdeI, Sall
3645-ms-3A-antisense	aaa <u>AGA TCT CGC</u> AAc <u>tcc atg gcg</u> acc ttg agg etc ctt etc agc ctt tcg ata ctc ttt gca aga ata ccg att tcC tca gcc ctg	Bgl II, NcoI
3645-ms-3B-antisense	aaa <u>AGA TCT CGC</u> AAc <u>tcc atg gcg</u> acc ttg agg etc ctt etc agc ctt tcg ata ctc ttt gca aga ata ccg atC tTa tca gcc	Bgl II, NcoI
3645-ms-3C-antisense	aaa <u>AGA TCT CGC</u> AAc <u>tcc atg gcg</u> acc ttg agg etc ctt etc agc ctt tcg ata ctc ttt gca aga ata ccA Ttt tca tca g	Bgl II, NcoI
3645-ms-3C-sense	aaa <u>GGA TCC CAT ATG</u> <u>tcg acc</u> att acg aga ccc aAT atc gag	BamHI, NdeI, Sall
Lup-HAMP-A291W-s	aaa <u>GGA TCC CAT ATG</u> <u>tcg acc</u> att acg aga ccc ata atc gag ctg agc aac act TGG gac aag	BamHI, NdeI, Sall
HAMP-I284A-sense	aaa <u>GGA TCC CAT ATG</u> <u>tcg acc</u> att acg aga ccc GCa atc gag ctg	BamHI, NdeI, Sall
HAMP-L315A-as	aaa <u>AGA TCT CGC</u> AAc <u>tcc atg gcg</u> acc ttg agg etc ctt ctA GCc ctt tcg at	Bgl II, NcoI
HAMP-L322A-as	aaa <u>AGA TCT CGC</u> AAc <u>tcc atg gcg</u> acc ttg agg etc ctt etc agc ctt tcg ata ctc ttt gcA GCa ata ccg at	Bgl II, NcoI
HAMP-T281A-sense	aaa <u>GGA TCC CAT ATG</u> <u>tcg acc</u> att GCT aga ccc ata	BamHI, NdeI, Sall

Material

3.4.3. *Corynebacterium glutamicum* Cgl0311

Basenabfolge: klein. Mutationen: Druckbuchstaben. Schnittstellen: unterstrichen.

Primer-Name	Position	Sequenz in 5' - 3' – Richtung	Schnittstelle
Holoenzym/-chimäre Cgl0311			
6TM-MSHRH-Bam-s	-30	aaa <u>GGA TCC</u> atg tcg cac cgg cac gtt aga	BamH I
6TM-lo-BamHI-s	-366	aaa <u>GGA TCC</u> atg gcg gcg cgg caa tcc	BamH I
6TM-sh-BamHI-s	1	aaa <u>GGA TCC</u> atg agt cga ttg ctt aga	BamH I
Sall-HAMP-AC-s	744	aaa <u>GTC GAC</u> ccg att cgg gaa ctt cag	Sal I
6TM-HAMP-Sall-as	744	aaa <u>GTC GAC</u> cac aga gga cac cac	Sal I
Cg6TMSallLup-as	732	aaa <u>GTC GAC</u> acc aca agc cgg ttg	Sal I
HAMP-AC Cgl0311			
Cg-BamHI-HAMP-s	735	aaa <u>GGA TCC</u> tcc tct gtg <u>gtC gaC</u> ccg att	BamHI/Sall
Cg-HAMP-BglII-as	894	aaa gaa a <u>AG ATC T</u> cg gac gcg ctg	Bgl II
AC-Cgl0311			
Cg-AC-BglII-s	897	aaa gtc cg <u>A gaT</u> ctt ttc ggt cgc	Bgl II
BglII-knockout-s	1218	gag ctg aag gat ctc cag ctc aag	knockout
BglII-knock-as	1242	ctt gag ctg gag atc ctt cag ctc	knockout
Cg-AC-HindIII-as	1527	aaa <u>AAG CTT</u> tta gga cct atc cgc caa	Hind III
linker-Austausch			
Cglink-EcoRV-s	819	aaa <u>gat atC</u> tat gat ggc gat gaa atc ggt att ctt	EcoR V
Cglink-EcoRV-as	810	aaa <u>Gat atc</u> aac ctg cac atc gtt ttc tcc ttc ggc aat ctt gtc	EcoR V
LuplinkerStuI-s	912	aaa <u>AGG ccT</u> cac cag aac agg gct tct gag atc ggt gtg ctt	Stu I
LuplinkHpaI-as	909	aaa <u>GTT aac</u> ctc agc ctc aag gtt acc acg acg aac cct gtt	Hpa I
Rv3645-HindIII-as (Bestand: A. Hammer)	1650 (<i>M.tub.</i>)	aaa <u>AAG CTT</u> CGA cta gcc gcg tac ttc	Hind III

Material

3.4.4. Sequenzierprimer

Name	Richtung	T _{annealing}	Sequenz in 5' - 3' - Richtung	Plasmid
T3	s	56°C	aat taa ccc tca cta aag gg	pBSKII(-)
T7	as	56°C	taa tac gac tca cta tag gg	pBSKII(-)
U-pQE-IR	s	54°C	gaa ttc att aaa gag gag aaa	pQE 30
R-pQE-IR	as	54°C	cat tac tgg atc tat caa cag g	pQE 30

3.5. Puffer und Lösungen

3.5.1. Stammlösungen

Die Lösungen wurden mit *MilliQ* Wasser hergestellt und autoklaviert (121°C, 20min, 2bar).

1M Imidazol-HCl pH 8.0
1M Tris/HCl pH 8.0 (pH 7.0/7.5/8.5)
0.5M EDTA pH 8.0
5M NaCl
1M MgCl₂

3.5.2. Molekularbiologie

3.5.2.1. Puffer und Lösungen für DNA-Arbeiten

TAE-Puffer

40 mM Tris/Acetat pH 8.0
1 mM EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 7.5
0.2 mM EDTA

BX-Probenpuffer (Agarosegele)

1x TAE-Puffer
5% Glycerol
0.5% Bromphenolblau
0.5% Xylencyanol

10xTBE-Puffer(LI-COR)

440 mM Borsäure
1.34 M Tris
25 mM EDTA

10xCM

100 mM MgCl₂
100 mM CaCl₂

dNTPs

20 mM pro dNTP für den Mix

Material

10xDephosphorylierungspuffer

500 mM Tris/HCl pH 8.5
1 mM EDTA

10xKlenowpuffer

200 mM Tris/HCl pH 7.9
60 mM MgCl₂
10 mM Dithiothreitol
5% BSA, frisch zugeben

3.5.2.2. Medien für *E. coli*

LB-Medium

20g/l LB-Broth-Pulver

LB-Medium mit Antibiotika

100µg/ml Ampicillin und/oder
50µg/ml Kanamycin oder
10µg/ml Tetracyclin

LB-Plattenagar

35g/l LB-Agar-Pulver

LB-Plattenagar mit Antibiotika

100µg/ml Ampicillin und/oder
50µg/ml Kanamycin oder
10µg/ml Tetracyclin

LB-Medium für Dauerkulturen

20g/l LB Broth-Pulver
40% Glycerol (87%)

3.5.2.3. Medium für *C. glutamicum*

Nährmedium für die Aufzucht

1% Casein-Tryptone
0.5% Hefe-Extrakt
0.5% Glucose
0.5% NaCl

3.5.3. Proteinbiochemie

3.5.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Trenngelpuffer

1.5M Tris/HCl pH 8.8, 0.4% SDS
0.4% SDS

Sammelgelpuffer

500mM Tris/HCl pH 6.8
0.4% SDS

Material

Hoefer-Laufpuffer(10x)

250mM Tris
1.92M Glycin
1% SDS

4xProbenpuffer

130mM Tris/HCl pH 6.8
10% SDS
10% β -Mercaptoethanol
20% Glycerol
0.06% Bromphenolblau

Coomassie-Färbelösung

40% Methanol
1% Essigsäure
0.2% Coomassie-Brilliant Blau G 250

Entfärber

7.5% Essigsäure
30% Ethanol

3.5.3.2. Suspensions-und Lysispuffer für Zellen, Reinigungspuffer für Proteine

DNase I (aus Pankreas)

2mg/ml Tris/HCl pH 8.0 (10mM)
10% Glycerol

Lysozym (aus Hühnereiweiß)

40mg/ml Tris/HCl pH 8.0 (10mM)
10% Glycerol

Suspensions-Puffer für Zellen

50mM Tris/HCl pH 8.0
1 mM EDTA

Lysis-Puffer

50mM Tris/HCl pH 8.0
2mM Thioglycerol
10% Glycerol (87%)

Waschpuffer A: Hochsalz

50mM Tris/HCl pH 8.0
2mM Thioglycerol (0,02%)
10% Glycerol (87%)
15mM Imidazol
250mM NaCl
5mM MgCl₂

Waschpuffer B: Niedersalz

50mM Tris/HCl pH 8.0
2mM Thioglycerol
10% Glycerol (87%)
15mM Imidazol
5mM MgCl₂

Waschpuffer A-neu

analog Waschpuffer A, ohne Imidazol

Waschpuffer B-neu

analog Waschpuffer B, ohne Imidazol

Elutionspuffer C

50mM Tris/HCl pH 8.0
2mM Thioglycerol
10% Glycerol (87%)
250mM Imidazol
2mM MgCl₂

Material

3.5.3.3. Suspensions-und Lysispuffer für Membranproteine

Zellsuspensionspuffer

50mM Tris/HCl pH 8.0
2mM Thioglycerol (0,02%)

Membranpuffer

40mM Tris/HCl pH 8.0
1.6mM Thioglycerol (0,16%)
20% Glycerol(87%)

3.5.3.4. Puffer zur Vorbereitung für die Kristallisation

Dialysepuffer 1

10mM Tris/HCl pH 7.5
2mM MgCl₂
2mM Thioglycerol (0,02%)
10% Glycerol (87%)

Dialysepuffer 2

50 mM Tris/HCl pH 8.0
2mM MgCl₂
2mM Thioglycerol (0,02%)
10% Glycerol(87%)
10mM EDTA
2mM DTT

FPLC-Puffer (filtriert,entgast)

50mM Tris/HCl pH 8.0
100mM NaCl₂
2mM MgCl₂
2mM Thioglycerol (0,02%)
10% Glycerol (87%)

3.5.3.5. Western-Blot

TBS

20mM Tris/HCl pH 7.6
0.8% NaCl

M-TBS-T

5% Milchpulver in TBS-T-Puffer

TBS-T

0.1% Tween 20 in TBS-Puffer

primäre Antikörper

RGS-(His)₄-Antikörper

(monoklonal)Maus

Verdünnung: 1:1000 in M-TBS-T

His₄-Antikörper

(monoklonal)Maus

Verdünnung: 1:1000 in M-TBS-T

Towbin-Transferpuffer

25mM Tris
192mM Glycin
20% Methanol

sekundärer Antikörper

Ziege-anti-Maus-Antikörper

polyklonal, mit konjugierter Meerrettich-Peroxidase

Verdünnung: 1:5000 in M-TBS-T

Material

3.5.3.6. Lösungen für AC-Assay

2X AC-Cocktail

50% Glycerol (87%)
0.1 M Tris/HCl pH 8 (weitere Puffer s.pH-
Abhängigkeit)
6mM MnCl₂
4mM [2.8-³H]-cAMP (1.64x10⁶Bq/mmol)

1.5X AC-Stoppuffer

3mM cAMP
3mM ATP
1.5% SDS

für Membranpräparationen und ungereinigte Zellhomogenate:

regenerierendes System, zusätzlich im Cocktail

6mM Kreatinphosphat (Stammlösung 120mM in 50mM Tris/HCl pH7.5)
0.46mg/ml Kreatinkinase (Stammlösung 1mg in 217µl (10mM)Tris/HCl pH 7.5)

ATP-Substratlösungen 10x

10mM ATP pH 7.0

Verdünnungen für die Kinetik:

5mM ATP pH 7.0

2mM ATP pH 7.0

4. Methoden

4.1. Gentechnologische Methoden

4.1.1. Plasmidisolierung aus *E. coli* (Miniprep)

5ml LB-Flüssigmedium mit geeigneten Antibiotika wurde mit einer *E. coli* Kolonie oder ca. 5µl Dauerkultur angeimpft und unter Schütteln mit 220rpm über Nacht bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden 3-5ml abzentrifugiert und das Plasmid wurde nach Herstellerprotokoll des *Wizard-Plus-Plasmid-Purification-Kits* isoliert und gereinigt (Mini-Prep). Die DNA wurde mit 50µl Wasser oder TE-Puffer eluiert und bei -20°C gelagert.

4.1.2. Trennung und Detektion von DNA mit Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurde mit 1/5 Volumen mit BX-Puffer versetzt und auf ein Agarosegel geladen, das je nach erwarteter Trennleistung 1 bis 2,5%ig war. Elektrophorese erfolgte bei 80-100V, 70-90mA für 45-60min in TAE-Puffer, anschließend wurde das Agarosegel 1-2 min in ein Ethidiumbromidbad (0,01mg/ml) gelegt. Nach weiteren 10 min Elektrophorese wurden die Banden unter UV angesehen und über ein Videoprintersystem dokumentiert. Man kann vereinfacht auch 1µl Ethidiumbromid zur Herstellung des Agarosegels geben, das Gel ist dann sofort unter UV-Licht auswertbar. Zur Größenbestimmung der Banden dienten der λ-Marker (*EcoRI/HindIII* verdaute λ-DNA) und π-Marker (*MspI/SspI* verdautes *pBSK II(-)*-Plasmid).

4.1.3. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *NucleoTrap-Kit* nach Herstellerprotokoll gereinigt. Eluiert wurde mit 20µl Wasser, die gereinigten DNA-Fragmente wurden bei 4°C gelagert.

Sollten DNA-Lösungen umgepuffert werden oder von zum Verdau benötigten Puffern befreit werden, wurde dies ebenfalls mit dem *NukleoTrap-Kit (Concentration and desalination of DNA fragments)* erledigt.

4.1.4. Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde in Quarz - Küvetten bei 260nm photometrisch bestimmt.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$c = E_{260} \cdot f \cdot \text{Verdünnung} \quad (f = 0,02 \text{ bei Einzelstrang-, } f = 0,04 \text{ bei Doppelstrang-DNA).$$

Durch gleichzeitige Messung bei 280nm ergeben sich Aussagen über die Reinheit der DNA.

Das Verhältnis $E_{260\text{nm}} / E_{280\text{nm}}$ sollte über 1,8 liegen, um eine ausreichende Sauberkeit der DNA zu gewährleisten.

Methoden

Zur ungefähren Abschätzung von DNA-Mengen diente auch ein Intensitätsvergleich von Ethidiumbromid-gefärbten Banden mit dem Marker (s. 4.1.2).

4.1.5. Restriktionsverdau

Analytische Verdaue (100-300ng DNA) wurden entsprechend Herstellerangaben in 10µl mit 1 – 4U (0,2µl) der jeweiligen Restriktionsenzyme angesetzt und für 1 bis 1 ½ h verdaut. Für präparative Zwecke wurden ca. 1µg DNA in 20µl mit 2 - 6U Restriktionsenzym für zwei Stunden verdaut, anschließend wurden nochmals frisches Enzym und entsprechende(r) Puffer (in 5µl) zugegeben und für weitere 1 – 2 Stunden verdaut. Durch den zweifachen Verdau standen so die einzelnen Fragmente direkt für eine Ligation in einen nach derselben Methode behandelten Expressionsvektor zur Verfügung.

4.1.6. Glätten von überhängenden Enden

Falls erforderlich wurden überhängende DNA-Enden mit Klenow-Fragments geglättet. Reaktionsansatz: 1-2µg DNA, 0,8µl Klenow-Fragment (1U/µl), 1µl Klenowpuffer (10x) in 10µl. Nach dem Mischen wurde 10min bei 37°C inkubiert (Abbau der 3'-Überhänge), dann wurde 1µl dNTPs (Endkonzentration je 2mM) hinzugefügt (zum Auffüllen von 5'-Überhängen) und weitere 40min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms durch Hitzeschock bei 70°C für 10min.

4.1.7. 5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten

Geglättete Enden von PCR-Produkten müssen vor einer Ligation in einen dephosphorylierten Vektor am 5'-Ende phosphoryliert werden. Also wurde der Klenow-Ansatz aus 4.1.6 mit *T4-Polynukleotidkinase* (PNK) inkubiert: 10µl Klenow-Ansatz, 1,5µl Kinase-Puffer (10x), 1,5µl ATP (10mM), 0,7µl (10U) T4-PNK in 15µl (37°C, 60min).

4.1.8. 5'-Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden

Die 5'-Dephosphorylierung eines verdauten Plasmids wurde mit *Alkalischer Phosphatase* durchgeführt, um eine Religation des Vektors auszuschließen: dazu wurden 1U alkalische Phosphatase und 1µl zugehöriger Puffer (10x) pro 10µl Ansatz direkt zum Restriktionsverdau hinzugefügt (oder nach dem Verdau, je nach Kompatibilität der Puffer; 1h, 37°C). Der Vektor wurde über Gelelektrophorese gereinigt.

Methoden

4.1.9. Ligation von DNA

Ligationen von Inserts in Klonierungs-oder Expressionsvektoren erfolgten mit dem *Rapid-DNA-Ligation-Kit* nach Angaben des Herstellers. Standardmäßig erfolgten zwei Ansätze: im Verhältnis 1 : 1 (Vektor : insert) und 1 : 3, wobei üblicherweise 50ng Vektor-DNA eingesetzt wurde (Konzentrationsbestimmung nach 4.1.4). Reaktionszeit: 20-25min bei RT.

4.1.10. Polymerase-chain-reaction (PCR)

Um DNA-Fragmente in Genen auszutauschen, war häufig die Einführung neuer geeigneter Schnittstellen nötig. Daher enthalten die primer in der Regel entsprechende Restriktionssequenzen. Auch gezielte Punktmutationen sowie mehrere zu mutierende Basen lassen sich durch die primer einführen (Mullis and Faloona, 1987). Die Anlagerungstemperatur eines primers (annealing temperature) wird über folgende Formel bestimmt:

$$T_{annealing} [^{\circ}\text{C}] = 4 \cdot (\text{GC}) + 2 \cdot (\text{AT}) \quad \text{GC} = \text{Anzahl bindende GC-Basenpaare}$$

$$\text{AT} = \text{Anzahl bindende AT-Basenpaare}$$

Sollten sich die $T_{annealing}$ der primer unterscheiden, wurde mit der niedrigeren Temperatur gearbeitet. Ein PCR – Ansatz (50 μ l) besteht aus:

1 – 10ng Plasmid-DNA (template)

je 200 μ M aller vier dNTPs

0,5 μ M je primer

1U *Taq* bzw. 1,75U *Pfu*-Polymerase

5% DMSO (bei sehr GC-reichen DNA-Substraten)

PCR – Puffer

Übliches Temperaturprogramm:

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95°C	5 min
Denaturierung	95°C	1min
Annealing der primer	T _m	1min
Elongation	72°C	1min
Elongation (Auffüllen unfertiger Produkte)	72°C	10min
Reaktionsende	4°C	∞ (Pause)

Es wurden 25-30 Zyklen gefahren. Bei einer Fusions-PCR wurde ein Temperaturgradient eingebaut, d.h. die ersten 5 Zyklen fanden bei $T_{anneal} - 5^{\circ}\text{C}$ statt. Für ein schnelleres Ergebnis

Methoden

bei einer Fusions-PCR oder mit sehr kurzen primern wurde eine Heißluft – PCR durchgeführt, wobei der oben angeführte Ansatz portionsweise in 10µl – Glaskapillaren hineingeschmolzen wurde. Programm: $T_{\text{Denaturierung}} = 94^{\circ}\text{C}$, 30sec (*Programm 4*), dann folgt *Programm 1* mit $T_{\text{Denaturierung}} = 94^{\circ}\text{C}$, 10sec, $T_{\text{annealing}}$ mit 10sec, $T_{\text{Elongation}} = 68^{\circ}\text{C}$, 100sec, und das Ende mit *Programm 5* bei RT. PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel analysiert, ausgeschnitten und wie beschrieben aufgereinigt.

4.1.11. Sequenzierung von DNA

Die Didesoxy-Methode nach Sanger wurde angewendet (Sanger et al., 1977). Dazu wurde der *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit* verwendet, von dem je 2µl Reaktionslösung (bestehend aus dem jeweiligen ddNTP, dNTPs, Reaktionspuffer mit Mg^{2+} und DNA-Polymerase) in 0,2ml PCR caps vorgelegt wurde. Dazu kam ein Mix (3µl) aus:

Miniprep – DNA (7µl bei pBSKII(-); 11,3µl bei Expressionsvektoren)

0,7µl DMSO

1µl fluoreszenzmarkierter Sequenzierprimer (3pmol/µl)

Wasser ad 13µl

Nach gründlichem Mischen wird der Ansatz mit 10µl Chill out 14 Liquid Wax überschichtet, kurz zentrifugiert und die Reaktion im *TRIO-Thermocycler* für 0,2ml caps gestartet:

Reaktionsschritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer [sec]	Zyklen
1. Denaturierung	95	120	
2. Denaturierung	95	20	30
Primer-Anlagerung	$T_{\text{annealing}}$	20	
Elongation	72	30	
Ende	4	∞	

Für den *T3*, *T7* und die U- und R-pET(MCS-pQE30) primer wurde $T_{\text{annealing}} = 56^{\circ}\text{C}$ benötigt, für den U-pQE – und R-pQE – primer $T_{\text{annealing}} = 54^{\circ}\text{C}$.

Nach Beenden der Reaktion wurden 6µl Stopp-Puffer zur Denaturierung der DNA zugegeben. Danach wurden die Proben auf ein 6%iges Polyacrylamidgel zur elektrophoretischen Auftrennung aufgeladen (ca. 1-1,2µl Probe). Die Elektrophorese erfolgte bei 50°C , 50W, 37mA (maximale Spannung 1500 V) im *LI-COR DNA Sequencer*. Die durch Laserfluoreszenz bei 700nm sichtbar gewordenen Banden wurden mit der *BaseImageIR version 4.0* Software ausgewertet.

Methoden

4.2. Mikrobiologische Methoden

4.2.1. Herstellung kompetenter *E. coli*

Die Aufnahmefähigkeit von *E. coli*-Zellen für Plasmide wird durch Behandlung mit CaCl_2 gesteigert. Dazu wird eine 1ml-Übernachtskultur in 100ml LB-Medium überimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,3-0,4 angezogen (ca. 3h). Es folgt Kühlung auf Eis für 10min, die Zellen werden dann abzentrifugiert (2000xg, 10min, 4°C), in 50ml eiskaltem CaCl_2 -Puffer (100mM) vorsichtig suspendiert und für 20min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde das Zellpellet in 50ml CaCl_2 -Lösung (50mM) und 20% Glycerol aufgenommen. Nach 2 Stunden auf Eis wurden Aliquots von 100 μl kompetenter Zellen bei -80°C eingefroren.

4.2.2. Standardtransformation von *E. coli*

Ein Ligationsansatz mit Plasmid-DNA wurde mit 10 μl CM-Puffer (10x) versetzt und mit Wasser auf 100 μl aufgefüllt. Nach Zugabe dieser Mischung zu 100 μl kompetenten Zellen (leicht angetaut) und kurzem Mischen wurde der Ansatz für mindestens 20min auf Eis gestellt, anschließend bei 42°C für genau 60sec einem Hitzeschock unterzogen und dann weitere 10min auf Eis gehalten. Es folgte die Zugabe von 500 μl sterilem LB-Medium (ohne Antibiotika) und Inkubation (220rpm, 37°C , 45min). 100-300 μl dieses Ansatzes wurden auf antibiotikahaltige LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert, der restliche Ansatz wurde gegebenenfalls in LB-Flüssigmedium angezüchtet.

4.2.3. Schnelltransformation von *E. coli*

Zur Retransformation von bereits vorhandenen Mini-Preps wurden 100 μl kompetente Bakterienzellen (leicht angetaut) mit 100-200ng Plasmid-DNA (ca. 0,5-1 μl aus Mini-Prep) gemischt und 10min auf Eis gestellt, für 60sec bei 42°C hitzegeschockt und weitere 10min auf Eis gehalten. Anschließend wurden 20-100 μl des Ansatzes auf antibiotikahaltige LB-Platten ausgestrichen und bei 37°C mind. 12h inkubiert.

4.2.4. Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen

Zur Konservierung transformierter Zellen wurden Dauerkulturen angelegt: 600 μl einer Übernachtskultur wurden auf 400 μl Glycerol gegeben, vorsichtig gemischt und sofort bei -80°C eingefroren.

4.2.5. Blau-Weiß-Screen

Zur Unterscheidung von inserthaltigem pBlueskriptII SK(-) und von Religaten ohne insert wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. XL1blue-Zellen wurden auf Agarplatten

Methoden

ausgestrichen, die vorher mit 40µl IPTG (0,1M) und 40µl X-Gal (2%) behandelt wurden. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht erscheinen weiße Klone, die das rekombinante Plasmid enthalten, und blaue Klone, die nur religierten Vektor beinhalten.

4.3. Proteinbiochemische Methoden

4.3.1. Proteinbestimmung

Es wurde das *BIORAD Protein Assay*-Reagenz nach Herstellerangaben verwendet (Proteinlösung in 800µl Wasser plus 200µl Reagenz). Nach 5min wurde bei 595nm gemessen (Eichkurve mit 2,4,6,8,10 und 12µg BSA).

4.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden aufgrund ihres Molekulargewichtes (MW) mit der diskontinuierlichen SDS-PAGE-Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970) getrennt. Dabei wählt man je nach MW des Proteins verschiedenprozentige Trenngele (bis 30kDa 15%, ab 30kDa 12,5%). Nachfolgend die Rezeptur für 2 Mini-Gele:

Sammelgel, pH 6,8 ,	4,5%	Trenngele, pH 8,8	12,5%	15%
Sammelgelpuffer	1 ml	Trenngelpuffer	3 ml	3 ml
Wasser	2,4 ml	Wasser	4 ml	3 ml
Acrylamid-Fertiglösung ¹	0,6 ml	Acrylamid-Fertiglösung	5 ml	6 ml
TEMED	10 µl	TEMED	80µl	80µl
10% APS	40 µl	10% APS	10µl	10µl

Die Proteinproben wurden mit 4x Probenpuffer gemischt, und bei 95°C für 5min denaturiert (letzteres nur für lösliche Proteine). Das Gel wurde in einer Vertikal-Elektrophoreseeinheit *Hoefer Mighty Small* befestigt, diese mit Laufpuffer befüllt, dann wurden die Proben (wenn nötig mit Taschenfindehilfe) aufgetragen. Elektrophorese bei 20mA (pro Gel) und maximal 200V, bis die blaue Lauffront gerade das Gel verlässt. Gele wurden entweder für Western-Blots weiterverwendet oder in *Coomassie Brilliant Blue* für mind. 25min gefärbt. Nach Entfärben in Coomassie-Entfärber (20min) waren die Proteinbanden sichtbar. Zum Größenvergleich dienten:

¹ 37,5 : 1 Acrylamid/Bisacrylamid Fertiglösung 30%

Methoden

Protein	Herkunft	Molekulargewicht
β -Galaktosidase	E. coli	116 kDa
BSA	Rinderserum	66,2 kDa
Ovalbumin	Hühnereiweiß	45 kDa
Lactat-Dehydrogenase	Schweinemuskel	35 kDa
RE <i>Bsp98I</i>	E. coli	25 kDa
β -Laktoglobulin	Kuhmilch	18,4 kDa
Lysozym	Hühnereiweiß	14,4 kDa

Zum Schluss wurden die Gele mit der *Biocapt Software* dokumentiert.

4.3.3. Western Blot

Der immunochemische Nachweis der Proteinbanden erfolgt nach elektrophoretischer Übertragung vom SDS-PAGE-Gel auf eine PVDF-Membran (blotting) und mit spezifischen Antikörpern. Verwendet wurde die Methode des Semi-Dry-Elektrotransfers nach Towbin (Towbin et al., 1979). Die Blot-Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für 10min in Methanol eingeweicht, anschließend wurde 10min mit Wasser gewaschen und 10min in Towbin-Puffer gelegt. Das zu blottende SDS-Gel wurde zusammen mit 6 Streifen Whatman-Papier der Größe 6 x 9cm ebenfalls kurz in Towbin-Puffer gelegt. In die Blotapparatur wurden sandwichartig zuerst 3 Lagen Whatman-Papier auf die Anode gelegt, dann die Membran, obenauf das SDS-Gel und zum Bedecken nochmals 3 Lagen Whatman-Papier, luftblasenfrei. Die Elektrophorese erfolgte bei 20V, 200mA für 3-3,5h. Zur Erfolgskontrolle wurde das SDS-Gel in *Coomassie* nachgefärbt. Auf der Blot-Membran wurden die Markerbanden mit einem Bleistift markiert. Dann wurde in Blockierpuffer für 1h bei RT oder ü.N. (4°C) eingelegt. Es folgte: Entfernen des Blockierpuffers durch zweimaliges Schwenken in TBS-T für ca. 2min, Zugabe des primären Antikörpers (AK) und Inkubation für 1h, Waschgang mit TBS-T: kurz schwenken, dann 1x15min schütteln, danach 2x5min schütteln. Zugabe des sekundären AK und ebenfalls Bindung für 1h, anschließend waschen wie o.a. Die AK-Lösungen können zwei- bis dreimal wieder verwendet werden (Aufbewahrung bei 4°C). Die Detektion der gebundenen AK erfolgte mit *ECL Plus Western Blot Detection System* nach Herstellerangaben. Nach der vorgeschriebenen Inkubationszeit wurden *ECL-Hyperfilme* belichtet, die Expositionszeit variierte zwischen 5sec und 2min.

Methoden

4.4. Proteinexpression

Um ein Konstrukt zu exprimieren wurde aus einer Dauerkultur eine LB-Vorkultur angeimpft, versehen mit Ampicillin (100µg/ml) und Kanamycin (50µg/ml). Das Volumen der Vorkultur sollte etwa 5% des Expressionsvolumens entsprechen. Die Vorkultur wurde ü.N bei 37°C und 220rpm angezüchtet und am nächsten Tag in die vorgewärmten Kolben mit LB-Medium (plus entsprechende Antibiotikazusätze) überimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 wurde auf die gewünschte Expressionstemperatur gebracht und mit IPTG induziert. Je nach Expressionstemperatur (20°-30°C) variierten die Expressionszeiten von 5–20 Stunden. Kritisch zu exprimierende Konstrukte (Corynebakterium) wurden in den pET16b (MCS[pQE30])-Vektor kloniert und in BL21(DE3)[pLysS]-Zellen exprimiert. Diese besitzen eine verstärkte Kontrolle der Expression und Unterdrückung der Hintergrundexpression; die Transkription des Zielgens wird hier über einen T7-Promoter gesteuert. Dieser wird nur von der T7-RNA-Polymerase erkannt, nicht von *E. coli*-Polymerasen. Der zugehörige lac-Operator ist durch den lac-Repressor blockiert (codiert durch ein lacI-Gen auf pET16b und im Wirtsgenom). Dadurch wird sowohl die direkte Expression des Zielgens als auch die Expression von T7-RNA-Polymerase verhindert. Die zur Expression nötige T7-RNA-Polymerase ist in den Expressionszellen codiert. Auf dem zusätzlichen pLysS-Plasmid wird das T7-Lysozym codiert, das ein natürlicher Inhibitor der T7-Polymerase ist. Erst bei Induktion mit IPTG wird eine Expression möglich: der Repressor des lac-Operators vor dem T7-Gen wird inaktiviert und die Expression von T7-Polymerase wird gestartet. Gleichzeitig wird auch der lac-Operator vor dem Zielgen freigegeben und eine (Über)expression kann stattfinden.

4.5. Zellernte

Zur Ernte wurde in Portionen à 200ml bei 4°C, 3200xg für 10 min abzentrifugiert. Dabei wurden immer 2 bis 3 Portionen in *einem* Metallbecher gesammelt. Anschließend wurde das Pellet in 50ml Pellet-Wasch-Puffer resuspendiert (Metallspatel) und in ein Falcon-Tube überführt. Nach Abzentrifugieren in der *Hereaus Megafuge* bei 5500rpm, 15min, 4°C wurden die erhaltenen Zellpellets bei -80°C gelagert.

Methoden

4.6. Zellyse

Die bei RT angetauten Zellen wurden mit 20 - 30 ml Lysispuffer durch Zerdrücken mit dem Metallspatel und Vortexen resuspendiert. Es wurde im anschließenden Lyse-Schritt zunächst mit Ultraschall behandelt (3x10sec, höchste Stufe) und anschließend nacheinander 0,2 mg · ml⁻¹ Lysozym und 5mM MgCl₂ mit 10µg · ml⁻¹ DNaseI zugegeben und für jeweils 30min inkubiert.

Anstelle der Behandlung mit Ultraschall/Lysozym/DNase wurde die Zellsuspension mit der *French Press* (Druck ≥ 1000 psi) aufgeschlossen (2-3mal hintereinander).

An beide Verfahren schließt sich eine Zentrifugation bei 48 000xg für 45min (4°C) an (Abtrennung der Zelltrümmer, inclusion bodies, weitgehende Entfernung von Membranbestandteilen). Der Überstand mit löslichen Proteinen wurde zur Reinigung eingesetzt.

4.7. Proteinreinigung durch Ni²⁺-NTA- und Profinity-IMAC Affinitätschromatografie

Da sämtliche Expressionskonstrukte mit einem N-terminalen Hexa-His-Tag versehen waren, erfolgte die Proteinreinigung über Ni²⁺-NTA (Qiagen; *The QIAexpressionist*, 5th edition, June 2003). Im Gegensatz dazu ist der funktionelle Ligand der Fa. BioRad iminodiacetic acid (IDA) mit drei zur Chelatbildung verfügbaren Bindungsstellen (Porath et al., 1975). Da die divalenten Nickelionen immobil an der Chelatoberfläche verbleiben und die HisTag-Proteine affin zu diesem Material sind, nennt man diese Technik IMAC: immobilized metal affinity chromatography. Der lösliche Proteinüberstand (200ml Bakterienkultur ergeben eine Portion à 20ml) wird mit 250mM NaCl, 15mM Imidazol und 250µl Nickelharz (Qiagen) versetzt und für zwei bis drei Stunden auf Eis leicht geschüttelt. Das Affinitätsmaterial wird entfernt (1100xg, 5 min, 4°C), mit Waschpuffer A aufgenommen und in eine Spritze überführt, an die zuvor eine mit Lysis-Puffer voräquilibrierte Mini-Prep-Säule (aus dem *Wizard Plus Purification Kit*) geschraubt wurde. Es wurde zweimal mit 10ml *Hochsalzpuffer* (A) und einmal mit 5ml *Niedrigsalzpuffer* (B) gewaschen und mit 0,6ml *Elutionspuffer* (C) *langsam* eluiert. Das Eluat wurde nochmals auf die Säule aufgetragen, um noch nicht gebundenes Protein zu eluieren. Zur sofortigen Lagerung bei -20°C wurde 40% Glycerol zugesetzt. Vor einer Gelchromatografie musste die Probe dialysiert werden (4.10.1).

Methoden

4.8. Säulenchromatografie

Das Elutionsprofil wurde bei 280nm aufgenommen. Es wurden folgende Säulen eingesetzt:

Säulenmaterial	Superdex 200 (10/30)	Superdex 200 (16/60)
Säulenvolumen	24 ml	120 ml
Flussrate	0,4 ml/min	1ml/min
Äquilibrierung	30ml	240ml
Auftrag	200µl Probe	3-4ml Probe (über super-loop)
Maximaldruck	1,5 MPa	0,5 MPa
Fraktionsgröße	0,5 ml	1 ml

Die Säulen wurden mit Markern geeicht (s. Kapitel 5.4.2). Eine *Superdex 75* (PC 3,2/30) wurde für Versuche mit geringen Proteinmengen verwendet (s. 5.4.3).

4.9. Membranpräparation

Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden in Zellsuspensionspuffer suspendiert und einmal durch die *French Press* (1200psi) gedrückt. Das Homogenat wurde zentrifugiert (3000xg, 30min, 4°C). Der Überstand wurde für 1h bei 100 000xg, 4°C in der *UZ* zentrifugiert (Ti 50.2 Rotor). Der glasig-gelbe Niederschlag wurde in 0,5–1ml Membranpuffer aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Grobe Bestandteile wurden bei 10000rpm abgetrennt (Epicap). Die Membransuspension wurde für Folgeexperimente eingesetzt.

4.10. Kristallisation

4.10.1. Konzentrieren

Das Affinitäts-gereinigte Protein wurde bei 4°C dialysiert (3.5.3.4); 1ml Protein/100ml Puffer. Die Proteinlösung wurde in einen mit Wasser befeuchteten Dialyse-Schlauch gefüllt (bis 10ml: Ø 6mm; ab 10ml: Ø 21mm), mit zwei Klammern verschlossen und unter Rühren ü.N. dialysiert. Dabei wurde Imidazol zu 99% entfernt und die Glycerolkonzentration auf 10% verringert. Nach der Dialyse wurde die Proteinkonzentration erneut bestimmt.

Die Konzentration erfolgte volumenabhängig mit Vivaspin-Konzentratoren (Fassungsvermögen 2ml, Ausschlussgröße 10kDa), und/oder Amicon Ultra Filtern (Fassungsvermögen 15ml, Ausschlussgröße 5kDa) bei 4200rpm in der *Heraeus* bei 4°C. Proteine wurden auf 2–10 mg/ml aufkonzentriert. Vor dem Befüllen mit neuer Proteinlösung wurde immer wieder aufgewirbelt (mit einer Pipette) um zu vermeiden, dass Protein den

Methoden

Filter verklumpt. Der Verlauf der Filtration wurde durch Probennahme und Proteinbestimmung überwacht. Die portionsweise erhaltenen Konzentrate wurden am Ende vereinigt.

4.10.2. Kristallisation

Es wurde die "hanging drop"-Methode angewendet (Abbildung 4-1). Die Zusammensetzung der Reservoirolösung muss empirisch bestimmt werden. Man startet am Besten mit einigen hundert Standardmischungen, die sich in der Literatur für vergleichbare Proteine als erfolgreich erwiesen haben. Solche Standards enthalten zumeist einen pH – Puffer (0,1M), ein Fällungsreagenz (Hochsalz, Polyethylenglykole, organische Lösungsmittel), sowie gegebenenfalls Adjuvantien (z.B. Salzzusätze (ca. 0,2M) zu PEG oder PEG (2-10%) zu Hochsalz). 1µl aus dem jeweiligen Puffer-Reservoir mischt man mit 1µl des konzentrierten Proteins auf einem Deckgläschen und legt dieses anschließend mit dem Tropfen nach unten hängend auf das 500µl Puffer-Reservoir. Ergeben sich Kristalle (Mikroskopie) werden die Pufferbedingungen optimiert; dabei ergibt sich ein Spielraum für pH, Temperatur, Salzvariationen..., um die Kristallmatrix zu verbessern. Bei einem maschinellen Ansatz wird die konzentrierte Proteinlösung mit NaN_3 als Bakterizid versetzt, alle weiteren Handgriffe erledigt der Roboter.

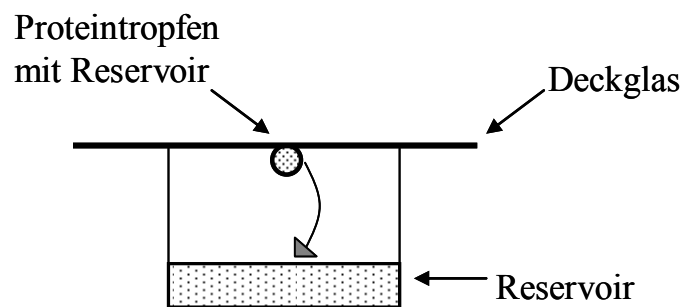


Abbildung 4-1 "hanging drop"-Methode, der Pfeil beschreibt die durch den osmotischen Druck entstehende Dampfdiffusion

4.11. Adenylatcyclase-Test (AC-Test)

Die AC Aktivität wird über Umsetzung von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ in $^{32}\text{P}\text{-cAMP}$ gemessen (Salomon et al., 1974). Das $^{32}\text{P}\text{-cAMP}$ wird von unverbrauchtem ATP chromatographisch abgetrennt: die erste Säule enthält 1,2g *Dowex-50 WX4-400* (Kationenaustauscher), die zweite 1g neutrales *Aluminiumoxid*. Interner Standard für die Wiederfindung ist $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP}$, das dem Cocktail von Anfang an zugefügt wird. Zur Durchführung der Reaktion werden 40µl

Methoden

Proteinlösung auf Eiswasser vorgelegt und mit 50µl 2X AC-Cocktail vermischt. Nach Zugabe von 10µl [α - ^{32}P]-ATP-Substrat wurden die Proben gevortext und bei 37°C auf dem Inkubator geschüttelt (1000rpm, 10min). Bei der Untersuchung von Zellhomogenaten wird ein ATP-regenerierendes System verwendet (Kreatinkinase und Kreatinphosphat). Dann werden die Proben in Eis gesetzt und 150µl AC-Stop-Puffer und 750µl Wasser zugesetzt. Je zwei Proben ohne Protein dienen als Leerwerte. Die Ansätze werden auf die Dowex-Säulen aufgetragen, nach Einsickern wird mit 3 bzw. 4ml Wasser gewaschen. Es wird mit 5ml Wasser von den Dowex-Säulen direkt auf die Aluminiumoxid-Säulen eluiert. Das ^{32}P -cAMP wird mit 4,5ml Tris/HCl 0,1M pH 7,5 direkt in die Szintillationsgefäße eluiert, die mit 4ml Szintillationsflüssigkeit *Ultima Gold XR* befüllt wurden. Nach Schütteln wird im Liquid Scintillation Counter ausgezählt. Dabei werden zwei Kanäle gemessen: einer für ^3H (interner Standard), der zweite für ^{32}P -cAMP. Doppelte Standards an eingesetztem ^3H und ^{32}P werden bestimmt. Die enzymatische Aktivität (A) wird nach folgender Formel berechnet:

$$A \left[\frac{\text{pmol [cAMP]}}{\text{mg [Protein] \cdot \text{min}}} \right] = \frac{\text{cpm } [^{32}\text{P}]_{\text{Probe}} - \text{cpm } [^{32}\text{P}]_{\text{Leerwert}}}{\text{cpm } [^{32}\text{P}]_{\text{total}}} \cdot \frac{\text{cpm } [^3\text{H}]_{\text{total}}}{\text{cpm } [^3\text{H}]_{\text{Probe}} - 3\% [^{32}\text{P}]_{\text{Probe}}} \cdot \frac{\text{Substrat } [\mu\text{M}] \cdot 10^5}{\text{Zeit [min]} \cdot \text{Protein } [\mu\text{g}]}$$

Mindestaktivität, die für eine Auswertung brauchbar ist, war doppelter Leerwert. Zur Bestimmung der AC Aktivität der Expressionszellen wurden Zellhomogenate von mit Leervektor transformierten Zellen verwendet.

Die Säulen werden regeneriert: Dowex-Säulen werden erst mit 5ml 2N HCl, dann mit 10ml Wasser gewaschen, die Alox-Säulen werden mit 4,5ml Tris/HCl 0,1M pH 7,5 gewaschen. Vor dem erneuten Gebrauch sollte nochmals gespült werden: Dowex mit 5ml Wasser und Alox mit 4,5ml Tris/HCl 0,1M pH 7,5.

Standardbedingungen für einen AC-Test: 37°C, 10min; 50mM Tris/HCl pH 8.0, 3mM MnCl_2 , 2mM [^3H]-cAMP, 22% Glycerol (87%), 1mM ATP. Alle Veränderungen des Standards werden angegeben.

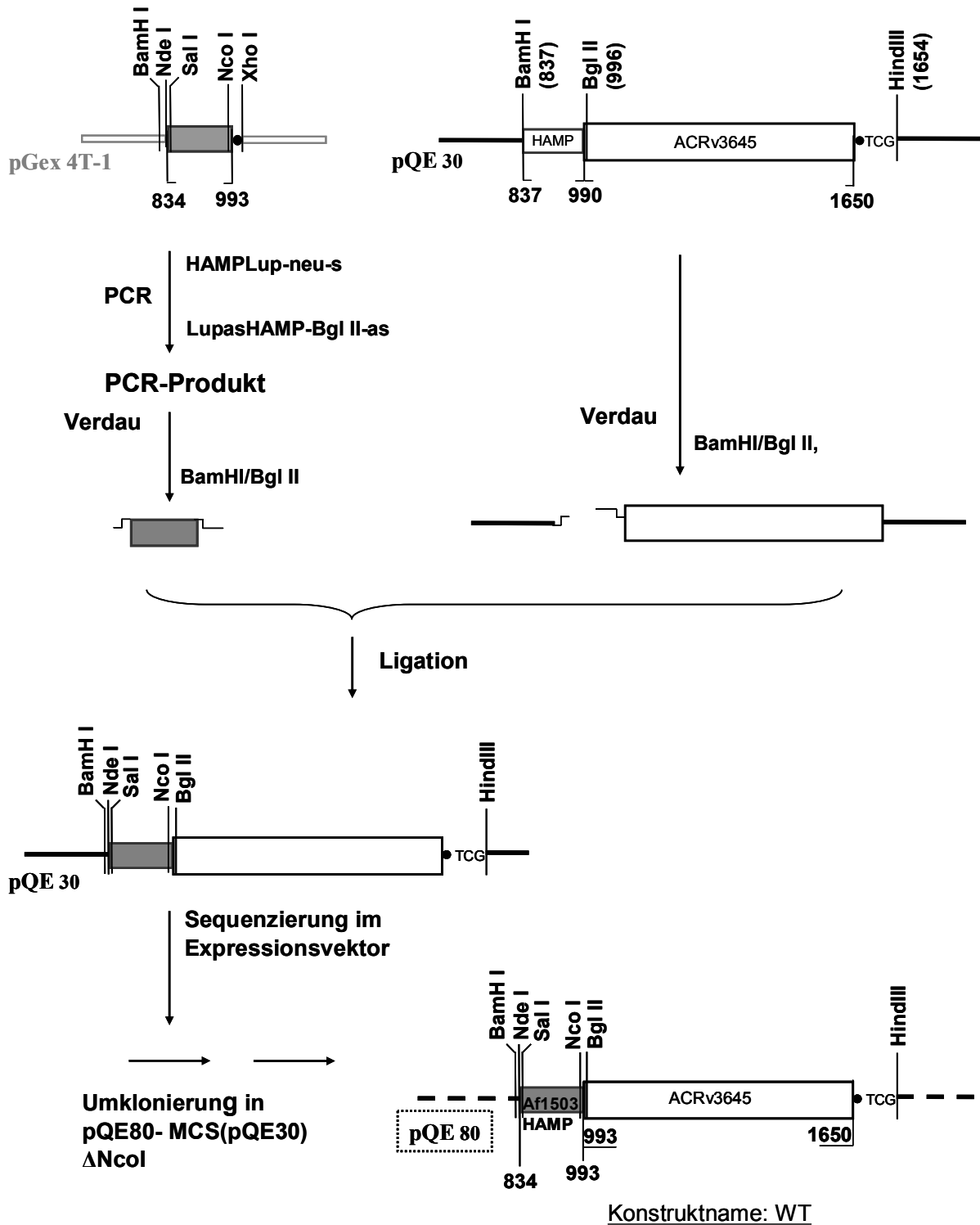
Die Angabe der statistischen Fehlerbalken bei der Auswertung entspricht dem standard error of the mean (SEM), erhältlich durch Division der Standardabweichung durch \sqrt{n} (Anzahl Versuche).

4.12. Klonierungen

4.12.1. Mycobacterium tuberculosis/ HAMP Af1503

Af1503 HAMP

M. tuberculosis, HAMP-AC Rv3645



Methoden

Der Ausgangsklon HAMP-AC Rv3645 aus *M. tuberculosis* ist von Dr. A. Hammer (Hammer, 2004). Die HAMP-Domäne aus *Archaeoglobus fulgidus Af1503*, die an AS Position 278 beginnt, wurde von Prof. A. Lupas, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen, im Expressionsvektor pGex 4T-1 zur Verfügung gestellt. Die einklonierten Schnittstellen (BamHI, NdeI, SalI) sowie die per se vorhandene NcoI-Schnittstelle wurden für spätere Verwendungszwecke beibehalten.

Mit diesem Plasmid als template wurde eine PCR mit o.a. primern gemacht, das PCR-Stück nach Aufreinigung (Nukleotrap) mit BamHI/BglII verdaut und erneut aufgereinigt. Es wurde in die mit BamH/BglII aufgeschnittene HAMP-AC Rv3645 kloniert. Dabei war die richtige Orientierung des inserts nicht immer gegeben, sodass im Weiteren die Möglichkeit wahrgenommen wurde über SalI/NcoI zu klonieren. Diese Konstrukte waren über einen zweifachen Verdau (s. Kap. 4.1.5) zugänglich und konnten ohne vorherige Selektion über den pBluescriptSKII(-) direkt in den Expressionsvektor ligiert werden. Konstrukname: WT (s. Glossar).

4.12.2. Mutationen der HAMP Af1503

Für die von A. Lupas entworfenen Mutationen der HAMP-Domäne aus *A. fulgidus* wurde ein Übersichtsplan entworfen, der mit ms (mutation set) abgekürzt ist. Einzelpunktmutationen werden nicht mit ms abgekürzt.

Alle Mutanten wurden nach o.a. Schema kloniert, so dass hier lediglich eine tabellarische Übersicht über die Verwendung des jeweiligen templates aufgeführt ist.

A)

Als template wurde hier der WT verwendet:

ms	Mutation(en)	s-primer	as-primer
1A	A291I,I294L	3645-ms1A-sense	Lup-HAMP-BglII-as
1B	I284L,L287I, I312L,L315I,I319L,L322I	3645-ms1B-sense	3645-ms1BC-antisense
1C	I284L,L287I,A291L I312L,L315I,I319L,L322I	3645-ms1C-sense	3645-ms1BC-antisense
2A	I284A,A291I	3645-ms-2A-sense	Lup-HAMP-BglII-as
2B	A291I	3645-ms-2B-sense	Lup-HAMP-BglII-as
2C	A291L	3645-ms-2C-sense	Lup-HAMP-BglII-as
3A	D310E	Lup-HAMP-sense-neu	3645-ms-3A-antisense

Methoden

3B	E311K	Lup-HAMP-sense-neu	3645-ms-3B-antisense
3C	I284N,I312N	3645-ms-3C-sense	3645-ms-3C-antisense
-	A291G	ms-2-Schultz-sense	Lup-HAMP-BglIII-as
-	A291W	Lup-HAMP-A291W-s	Lup-HAMP-BglIII-as

B)

Für die Mutanten L315A und L322A wurde als template die Mutante 2B verwendet (A291I).

Konstrukt	s-primer	as-primer
L315A	Lup-HAMP-sense-neu	HAMP-L315A-as
L322A	Lup-HAMP-sense-neu	HAMP-L322A-as

C)

Bei folgenden Mutationen diente als template die jeweilige Mutante im Vektor pGex 4T-1 der AG Lupas. Die primer machten die mutierten HAMP-Domänen in meinem System klonierbar via BamHI/BglIII.

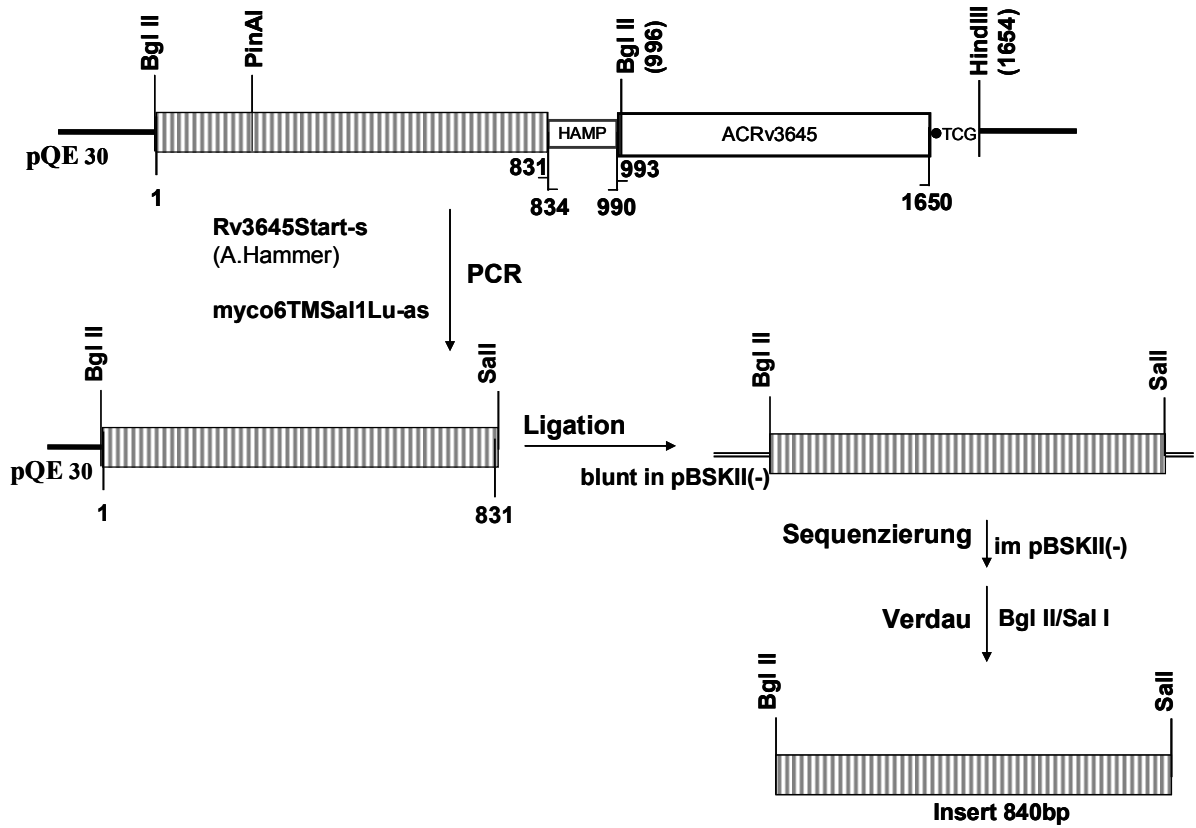
Konstrukt	s-primer	as-primer
A291V	Lup-HAMP-sense-neu	Lup-HAMP-BglIII-as
A291C	Lup-HAMP-sense-neu	Lup-HAMP-BglIII-as
A291F	Lup-HAMP-sense-neu	Lup-HAMP-BglIII-as

4.12.3. Holoenzym Rv3645-Chimäre

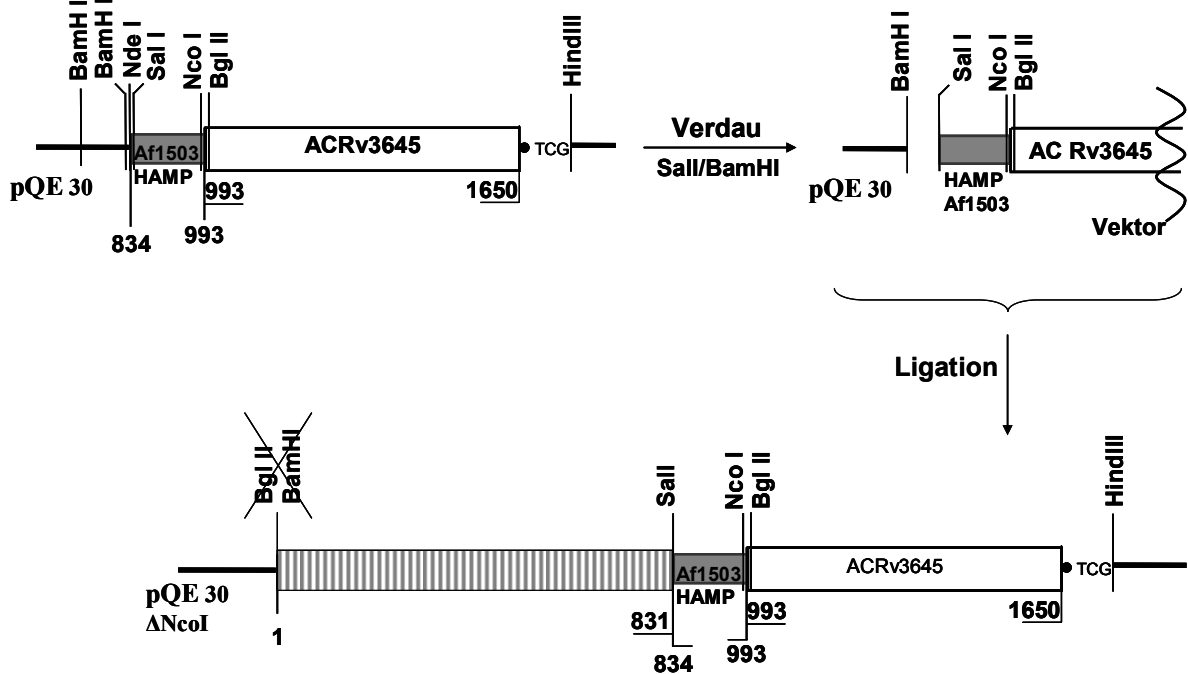
Die Isolierung der 6TM-Region aus *M. tuberculosis* gelang unter Verwendung des Ausgangskonstruktes von Dr. A. Hammer (Hammer, 2004). Nach Sequenzierung und Verdau mit BglIII/SalI konnte sie als insert vor das Konstrukt WT ligiert werden, das dabei als Vektor diente.

Methoden

Holoenzym Rv3645, Ausgangsklon von A.Hammer (#93)



Ausgangskonstrukt: WT



Endkonstrukt: Chimäre #2

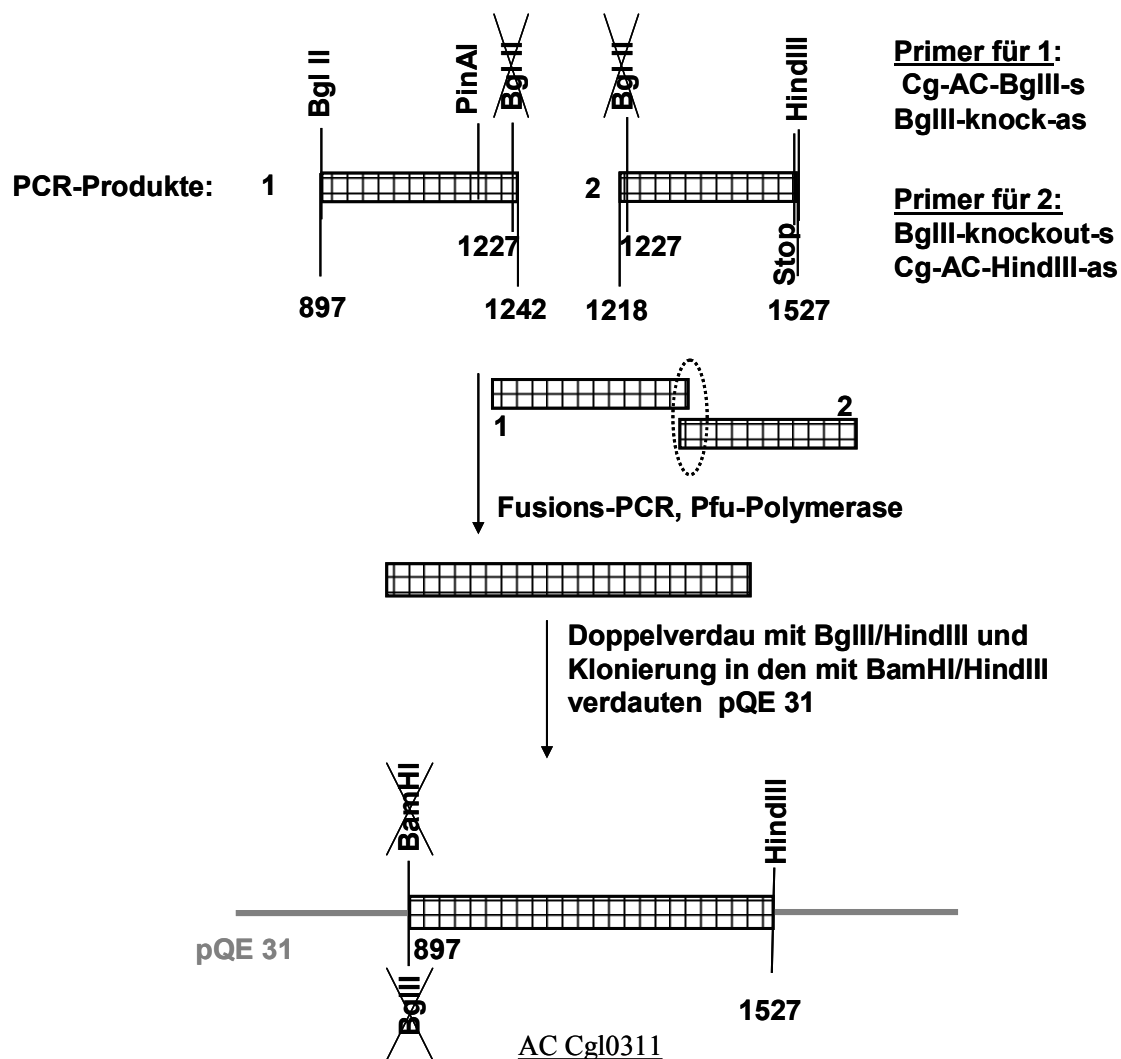
Methoden

4.12.4. *Corynebacterium glutamicum*

Die katalytische Domäne der AC wurde aus bakterieller DNA kloniert. Stamm: ATCC 13032 (von Dr. S. Morbach, Universität zu Köln). Dazu wurden ein paar Bakterienzellen mit der Öse von der LB-Platte genommen, in ein steriles Epicap mit 50µl bidest. Wasser gegeben und 10 – 15min bei 95°C gekocht. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen dieser Suspension als template eingesetzt.

Da die AC eine für weitere Klonierungen ungünstige BglIII-Schnittstelle an Position 1227 enthielt, wurde diese mit einer Fusions – PCR ausgeschaltet (silent) und eine BglIII-Schnittstelle an den Anfang kloniert. Dieser AC Klon bildete so den Ausgangspunkt für alle weiteren Konstrukte.

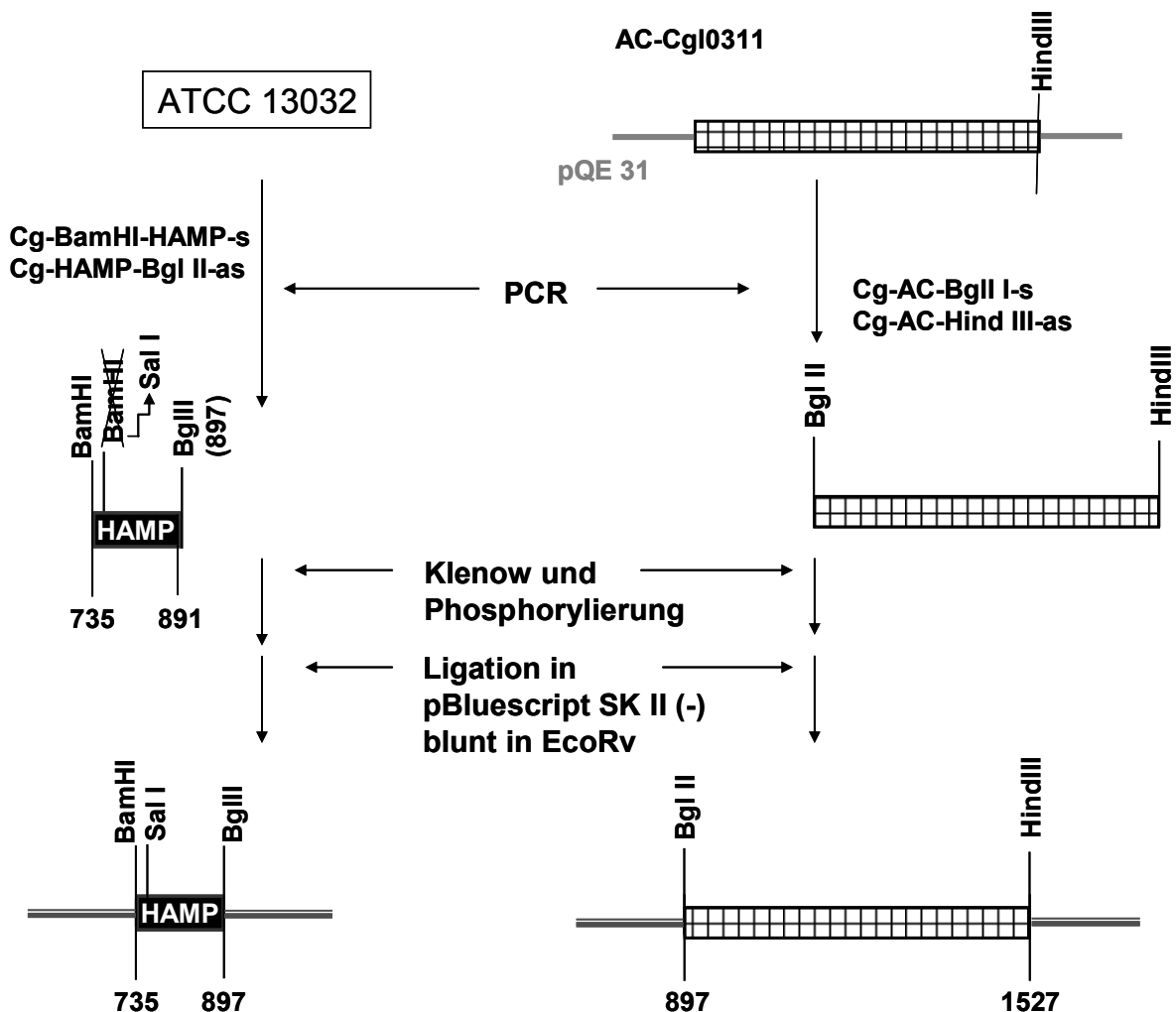
4.12.4.1. Konstrukt: AC Cgl0311



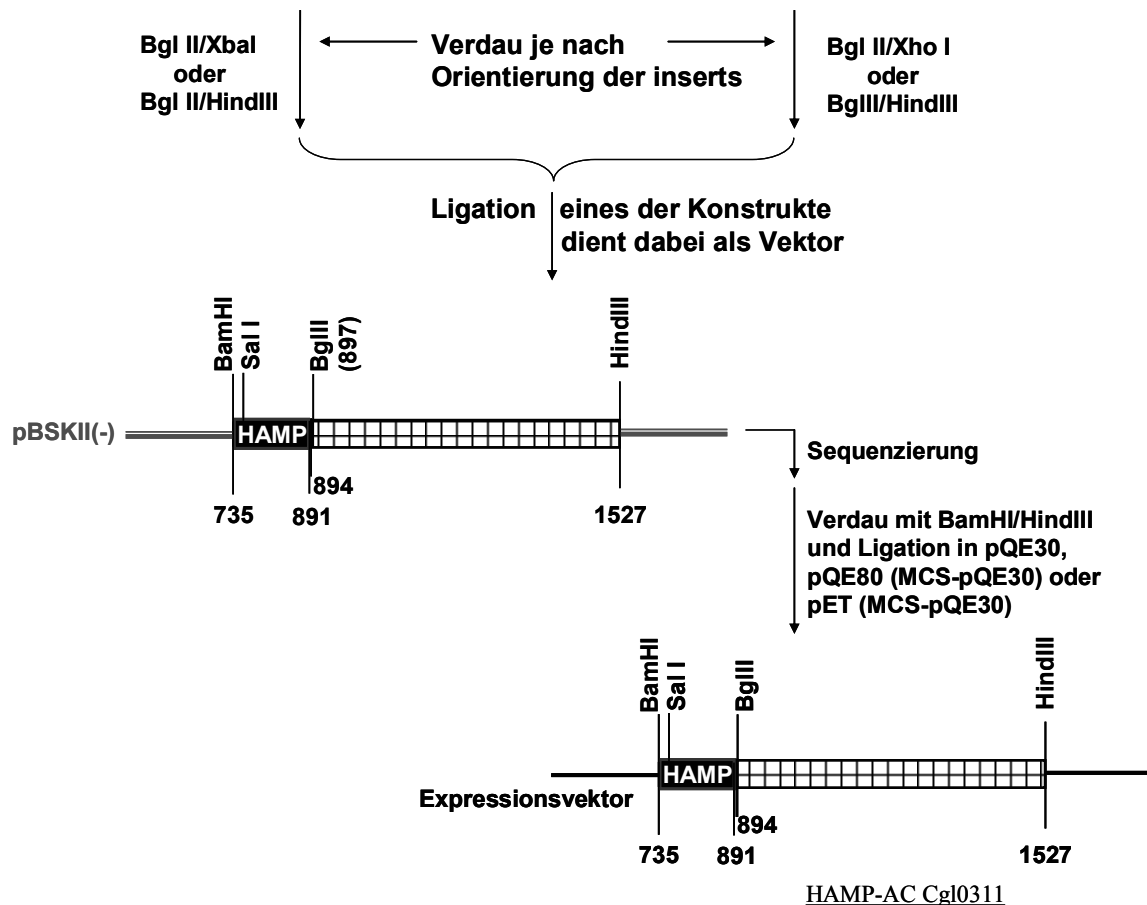
Methoden

Durch das Einsetzen in den *pQE31* wurde BamHI auf BglII kloniert und dabei die Schnittstelle zerstört. So kann die AC exprimiert werden, für weitere Klonierungszwecke war sie über übliche PCR-Reaktionen wieder zugänglich. Dabei konnte sie mit den jeweils gewünschten Schnittstellen versehen werden. Die Sequenzierung erfolgte direkt im Expressionsvektor. Durch die GC-reiche Sequenz des Corynebacteriums musste die hot-air-PCR angewendet werden. Durch zweistufige Temperaturgradienten, die das Annealen der primer erleichterten, konnte letztendlich das richtige Produkt (630bp \equiv 210AS) erhalten werden.

4.12.4.2. Konstrukt: HAMP-AC Cgl0311



Methoden

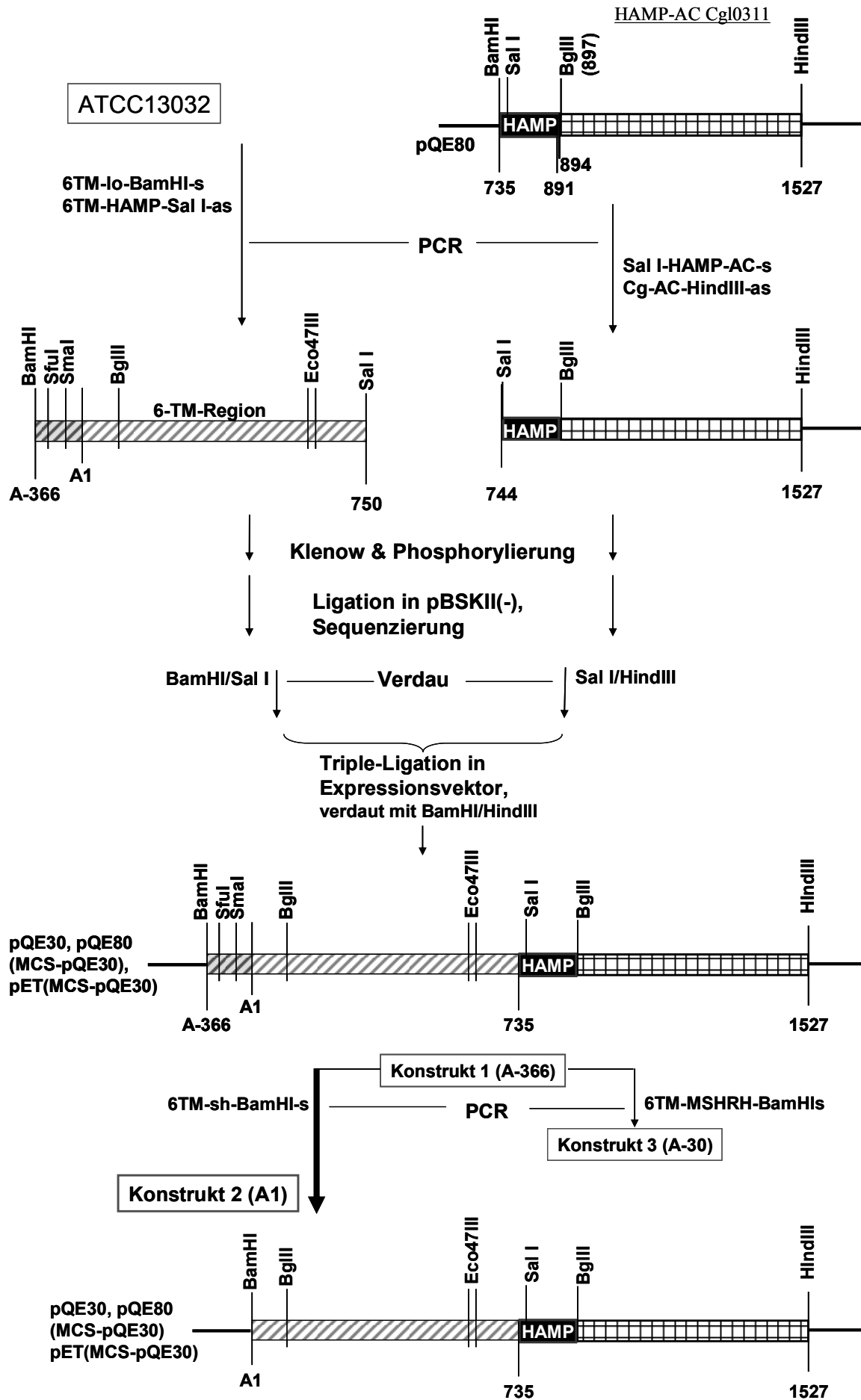


Dieses Konstrukt konnte über BamHI (oder eine andere Schnittstelle aus dem Expressionsvektor), BglIII und HindIII mit anderen Konstrukten gekreuzt werden. Unter Beibehaltung und Einführung dieser Schnittstellen entstand eine Art Werkzeugkasten, mit dem man Domänen beliebig aneinander ligieren kann.

4.12.4.3. Konstrukt: Holoenzyme AC Cgl0311

Es wurden drei Konstrukte mit unterschiedlichen, in der Sequenz per se vorkommenden N-termini kloniert. Der Vollständigkeit halber sind alle N-terminalen Anfänge aufgeführt. Da sie sich in ihrer Aktivität nicht unterscheiden und in der Literatur ein zu Konstrukt 2 vergleichbarer Beginn gefunden wurde, wurde mit diesem Konstrukt weitergearbeitet. Das Start Met dieses Konstruktes hat die Position 1, das entsprechende A des Startcodons ATG wird ebenfalls als Position 1 der DNA bezeichnet. Die beiden anderen Konstrukte erhalten demnach eine Negativnomenklatur für den Start.

Methoden

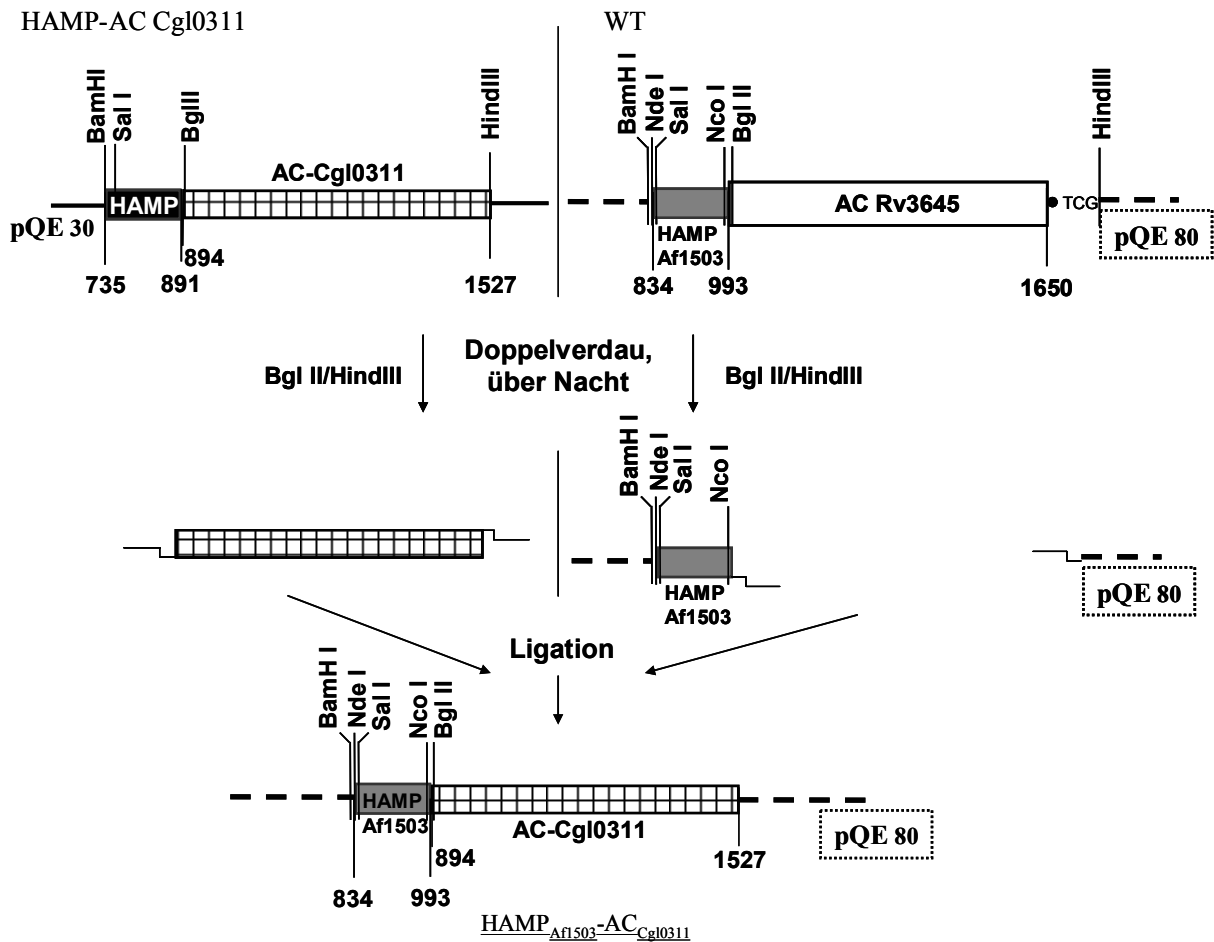


Methoden

Der Membranpart für Konstrukt 1 war aus dem Bakterium über PCR zugänglich, das *Cgl0311* HAMP-AC-Konstrukt aus 4.12.4.2 diente als zweite Vorlage. Konstrukt 1 diente dann als template für Konstrukte 2 und 3. Der hohe GC-Anteil des Holoenzymys bereitete bei der Klonierung Schwierigkeiten, zur PCR wurde deshalb 5% DMSO zugesetzt. Im Weiteren wurde Konstrukt 2 verwendet.

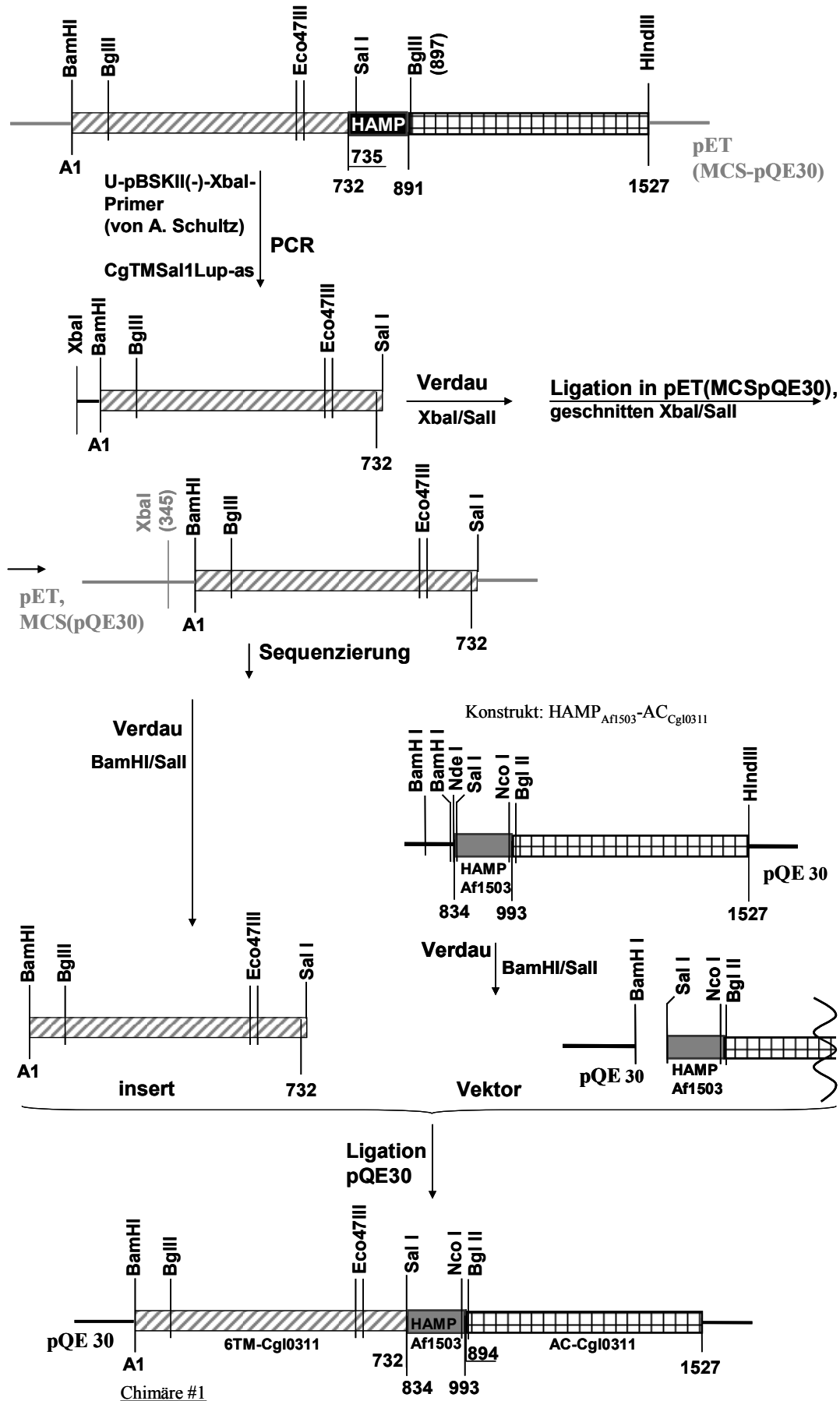
4.12.4.4. Af1503 HAMP-CgAC

Dies Konstrukt entstand durch 'Umstöpseln' der AC aus *C. glutamicum* hinter die HAMP *Af1503*. WT aus 4.12.1 diente dabei als Vektor.



4.12.5. Corynebacterium: Holoenzym-Chimäre

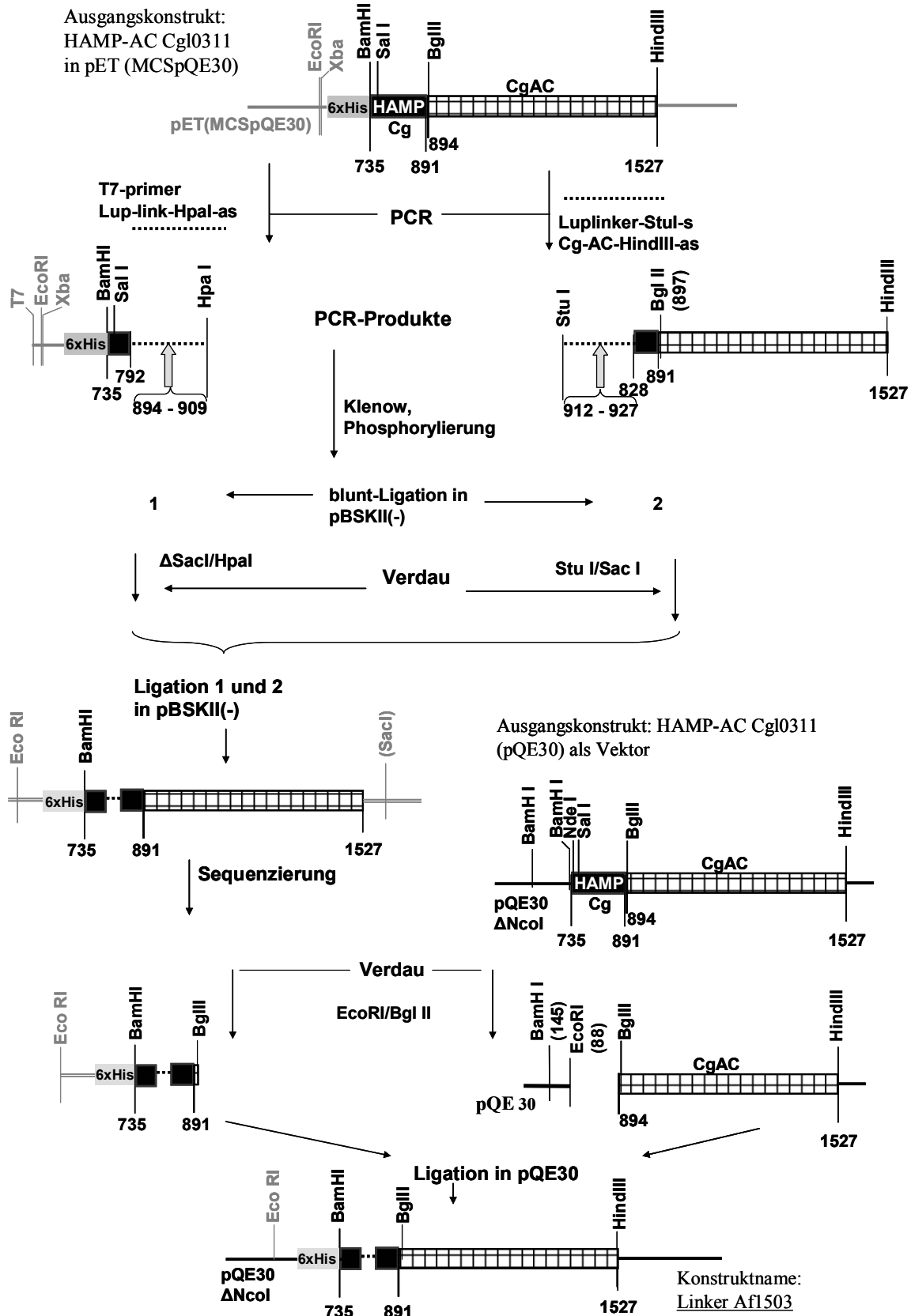
Ausgangskonstrukt: Holoenzym *Cg10311*, Konstrukt 2



Methoden

4.12.6. Linker-Austausch

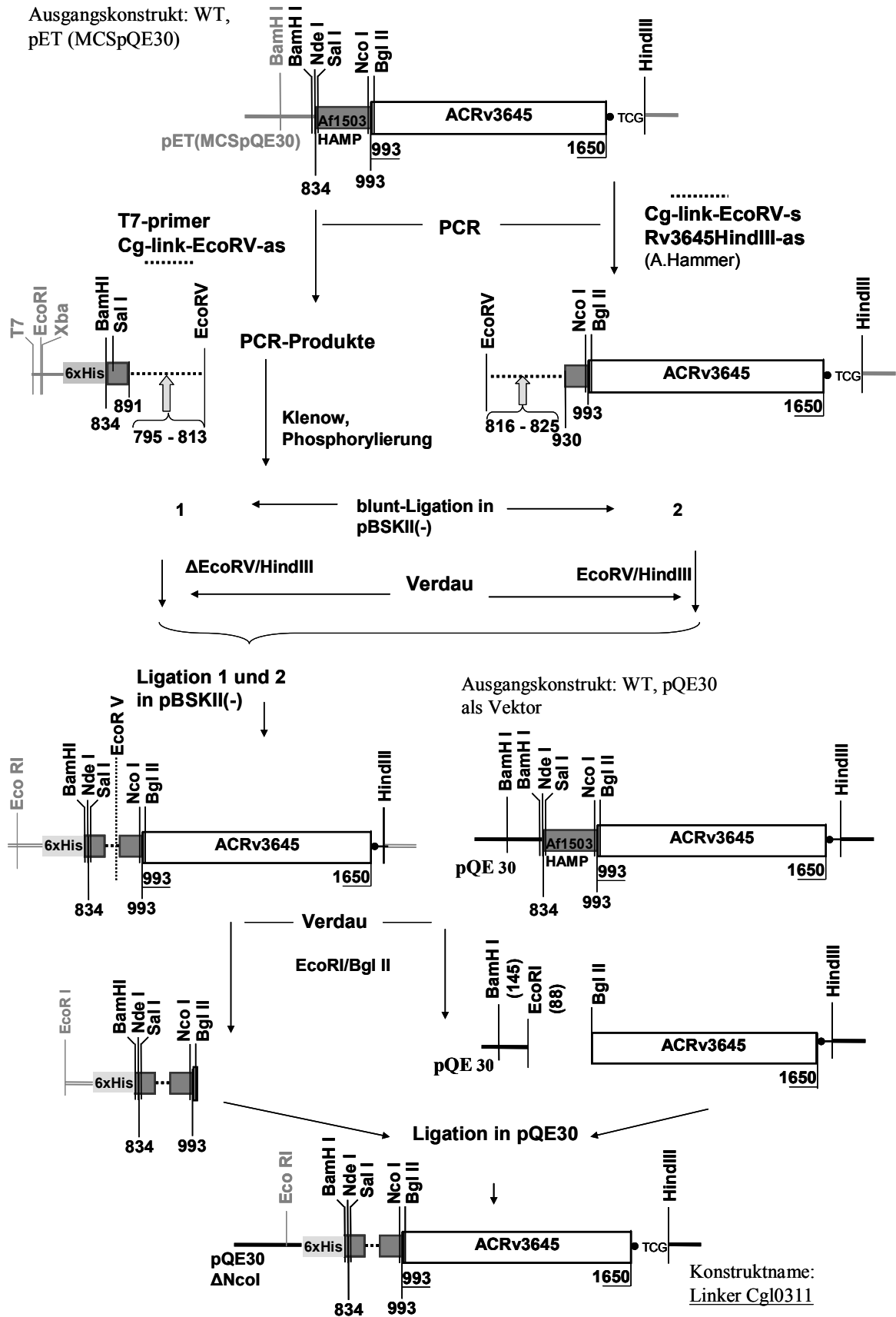
Erster Tausch: der 12 AS lange Linker aus *C. glutamicum* gegen den Linker aus der HAMP *Af1503* (13AS). Ausgangskonstrukte bilden HAMP-AC Cgl0311, im pET- und im pQE30-Vektor vorliegend.



Methoden

Zweiter Tausch: Linker aus *Af1503* HAMP gegen Linker aus HAMP *C. glutamicum*.

Ausgangskonstrukt: WT,
pET (MCSpQE30)

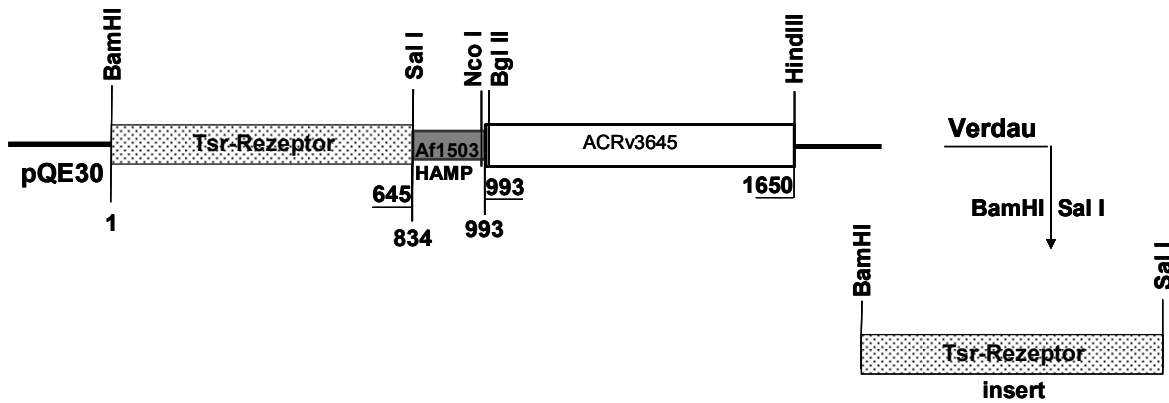


Methoden

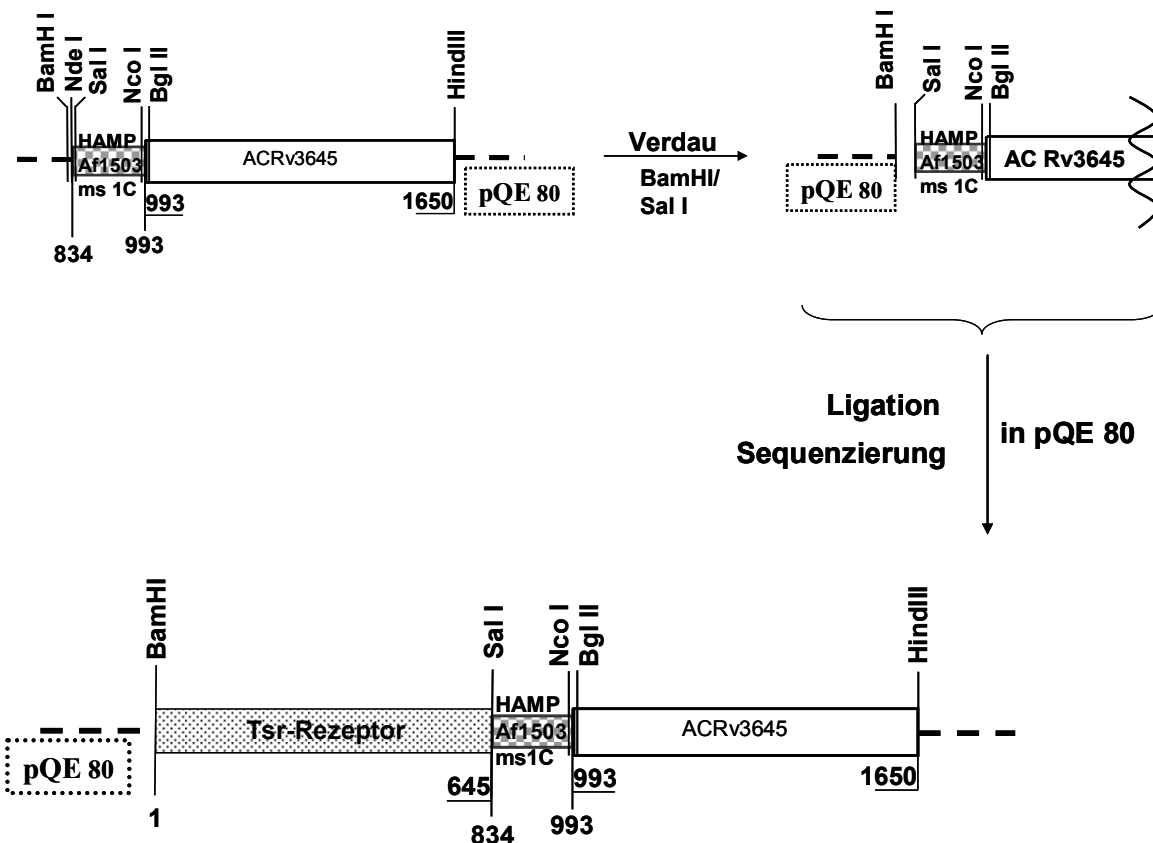
4.12.7. Tsr-Konstrukt

Die Chimäre Tsr-HAMP_{Af1503}-AC_{Rv3645} (#237) wurde von PD Dr. J. Linder kloniert. Daher war der Rezeptorpart über einen BamHI/SalI Verdau erhältlich und konnte vor das ebenfalls existierende Konstrukt aus Kap. 4.12.2, (ms 1C, Klonierungsschema 4.12.1) aus der *Af1503*-Serie ligiert werden.

Ausgangsklon: #237 (PD Dr.J.L.)



Ausgangsklon: HAMP_{Af1503ms1C}-AC_{Rv3645}



5. Ergebnisse

5.1. *Mycobacterium tuberculosis* HAMP-AC Rv3645

5.1.1. Optimierung der Expression von HAMP-AC Rv3645

Anhand der Adenylatcyclase *Rv3645* sollten die Struktur-Funktionsbeziehungen in HAMP-Domänen modellhaft aufgeklärt werden. Erstes Ziel war daher die Kristallisation des löslichen HAMP-AC Rv3645 - Fragments. Es war bekannt, daß die HAMP-Domäne einen regulierenden Einfluß auf die katalytische Domäne ausübt (Linder et al., 2004). Zunächst erfolgte eine Produktion des Proteins im mg-Maßstab. Dazu wurden die Expressionsparameter und die Reinigungsmethode optimiert.

5.1.1.1. IPTG

Zunächst wurde die Konzentration von IPTG optimiert, um die Expression zu induzieren. Der Promotor im *pQE30*-Vektor reagiert auf einen Konzentrationsbereich bis 1000µM IPTG. Entsprechend wurde die IPTG-Konzentration von 60-1000µM variiert. Die Expressionstemperatur (22°C) und die Zeit (4h) wurden beibehalten.

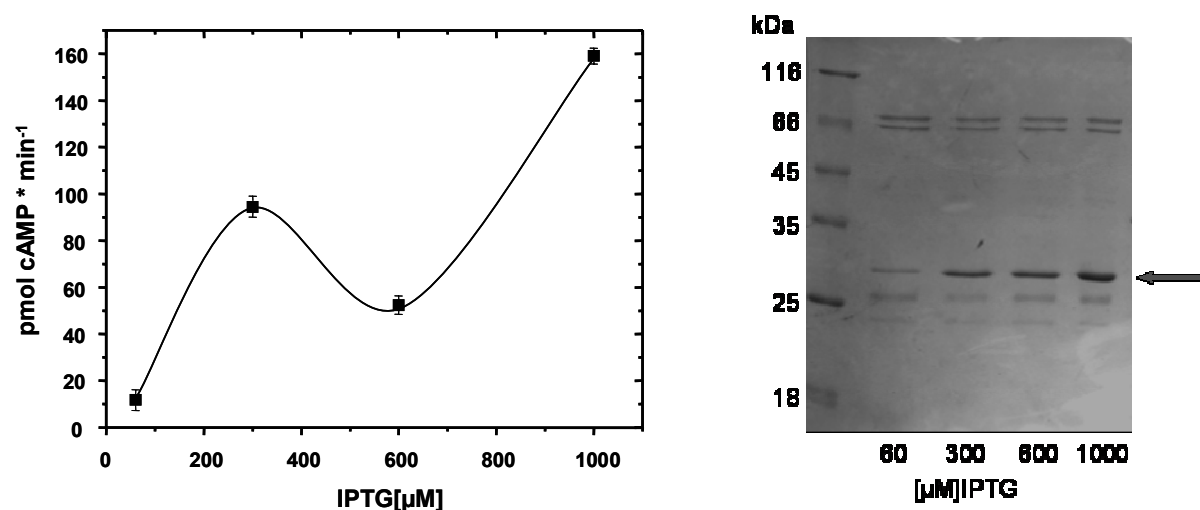


Abbildung 5-1 AC Aktivität und SDS-Gel des mit verschiedenen IPTG-Mengen exprimierten Proteins HAMP-AC Rv3645.

links: AC Aktivität [pmol cAMP·min⁻¹]; n=2. Testbedingungen: Standard, je 5µg Protein. Rechts: gereinigtes Protein auf SDS-Gel (15%) (←) markiert das gereinigte Protein bei 30kDa. Auftrag: je Spur 2,2µg Protein

Nach Induktion mit 1mM IPTG ist die Aktivität der Cyclase am höchsten (160 pmol cAMP·min⁻¹), auch entsprechend dem SDS-Gel ist bei dieser IPTG-Konzentration das meiste Protein exprimiert. Trotz Reinigung sind deutliche Verunreinigungen erkennbar.

Ergebnisse

5.1.1.2. Temperatur

Um herauszufinden, bei welcher Expressionstemperatur die AC die höchste Aktivität aufweist, wurde das Konstrukt bei fünf unterschiedlichen Temperaturen exprimiert. Die Kulturen wurden bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von 0,4-0,6 angezchtet. Dann wurden die Kulturen auf die gewünschte Expressionstemperatur gebracht und mit 1mM IPTG induziert. Die Expressionen bei 15°C und 20°C wurden ü.N. angesetzt, 3 Stunden waren für die Expressionstemperaturen bei 25°C, 30°C und 37°C vorgesehen.

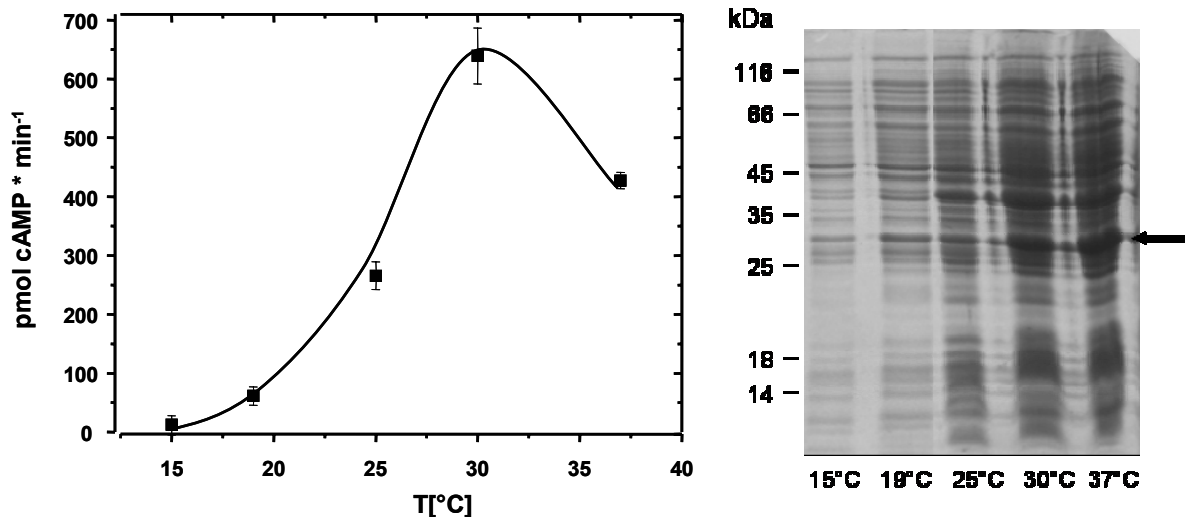


Abbildung 5-2 AC Aktivität und SDS-Gel von HAMP-AC Rv3645 nach Expression bei unterschiedlichen Temperaturen und 1mM IPTG.

links: AC Aktivität [pmol cAMP·min⁻¹], AC-Test erfolgte am gereinigten Protein, Testbedingungen: Standard; n=2. Rechts: SDS-Gel (15%), aufgetragen sind jeweils die Zellhomogenate, je 6µl. (←) markiert das exprimierte Protein bei 30kDa

Am besten exprimiert wurde das Protein bei 37°C, was an der Dicke der gewünschten Bande im SDS-Gel zu sehen ist, das Aktivitätsoptimum lag bei 30°C.

5.1.1.3. Zeit

Bei 30°C und 1mM IPTG wurde die Expressionszeit untersucht: es wurde für 2, 4, 6 und 8 Stunden exprimiert (Tabelle 5-1).

Expressionszeit [h]	Aktivität [pmol cAMP · min ⁻¹]
2	55 ± 0,47
4	185 ± 13
6	386 ± 12
8	257 ± 9

Tabelle 5-1 Ergebnis der AC Aktivität nach unterschiedlichen Expressionszeiten. Testbedingungen: Standard; n=2; je 5µg gereinigtes Protein

Ergebnisse

Die AC Aktivitätsunterschiede sind zwischen 4h und 6h statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$) und zwischen 6h und 8h statistisch signifikant ($p < 0,05$). Somit waren die optimalen Expressionsbedingungen festgelegt ($T = 30^{\circ}\text{C}$, IPTG = 1mM und $t = 6\text{h}$), um HAMP-AC Rv3645 im großen Maßstab herzustellen.

5.1.2. Reinigung der HAMP-AC Rv3645

Es wurden zunächst zwei Aufschlussmethoden verglichen: zum einen die beschriebene Variante (Linder et al., 2004) mit Ultraschall, Lysozym und DNase (4.6), zum anderen Aufschluß durch *French Press* Behandlung.

Die *French Press* Behandlung erbrachte höhere Ausbeuten. Außerdem wurde eine höhere Reinheit des Proteins durch Zusatz von 10% Glycerin (87%) im Lysispuffer erreicht.

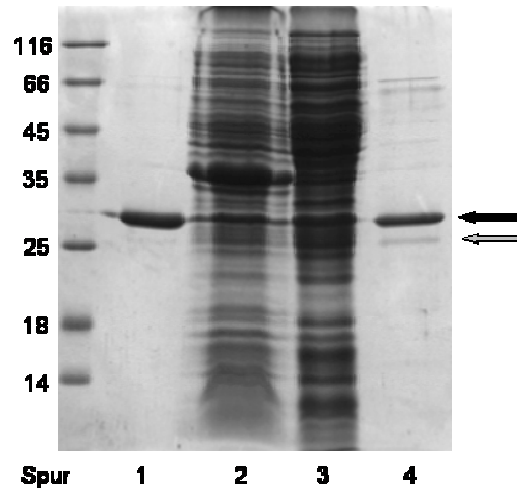


Abbildung 5-3 SDS-Gel (15%) von HAMP-AC Rv3645 mit und ohne 10% Glycerol im Lysis-Puffer.

Spur1: Reinigung mit 10% Glycerol (87%) im Lysis-, Wasch - und Elutionspuffer; 2.2 μg Protein. Spur2: 6 μl Zellpellet in 100 μl Probenpuffer. Spur3: 6 μl Nickelüberstand. Spur 4: Reinigung ohne Glycerol mit deutlichen Verunreinigungen, 3.3 μg Protein. (\leftarrow): typische Verunreinigung bei Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographie mit löslichem *E. coli* Protein. Die Bande wird in der Literatur als Peptidylprolylisomerase SlyD (26kDa) beschrieben (Yan et al., 2001). (\leftarrow): gereinigtes Protein bei 30kDa

Dieses Reinigungsprotokoll ist für alle weiteren zu reinigenden Proteine das Standardprogramm, solange nichts anderes vermerkt.

5.1.3. Kristallisationsversuche

Gereinigte HAMP-AC Rv3645 wurde gegen Dialysepuffer 1 dialysiert. Die Verwendung dieses Puffers war bereits bei der Kristallisation anderer AC-Domänen erfolgreich (Tews et al., 2005). Er enthält 10% Glycerin zur Stabilisierung des Enzyms. Ansonsten 10mM

Ergebnisse

Tris/HCl, pH 8, 2mM MgCl₂, 2mM Thioglycerol. Das Dialysat wurde auf 11mg/ml aufkonzentriert (Vivaspin 2, 10kDa-cut-off-Konzentratoren).

5.1.3.1. HAMPTON-, WIZARD-Screen

Für das manuelle Ansetzen von Platten wurden 1µl konzentriertes Protein und 1µl des jeweiligen Puffers benötigt (4.10.2). Von Hampton wurden die Puffer-Reihen Crystal Screen, Crystal Screen 2 und Crystal Screen Lite angesetzt. Von Wizard-Screen I und II wurden die Bedingungen angesetzt, die sich nicht mit dem Hampton-Kit deckten.

Es entwickelten sich Kristalle unter den Bedingungen des HAMPTON Crystal Screen 2, #39:

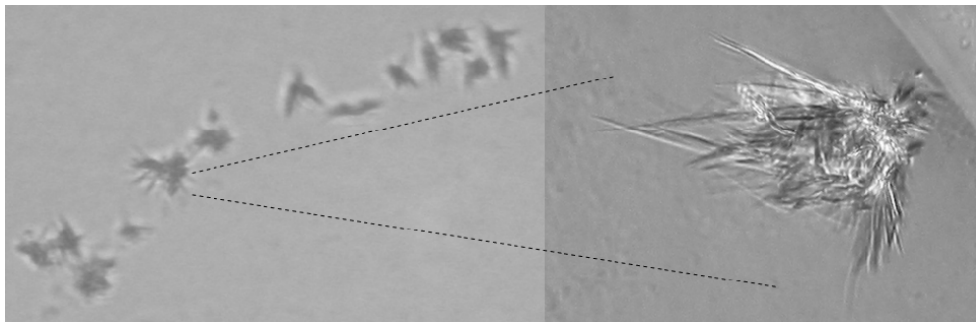


Abbildung 5-4 Minikristalle aus dem Hampton Crystal Screen 2, #39:

3,4M 1,6 Hexandiol, 0,2M MgCl₂, 0,1M Tris/HCl pH 8,0; Wachstumstemperatur: 12°C, Wachstumsdauer: 2-3 Monate. Größe: ca. 40x5µm, verzweigte Büschel

Die Kristalle waren unter diesen Bedingungen reproduzierbar, Zusatz von MgCl₂ war nicht notwendig. 40x5µm sind für eine Vermessung zu klein, daher wurden die einzelnen Pufferkomponenten variiert (darauf wird im Einzelnen nicht eingegangen). Da trotz weitgehenden Versuchen keine Kristalle erhalten wurden, die für eine Strukturaufklärung geeignet waren (Größe: 80x10µm bis 110x20µm, unverzweigt, keine kubischen Formen), wurden die Versuche eingestellt.

5.2. HAMP aus *Archaeoglobus fulgidus* ORF Af1503

Zwischenzeitlich löste die Arbeitsgruppe von Prof. A. Lupas, MPI für Entwicklungsbiologie, die Struktur einer anderen HAMP-Domäne (Hulko et al., 2006). Im Genom des hyperthermophilen Archaeobakteriums *Archaeoglobus fulgidus* kommen HAMP-Domänen haltige ORFs vor. Eine solche HAMP-Domäne (aus ORF Af1503) wurde zur Strukturaufklärung per NMR gewählt. Die Überlegung war, dass eine Proteindomäne, die als dynamischer Schalter bei 100°C funktionieren sollte (Lebensraum des Archaeobakteriums sind heiße Quellen) bei Raumtemperatur wahrscheinlich in ihrer stabilsten Konformation eingefroren ist, sodaß eine NMR-Strukturaufklärung möglich sein sollte.

Ergebnisse

Ein Alignmentausschnitt der in Kapitel 1.2 aufgeführten HAMP-Domänen zeigt nochmals die Homologie der beiden HAMP-Domänen aus *A. fulgidus Af1503* und *M. tuberculosis Rv3645*:

```
Af1503 278: STITRPII ELSNTADKIAEGNLE--AEVPH--ONRADEIGILAKSIERLRRSISKVAME  
Rv3645 278: MSIADPLRQLRWALSEVQRGNYN--AHMQI---YDASELGLLQAGFNDMVRELSERQR
```

Abbildung 5-5 Alignment der HAMP-Domänen aus *A. fulgidus Af1503* und *M. tuberculosis Rv3645*, nach Clustal W. Schwarz unterlegt: identische und ähnliche AS. Der die Helices 1 und 2 verknüpfende Linker beginnt bei beiden Sequenzen an Position G297 und endet bei *Af1503* an Position A309, bei *R3645* an A310.

5.2.1. Die einzigartige Struktur der Af1503 HAMP-Domäne

Die NMR-Analyse zeigte, dass die HAMP-Domäne aus zwei parallelen α -Helices besteht, die durch einen Linker verbunden sind. Zwei HAMP-Domänen bilden wiederum ein paralleles Homodimer, sodass ein Bündel aus vier parallelen Helices entsteht, die leicht gegen die Symmetrieachse geneigt sind (Abbildung 5-6).

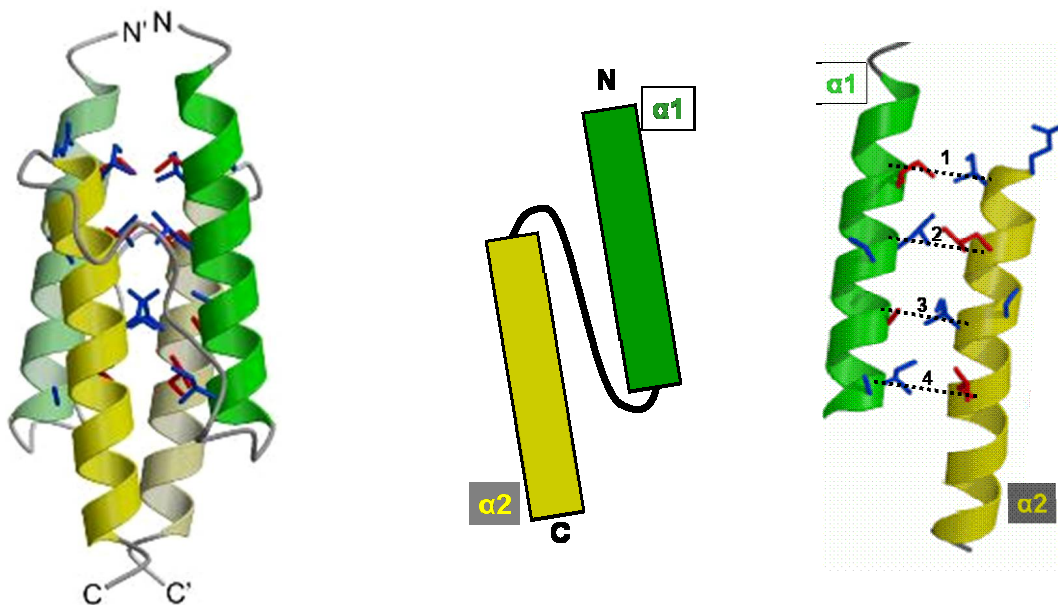


Abbildung 5-6 Struktur der HAMP-Domäne aus *A. fulgidus Af1503*, Seitenansicht.

Links: Seitenansicht als paralleles Dimer. In kräftigem Gelb und Grün das erste Monomer mit N-terminus (N), dem die beiden Helices verbindenden, im Vordergrund sichtbaren Linker, und das C-terminale Ende (C) der HAMP-Domäne, das sich an Helix zwei anschließt. Das für die Dimerenbildung nötige zweite Monomer ist in blasseren Farben sichtbar (N' und C'). Rote Stifte: AS, deren Seitenketten ins Innere des helicalen Bündels ragen, blaue Stifte: die AS, deren Seitenketten zur Nachbarhelix zeigen (besser ersichtlicher in Abbildung 5-7).

Mitte: schematische Darstellung eines Monomers (ebenfalls Seitenansicht). Grün: α -Helix 1, gelb: α -Helix 2; N- und C-terminus

Rechts: Seitenansicht des Monomers, 180° um die eigene Achse gedreht, ohne Linker. Schwarz gestrichelt sind die Ebenen 1-4 eingezeichnet, die durch die Interaktion von hydrophoben AS gebildet werden und so das Helixbündel stabilisieren. Blaue und rote Stifte: wie links. Alle Daten aus der Literatur (Hulko et al., 2006).

Ergebnisse

Das parallele Dimer der HAMP-Domäne aus *A. fulgidus* hat die Struktur einer coiled-coil. Die Strukturen von coiled-coils beruhen auf der Periodizität hydrophober AS in den α -Helices, in denen jede AS eine Drehung um ungefähr 100° hervorruft. Klassische coiled-coils haben eine Periodizität von 7 AS (Heptadenmuster), also nahezu zwei Drehungen im gestreckten Zustand der Helices. Die fehlenden 20° werden durch Verdrillen der Helices umeinander kompensiert. Die Positionen der Periodizität der AS werden mit den Buchstaben *abcdefg* wiedergegeben (s. Abbildung 1-3). Die hydrophoben Positionen *a* und *d* sind an der Ausbildung der Helixpackung beteiligt. Diese wird durch den Aufbau einer kanonischen coiled-coil definiert. Kanonische coiled-coil: bezeichnet die Packung der bevorzugten hydrophoben AS innerhalb der Helices: Leu an *a* und Ile an *d*. Dabei wird eine hydrophobe AS einer Helix jeweils von vier Seitenkettenresten der ihr zugewandten Helix umrahmt, so entsteht ein Hohlraum, in den die AS hineinpasst: *knobs-into-holes-Anordnung*, die coiled-coils normalerweise kennzeichnet (Abbildung 5-7).

Eine von der kanonischen Anordnung einer coiled-coil abweichende Packung konnten Lupas et al. bei *Afl503* beobachten: eine *knobs-into-knobs*-Packung. Sie wird durch zwei Orientierungen charakterisiert: zum einen existieren hier vier hydrophobe AS, jetzt mit *x* bezeichnet, deren Seitenkettenreste direkt *ins Innere* des helicalen Bündels ragen. Zweitens wurden AS beobachtet, deren Seitenketten sich seitlich zur Nachbarhelix orientieren, um so einen wechselwirkenden Ring zu bilden, bezeichnet mit *da* (*da* entspricht den Positionen *e* (Helix 1) bzw. *g* (Helix 2)). Eine dichte monomere Packung wird dadurch erreicht, dass die *x*-Ebenen von Helix 1 mit den *da*-Ebenen von Helix 2 kombiniert werden und umgekehrt. So entstehen gemischte *x-da*-Ebenen. Lupas et al. bezeichnen diese beobachtete Form der interhelicalen Packung mit "*komplementäre x - da*" (Abbildung 5-7). Die Existenz einer solchen ungewöhnlichen Packung wurde von Pauling in den 50er Jahren vorhergesagt (Pauling et al., 1951) und ist bislang nur im Lac-repressor (Regulator des lac-Operons aus *E. coli*) beobachtet worden (Solan et al., 2002).

Ergebnisse

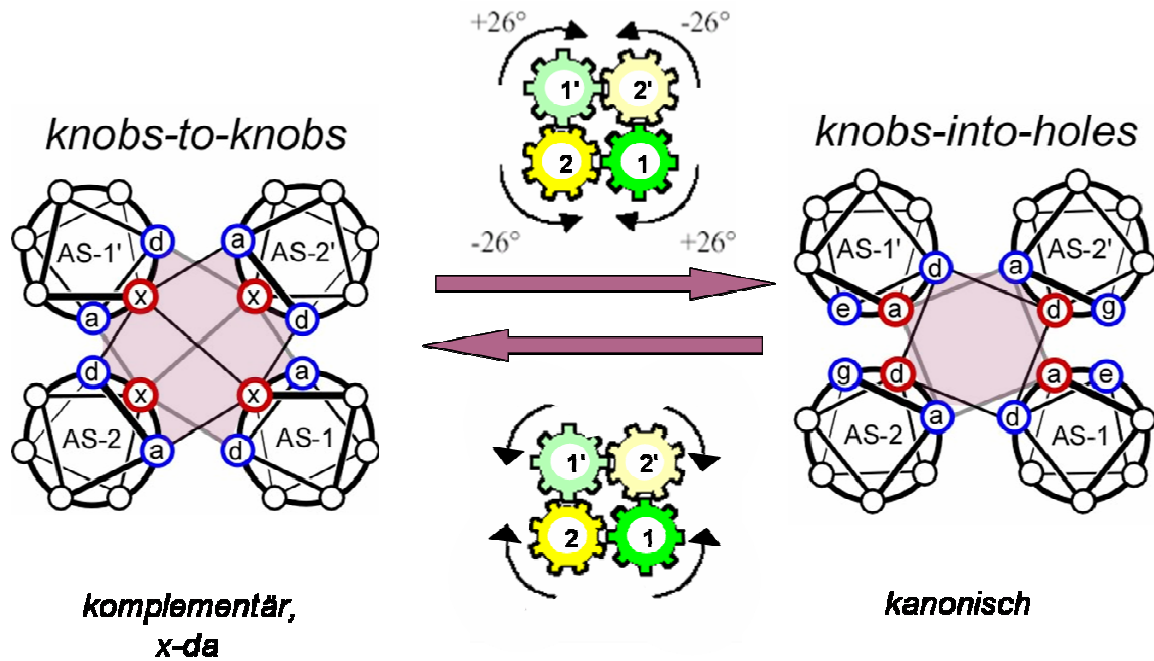


Abbildung 5-7 Interaktionen der hydrophoben AS im tetrahelicalen Bündel von HAMP Af1503.

Links: schematische Darstellung der knobs-into-knobs Anordnung, bezeichnet als *komplementäre x-da*, Ansicht von oben. Rote Kreise: *x*-Positionen, deren Seitenketten ins Innere des Bündels zeigen, blaue Kreise: *da*-Positionen, deren Seitenketten zur Nachbarhelix zeigen; violett unterlegt: die Wechselwirkungen im Kernstück der vier Helices (AS-1, AS-1', AS-2, AS-2').

Mitte: Modell zur Darstellung der Umwandlung von *komplementär x-da* zu *kanonisch*. Das Zahnrad symbolisiert die vier Helices (Farbgebung wie Abb. 5.6). Sie drehen sich in einer konzertierten Rotation von 26° umeinander, Wechsel von *knobs-into-knobs* zu *knobs-into-holes* und umgekehrt. Lila Pfeile: Umwandlung in beide Richtungen.

Rechts: Darstellung der kanonischen Packung, schematisch, Ansicht von oben. Angegeben sind u.a. die für die Packung wichtigen AS in der Buchstabenkennzeichnung für kanonische coiled-coils. Farbgebung: die rot umrandeten *x*-Reste (links) werden nun zu *d*- (Helix 2) oder *a*- (Helix 1) Resten (ebenfalls rot umrandet). Die blau umrandeten *a*-Reste (links, Helix 1) werden durch die Drehung zu *e*-Resten in Helix 1 (blau umrandet) der kanonischen Packung; *d*-Reste (Helix 2), links blau umrandet, werden zu *g*-Resten in Helix 2 (blau umrandet) der kanonischen Packung, an der nur die *a*- und *d*-Reste beteiligt sind. Violett unterlegt: das Herzstück des Bündels, das bei dieser Packung von AS-Interaktion unberührt bleibt.

In Abb. 5.7, Mitte, wird von Prof. A. Lupas ein Modellvorschlag gemacht, der den Mechanismus der HAMP-Domäne bei der Signaltransduktion erklären soll. Dabei spielt der beinahe isoenergetische Zustand der kanonischen und der *komplementären x-da*-Packung eine Rolle: an der *komplementären x-da*-Packung sind drei Positionen per Periodizität beteiligt (*x*, *d* und *a*), während bei der kanonischen Packung die Positionen *a* und *d* beteiligt sind (Abb. 5.7). Die Hypothese von A. Lupas ist, dass der Übergang der *x-da*-Struktur in eine kanonische coiled-coil-Struktur durch eine Rotation der Helices erfolgt. Dabei sollen sich die vier Helices um 26° drehen, wobei jeweils benachbarte Helices in entgegengesetzte Richtungen drehen, ähnlich einem Getriebe (Abbildung 5-7, Mitte). Diese Hypothese wird u. a. durch

Ergebnisse

Mutationsstudien im GCN4-Leucinzipper begründet (der Leucin 'Reißverschluss' beschreibt das Strukturmotiv der Leu-Periodizität in parallelen Helices und die damit einhergehende Dimerisierung). Der GCN4-Leucinzipper ist ein Transkriptionsfaktor der Hefe und gehört zu den am besten untersuchten coiled-coil Familien. Yadav et al. konnten durch Punktmutation an Position *e* (E20C) die kanonische Packung unter Ausbildung eines *a-d-e*-Ringes in die beobachtete *komplementäre x-da*-Anordnung umwandeln. Durch weitere Mutation dieser *e*-Position zu Ser konnten unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen die Strukturen beider Packung erhalten werden. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass in diesem Fall die Umwandlung von kanonisch nach *x-da* eine Umorientierung der Helices von parallel zu antiparallel zur Folge hatte (Yadav et al., 2006).

Da die Helices von HAMP *Af1503* bereits in paralleler Form angeordnet sind, kann der Übergang von der ihr eigenen komplementären *x-da*-Packung zu kanonischer Packung mit einer Rotation der Helices um 26° ohne eine Umorientierung erreicht werden, so die Hypothese von A. Lupas. Da zur Ausbildung der *x-da*-Packung die Positionen *a*, *d*, *e* der Helix 1 und *a*, *d*, *g* der Helix 2 beansprucht werden (wenn man die *a-g*-Nomenklatur der kanonischen Form zugrunde legt), sind die Helices asymmetrisch zueinander.

Man kann festhalten: HAMP *Af1503* besteht als Homodimer aus vier parallelen Helices, die eine nicht kanonische coiled-coil-Struktur besitzen. Diese ungewöhnliche Helix-Packung wird mit *komplementär x-da* bezeichnet; die Helices sind asymmetrisch zueinander (Hulko et al., 2006).

Eine Frage war, ob sich die Packung der Helices durch eine Rotation um 26° von der *komplementären x-da* in die kanonische coiled-coil umwandeln lässt und ob dabei die parallele Anordnung der Helices erhalten bleibt.

5.2.2. Funktionsanalyse mit Hilfe der Rv3645 AC als read-out: **Af1503HAMP₍₂₇₈₋₃₃₁₎-Rv3645AC₍₃₃₁₋₅₄₉₎**

Die Struktur der Arbeitsgruppe Lupas sagte zur Funktion nichts aus, da *Af1503* keine 'output'-Domäne besitzt. Wie kann der postulierte Rotationsmechanismus nachgewiesen werden, mit dem die HAMP-Domäne ein Signal intramolekular weiterleitet, d.h., dass HAMP zwischen *komplementär x-da* und kanonisch alterniert durch eine konzertierte Rotation um 26° (Abbildung 5-7)? Zunächst wurde untersucht, ob die HAMP-Domäne von *Rv3645* durch HAMP *Af1503* unter Erhalt der enzymatischen AC Aktivität ersetzt werden kann (Konstrukt WT, Abbildung 5-8).

Ergebnisse

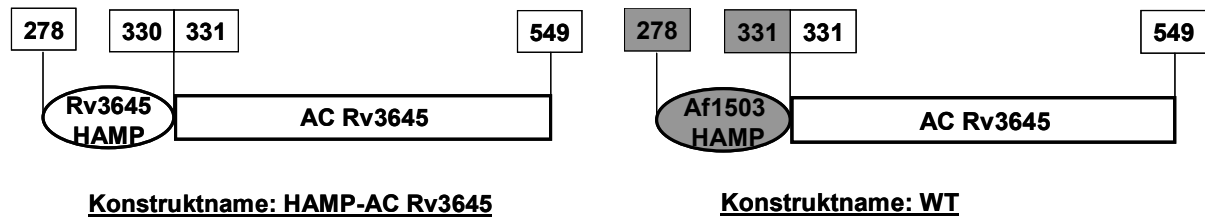


Abbildung 5-8 Austausch von HAMP *Rv3645* gegen HAMP *Af1503* in *M. tuberculosis Rv3645*.

links: Konstrukt: HAMP-AC Rv3645, HAMP-Domäne und AC aus *M. tuberculosis*; Weißes Oval: HAMP-Domäne, Angabe der AS (eingerahmt), weißes Rechteck: AC, Angabe der AS (eingerahmt), Konstruktname.

rechts: Konstrukt mit ausgetauschter HAMP von *A. fulgidus*. Graues Oval: HAMP aus *A. fulgidus*, Angabe der AS (eingerahmt); weißes Rechteck: AC aus *M. tuberculosis*, Angabe der AS, Konstruktname.

5.2.2.1. Expression, Reinigung und Aktivitätsvergleich

Die Expression des Konstruktes WT erfolgte unter den in 5.1.1 beschriebenen Bedingungen:

Animpfen mit 5% Vorkultur (37°C ü. N.), $T_{\text{Expression}}=30^{\circ}\text{C}$, $t=5\text{-}6\text{h}$, 1mM IPTG.

Gereinigt wurde nach Standardmethode (5.1.2). Das WT - Monomer hat ein berechnetes MW von 30,6kDa.

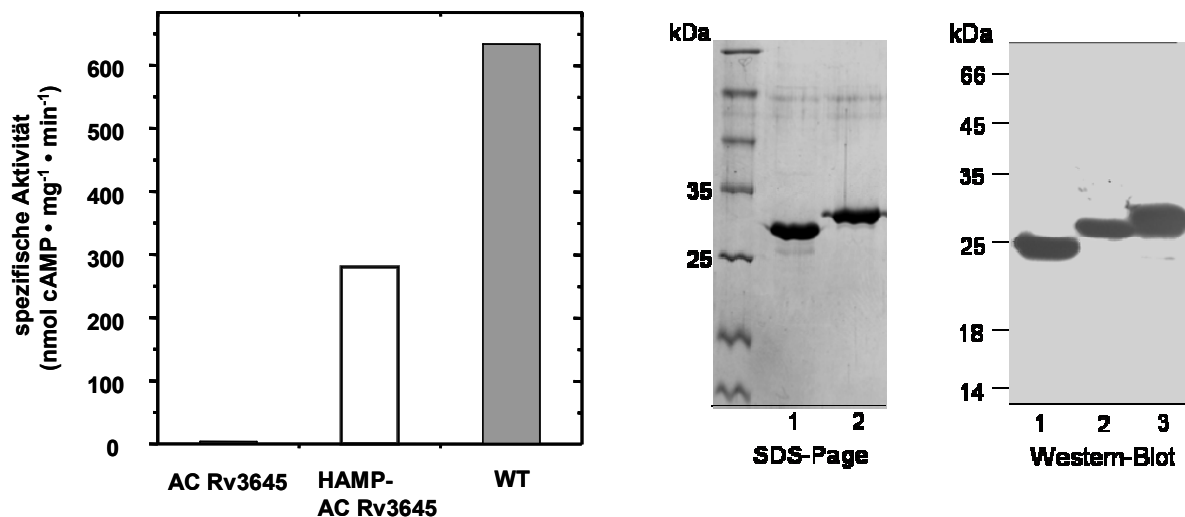


Abbildung 5-9 AC Aktivität und gereinigte Proteine WT, HAMP-AC Rv3645 und AC Rv3645.

Links: Säulendiagramm der spezifischen Aktivität der Konstrukte AC Rv3645, HAMP-AC Rv3645 (weiße Säule) und WT (graue Säule), Testbedingungen: Standard, je 5µg Protein

Mitte: SDS-Gel (15%): 1: 2,2µg HAMP-AC Rv3645 (30kDa); 2: 2,2µg WT (30,6kDa)

Rechts: Western-Blot, 1: AC Rv3645 (23,8kDa), 1,45µg Protein; 2: HAMP-AC Rv3645, 1,8µg Protein; 3: WT, 1,45µg Protein

Ergebnisse

Mit einer spezifischen Aktivität von $633 \text{ nmol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ist das Konstrukt WT 2,2fach aktiver als das Konstrukt mit der mykobakteriellen HAMP *Rv3645* ($280 \text{ nmol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Die AC *Rv3645* hat mit $4 \text{ nmol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ eine geringe Aktivität in Übereinstimmung mit den bisherigen Befunden (Linder, 2006; Linder et al., 2004).

5.2.2.2. Zeitabhängigkeit

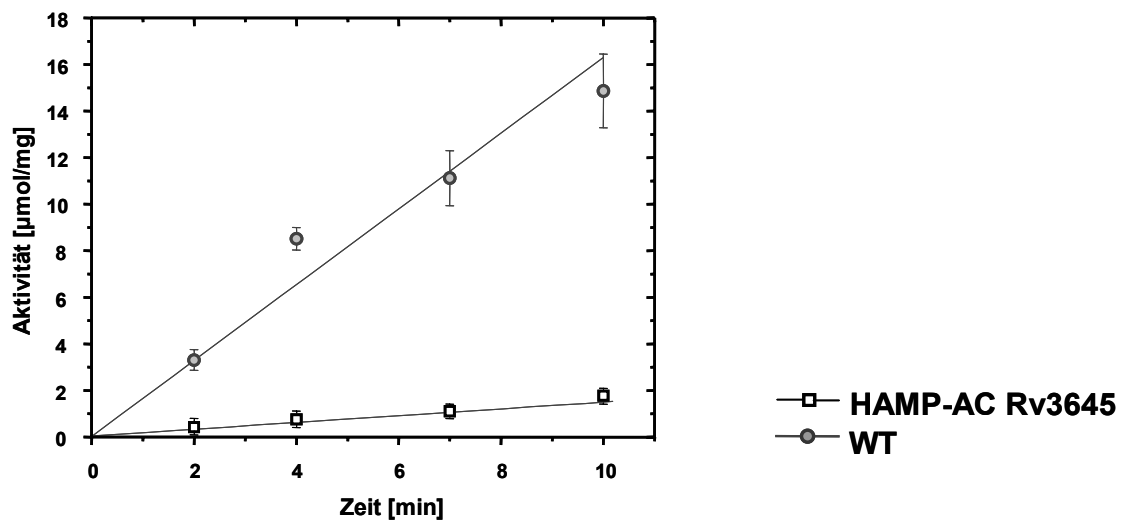


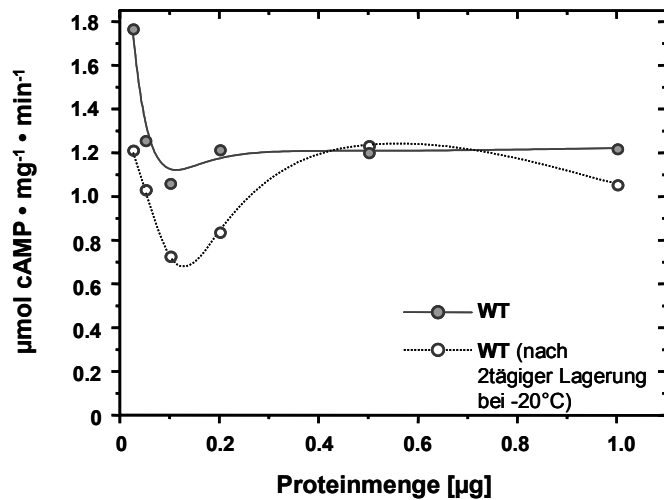
Abbildung 5-10 Zeitabhängigkeit von HAMP-AC Rv3645 und WT, n=4; Testbedingungen: Standard, 2-10min, Proteinmenge: je $0,5\mu\text{g}$

Der enzymatische Umsatz ist bei beiden Konstrukten linear mit der Zeit.

5.2.2.3. Proteinabhängigkeit WT

Für die Verdünnungen des Proteins wurde folgender Puffer hergestellt: 10mM Tris/HCl, pH 8,0, 50% Glycerol (87%). Die Proben konnten so bei -20°C eingefroren werden. Für jeden Test wurden frische Verdünnungen aus der Stammlösung hergestellt, die bei diesem Versuch eine Konzentration von $2,2\text{mg/ml}$ hatte. Aus dieser Proteinlösung wurden die Verdünnungen 1:40 und 1:4 hergestellt, diese waren die Ausgangslösungen, aus denen die benötigte Proteinmenge direkt pipettiert wurde.

Ergebnisse



Verdünnungsreihe WT	
Stammlösung: 2,2mg/ml	
1 : 40	1 : 4
0,45μl	1μl
1μl	2μl
1,8μl	
3,6μl	

Abbildung 5-11 Proteinabhängigkeit WT. Links: spezifische Aktivität [$\mu\text{mol cAMP}/(\text{mg}\cdot\text{min})$], Testbedingungen: Standard, $n=2$, Testbereich: 25-1000ng Protein. Rechts: Angabe der Verdünnungsreihe des Proteins WT, Tabelle.

Die Aktivität ist im Rahmen der üblichen experimentellen Schwankungen annähernd konstant. Für die Proteinkonzentrationen 25-100ng wurde eine Verdünnung der Stammlösung von 1:40 angefertigt, von der wiederum 0,45μl, 1μl und 1,8μl für den Test verwendet wurden. Es ist möglich, dass die Endverdünnung entweder ungenügend durchgemischt war oder bereits der Verdünnungsfaktor zu groß und damit die Ausgangsverdünnung zu ungenau, daher sind die Werte in diesem Bereich nicht konstant.

Zwischen 0,2 und 1μg Protein bleibt die spezifische Aktivität konstant bei 1,2 $\mu\text{mol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Es wurde eine Menge von 0,5μg Protein für alle weiteren Versuche festgelegt.

5.2.2.4. Kinetische Charakterisierung

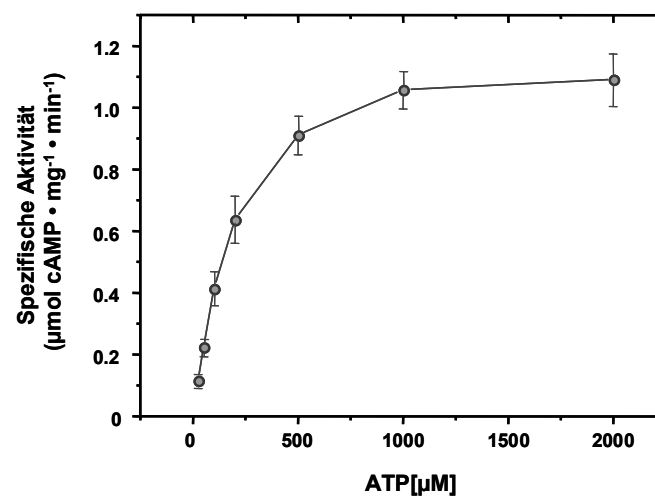


Abbildung 5-12 Substratkinetik von WT, Auftragung nach Michaelis-Menten, Testbedingungen: Standard, 0,5μg Protein, 25-2000μM ATP; $n=4$

Ergebnisse

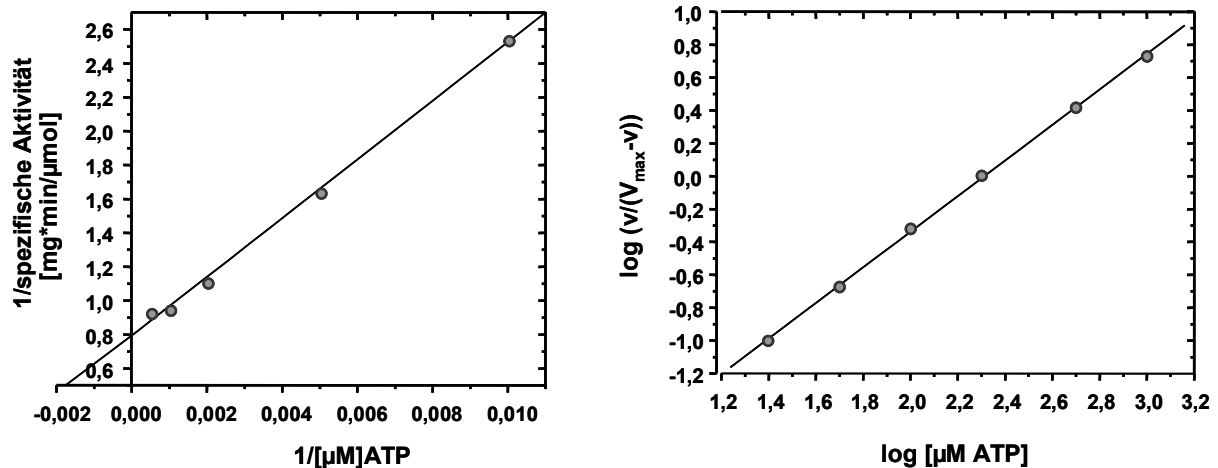


Abbildung 5-13 Substratkinetik von WT.

Links: Auftragung nach Lineweaver-Burk zur Bestimmung von V_{\max} und K_m ;
Geradengleichung: $y=0,793+173,23x$; $R=0,99886$

Rechts: Hill-Plot; $y=-2,5 + 1,082x$, $R=0,9997$

WT zeigt eine Substratabhängigkeit nach dem Michaelis-Menten-Modell. Die Berechnung nach Lineweaver-Burk ergibt eine V_{\max} von $1296 \pm 96 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Damit liegt die spezifische Aktivität des WT deutlich über der AC Aktivität von HAMP-AC Rv3645 ($590 \pm 10 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, Daten von PD Dr. J. Linder). Der Unterschied ist statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$). Mit einer K_m von $229 \pm 60 \mu\text{M}$ besitzt der WT eine höhere Substrataffinität als HAMP-AC Rv3645 ($2700 \pm 100 \mu\text{M}$). Der Hill-Koeffizient von 1,082 für WT deutet nicht auf positive Kooperativität hin im Gegensatz zu HAMP-AC Rv3645 mit einem Hill-Koeffizienten von 1,4 (Daten zu HAMP-AC Rv3645 aus (Linder et al., 2004)).

Somit ist gezeigt, dass die HAMP-Domäne aus *Afl503* in Kombination mit einem nachgeschalteten Effektor, hier Rv3645 AC, eine enzymatisch aktive Chimäre bildet.

Im Folgenden wird untersucht, ob die gelöste NMR-Struktur der HAMP *Afl503* den angeschalteten Zustand der Chimäre repräsentiert und durch welche Mutationen in der HAMP-Domäne eine weniger aktive Chimäre erhalten werden kann.

5.3. Mutationsstudien der HAMP Af1503 via AC Rv3645 und kinetische Charakterisierung

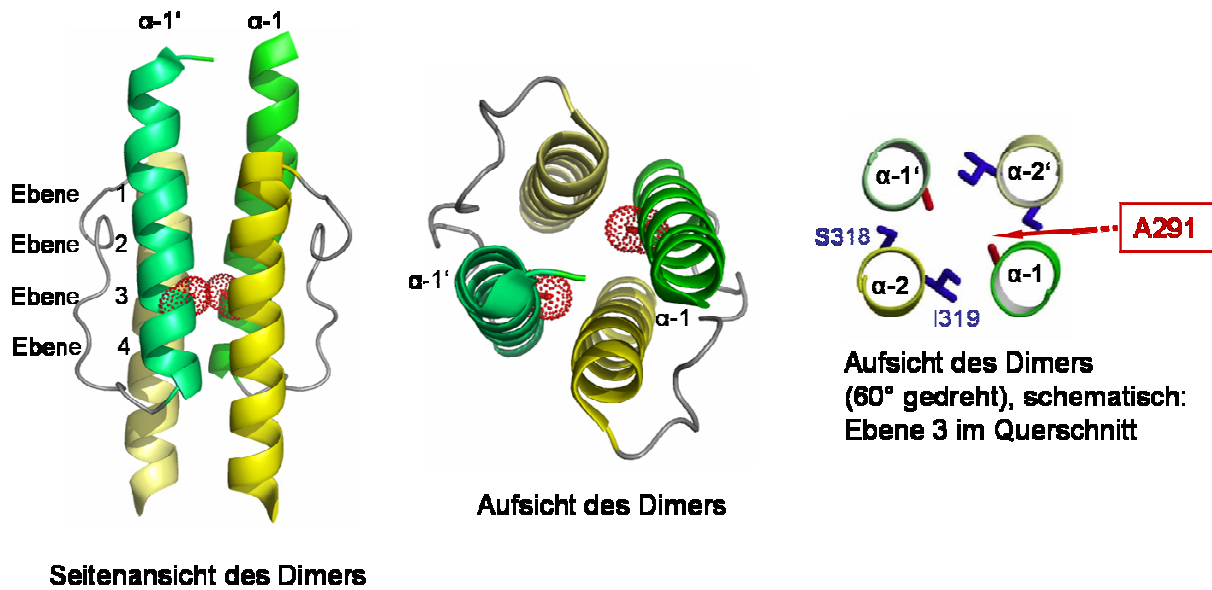


Abbildung 5-14 Seitenansicht, Aufsicht und Querschnitt des Dimers von HAMP Af1503.

Links: Bandmodell des Dimers, Seitenansicht. Kräftiges grün: α -Helix 1, kräftiges gelb: α -Helix 2, das zweite Monomer in blasseren Farben (wie Abb. 5.6); Ebenen 1-4 sind angeschrieben. Rot: A291 der α -Helices 1 und 1' in Ebene 3 als Atommodell mit Van-der-Waals-Radius dargestellt. Leicht taillierte Form des Dimers erkennbar.

Mitte: Aufsicht Dimer, Farben wie links. Die räumliche Situation im Inneren des Bündels wird sichtbar: von 'oben' (Ebene 1) nach 'unten' (Ebene 4) wird der innere Raum enger; rot: A291 auf Ebene 3, wie links.

Rechts: schematischer Querschnitt des Dimers (Mitte), um 60° nach rechts gedreht. Die Vogelperspektive zeigt die Anordnung der AS auf Ebene 3 in der komplementären *x-da* Packung (Farbgebung der Helices wie links). Blau: S318/I319 der α -Helix 2, die sich zur Nachbarhelix orientieren und rot: A291, das direkt nach Innen zeigt (links und Mitte als Atommodell dargestellt). So formt der interagierende Ring von AS-Resten eine knobs-into-knobs Packung. Hervorgehoben ist A291; Abbildung aus (Hulko et al., 2006).

In der Seitenansicht des Dimers (Abbildung 5-14, links) ist ersichtlich, dass die Struktur des HAMP Af1503-Dimers in Ebene 3 und 4 eine leicht taillierte Form annimmt. Durch die Perspektive in Abbildung 5-14, Mitte, die das Innere des tetrahelicalen Bündels zeigt, wird deutlich, dass die innere Röhre enger wird und somit ein Platzproblem für AS mit größeren Seitenkettenvolumina darstellt (hier angedeutet durch den Van-der-Waals-Radius des Ala auf Ebene 3). Bei Betrachtung der AS-Anordnung im Inneren des Bündels (Abbildung 5-14, rechts) fällt Ala291 auf. Die Methylgruppe von Ala291 passt hier, während grössere Seitenketten möglicherweise keinen Platz haben. Aus der Literatur ist bekannt, dass AS mit weniger voluminösen Seitenkettenresten an dieser Position die knobs-into-knobs Anordnung favorisieren (Gernert et al., 1995; Lupas and Gruber, 2005).

Mutationen dieses Ala zu AS mit voluminöseren Seitenketten wurden an der HAMP-Domäne der nitratabhängigen Histidinkinase NarX aus *E. coli* untersucht. A189V resultierte hier in

Ergebnisse

einer Reduktion der β -Galaktosidase Aktivität (Testsystem) in Anwesenheit von Nitrat (Appleman and Stewart, 2003). Dieselbe Mutation wurde in der HAMP-Domäne des Osmosensors EnvZ aus *E. coli* durchgeführt. EnvZ ist ein Membranprotein bestehend aus periplasmatischer Rezeptordomäne, zwei Transmembranspannen, HAMP-Domäne und Signaldomäne (Histidinkinase). EnvZ kontrolliert die Aktivität von OmpR, das die Transkription von OmpF und OmpC reguliert (Omp: Outer membrane proteins). Die Mutation A193V (HAMP_{EnvZ}) resultierte in einer Veränderung der Expression von OmpF und OmpC und damit veränderter Osmoregulation (Park and Inouye, 1997; Tokishita et al., 1992). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden an Position 291 der HAMP *Afl503* Einzelpunktmutationen mit AS durchgeführt, die unterschiedliche Seitenkettenvolumina besitzen. Da das *Afl503* Dimer durch Drehung um 26° zwischen kanonisch und *x-da*-Konformation oszillieren kann, stellte sich die Frage, ob durch eine Änderung des Seitenkettenvolumens an der Position A291 die Drehbarkeit beeinträchtigt wird und als Folge davon die Aktivität der Rv3645 AC. Ob die AC Aktivitäten in der Lage sind, die Beeinträchtigung der Drehbarkeit wiederzugeben, soll im Folgenden untersucht werden.

5.3.1. A291V

Mit Chemotaxis-Versuchen der Arbeitsgruppe A. Lupas, die die HAMP-Domäne des Tar-Rezeptors durch die HAMP *Afl503* ausgetauscht haben, wurde gezeigt, dass Zellen, die an Position 291 Valin anstelle von Alanin enthalten, ihr Schwimmverhalten änderten. Daher wurde Position 291 zuerst von Alanin nach Valin mutiert und in Kombination mit der Cyclase getestet. Die Substratabhängigkeit von A291V:

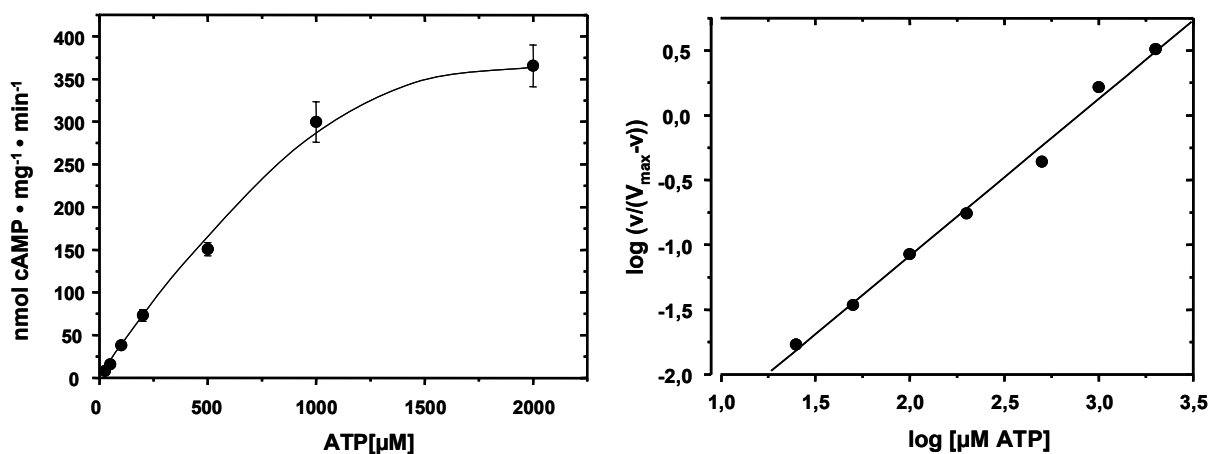


Abbildung 5-15 Substratabhängigkeit von A291V.

Links: Substratkinetik nach Michaelis-Menten, $n=4$, Testbedingungen: Standard, $0,5\mu\text{g}$ Protein, $25\text{-}2000\mu\text{M}$ ATP; rechts: Hill-Plot, $y = -3,5066 + 1,211x$; $R = 0,9968$

Ergebnisse

Eine Auswertung nach Lineweaver-Burk war nicht möglich, da die Gerade durch den Ursprung verlief. Daher wurde V_{\max} über den Hill-Plot ermittelt (Hill-fitting). A291V verminderte V_{\max} von $1296 \pm 96 \text{ nmol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ auf $486 \pm 11 \text{ nmol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Im Vergleich zu WT ist der Aktivitätsunterschied hoch signifikant ($p < 0,01$).

Mit einem K_m Wert von $752 \pm 105 \mu\text{M}$ ist die Affinität zu ATP deutlich höher als bei HAMP-AC Rv3645 ($2700 \mu\text{M}$). Der Hill-Koeffizient von 1,2 deutet kaum auf positive Kooperativität.

Die Zeitabhängigkeit war linear, Abbildung 5-16, links.

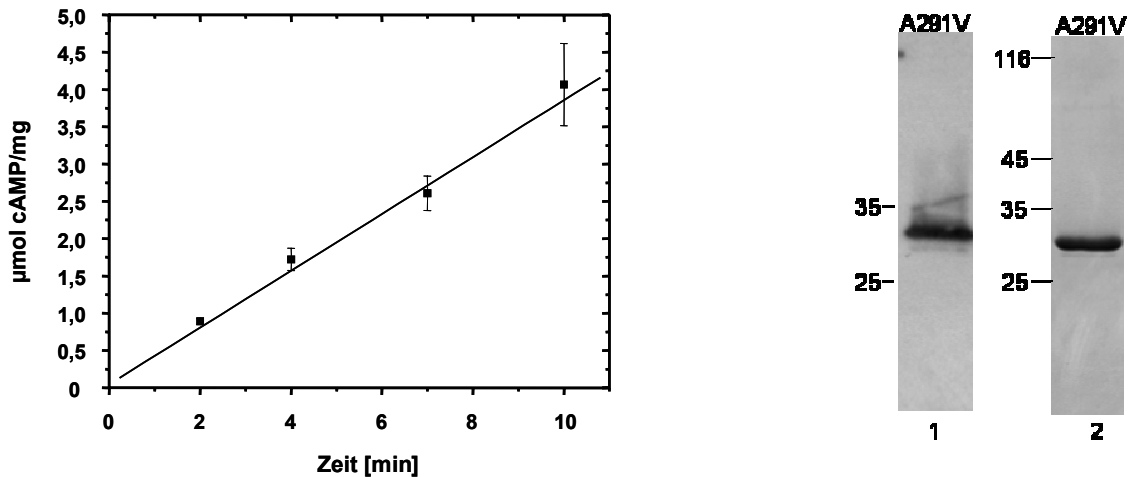


Abbildung 5-16 Zeitabhängigkeit, SDS-Gel (15%) und Western-Blot von A291V.

Links: Zeitabhängigkeit A291V, $n=4$, Testbedingungen: Standard; 2-10min, $0,5 \mu\text{g}$ Protein; rechts: 1: Western-Blot A291V (122ng Protein) und 2: SDS-Gel: A291V ($1,22 \mu\text{g}$ Protein)

5.3.2. A291C

Eine bereits in in-vivo getestete Mutante war A291C.

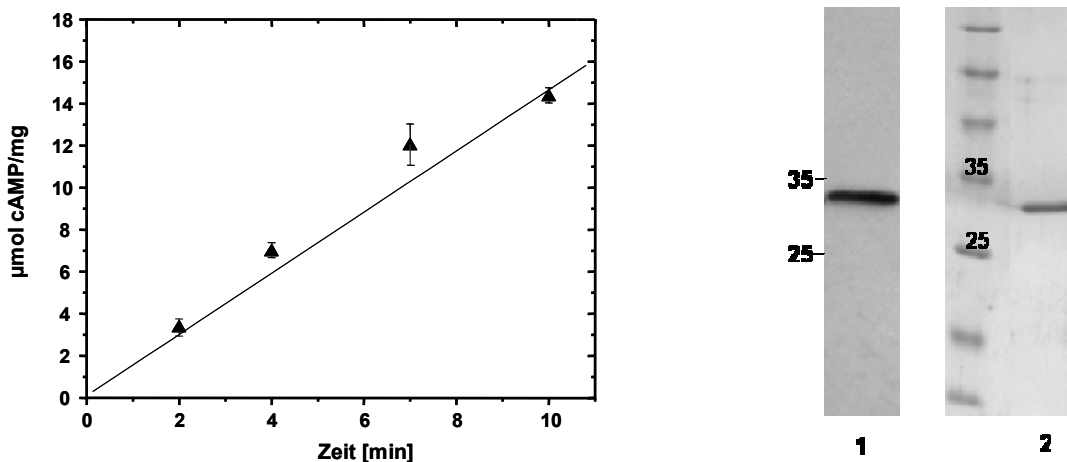


Abbildung 5-17 Zeitabhängigkeit von A291C und gereinigtes Protein A291C.

Links: Zeitabhängigkeit, $n=4$, Testbedingungen: Standard, 2-10min, $0,5 \mu\text{g}$ Protein. Rechts: 1: Western-Blot von A291C (60ng Protein); 2: SDS-Gel mit $0,8 \mu\text{g}$ Protein

Ergebnisse

Die Zeitabhängigkeit der Mutante war linear (Abbildung 5-17, links).

Die Substratabhängigkeit von A291C:

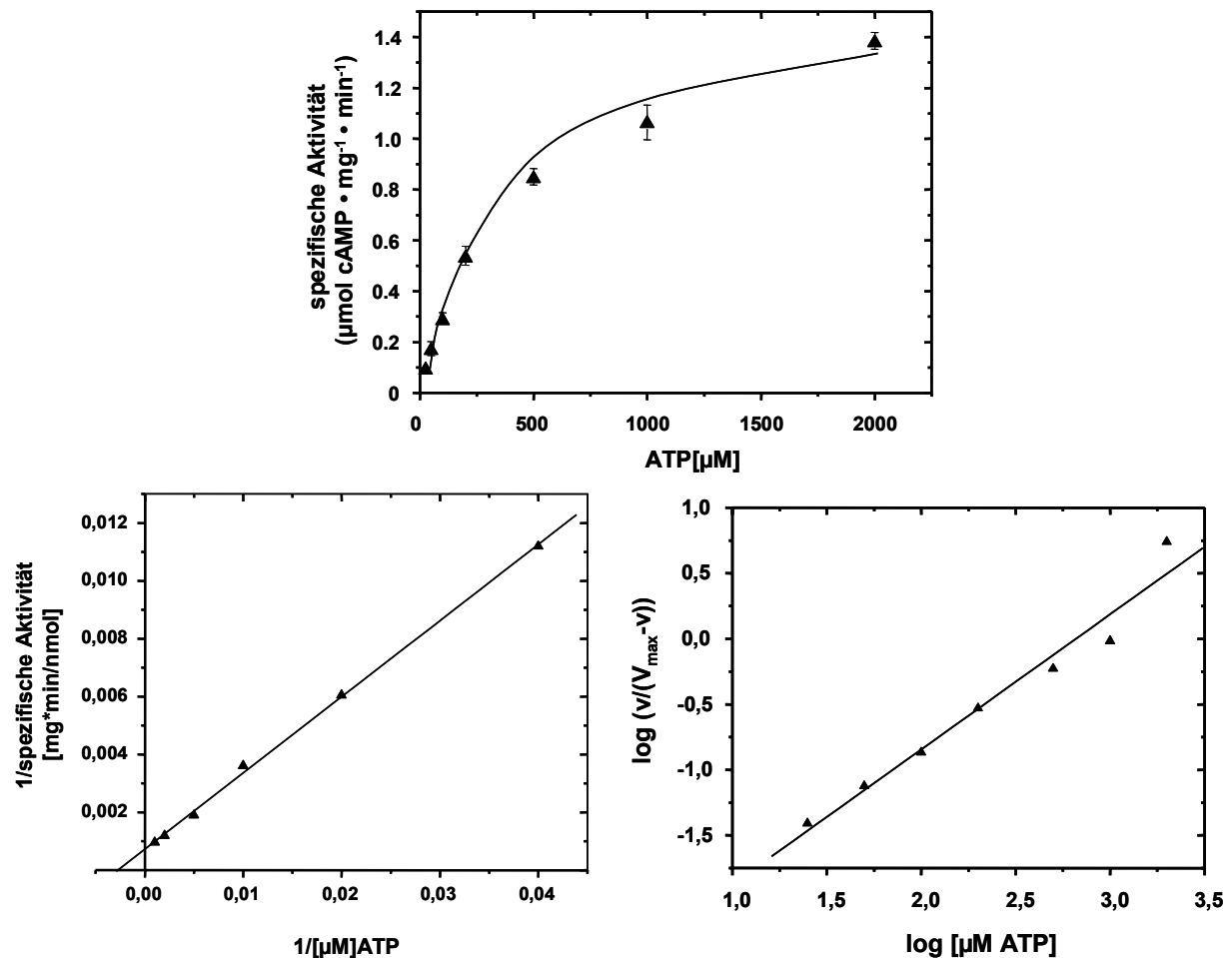


Abbildung 5-18 Kinetik von A291C, Testbedingungen: Standard, 0,5 μg Protein, n=4.
Oben Mitte: Michaelis-Menten-Substratkinetik, 25-2000 μM ATP.
Unten links: Lineweaver-Burk-Darstellung: $y=7,249 \cdot 10^{-4}+0,26333x$; $R=0,9993$.
Unten rechts: Hill-Plot: $y=-2,9031+1,02966x$; $R=0,9816$.

Mit einer V_{max} von $1730 \pm 100 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ist A291C 1,3mal aktiver als der WT. K_m ($520 \pm 90 \mu\text{M}$) zeigt eine 5fach höhere Substrataffinität als HAMP-AC Rv3645 ($2700\mu\text{M}$). Hill-Koeffizient: $1,0 \pm 0,1$, d.h. keine Kooperativität.

Da die Daten widersprüchlich zu den Ergebnissen des Chemotaxis-assay waren, wurde zusätzlich ein Test mit 1mM 1,4-Dithiothreitol durchgeführt, um oxidative Vorgänge auszuschließen (Abbildung 5-19, links).

Auch die pH-Abhängigkeit wurde bestimmt (Abbildung 5-19, rechts). Da die Cyclase Rv3645 nur von pH 7.0-8,5 aktiv ist (Hammer, 2004), wurde nur dieser Bereich getestet.

Ergebnisse

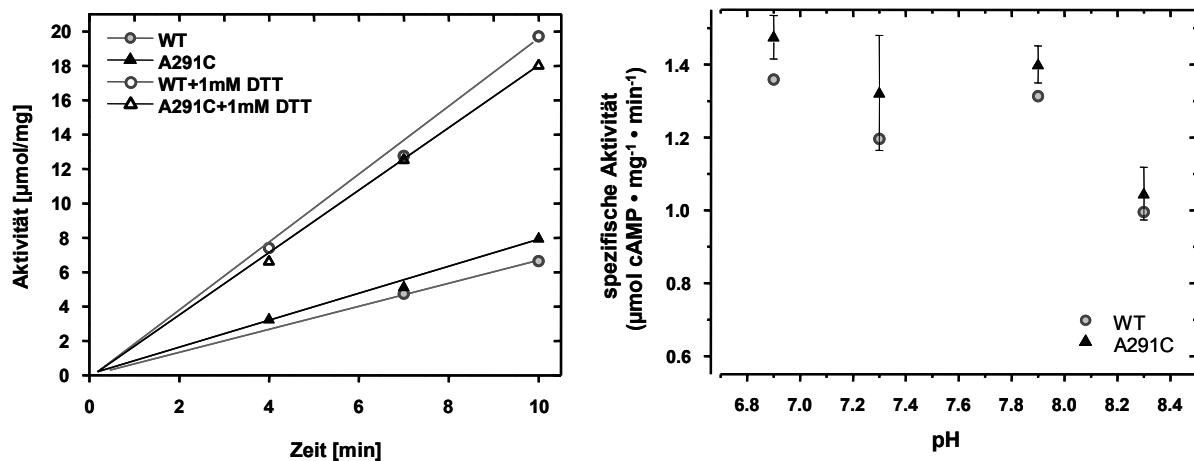


Abbildung 5-19 Zeitabhängigkeit A291C und WT \pm 1mM DTT. pH-Abhängigkeit von WT und A291C.

Links: Zeitabhängigkeit WT und A291C \pm 1mM DTT-Zugabe, Testbedingungen: Standard, 2-10min, n=2 (SEMs nicht gezeigt); je 0,5 μg Protein (kein frisches Protein).

Rechts: pH-Abhängigkeit WT und A291C, Testbedingungen: Standard, pH 6,9 bis 8,3, pH-Werte bei T=37°C angegeben, n=2.

Auf DTT reagieren beide Proteine mit einer 2,5fachen Aktivitätssteigerung (Abbildung 5-19, links). Allerdings waren beide Proteine bei diesem Test bereits 4 Tage alt, was zu einem AC Aktivitätsverlust von 50% der ohne DTT getesteten Proteine führte (Verlust im Vergleich zu frisch gereinigtem Protein). Verglichen mit frisch präpariertem Protein beträgt die Aktivitätssteigerung durch DTT 1,3. Möglicherweise hat DTT einen Einfluss auf die Ausbildung von Oligomeren (s. 5.4.2 und 5.4.3).

Bei unterschiedlichen pH-Werten ergeben sich keine nennenswerten Unterschiede der spezifischen Aktivität (Abbildung 5-19, rechts).

5.3.3. A291G

Glycin ist die kleinste Aminosäure. Sie ist achiral und besitzt keine Seitenkette. Daher ist Gly häufig an Positionen konserviert, die kritisch für die molekulare Beweglichkeit zu sein scheinen. Hier wurde vielleicht eine erhöhte, erleichterte Art der Rotation erwartet. Die Abhängigkeit von der Zeit war auch hier linear (Daten nicht gezeigt). Kinetische Auswertung:

Ergebnisse

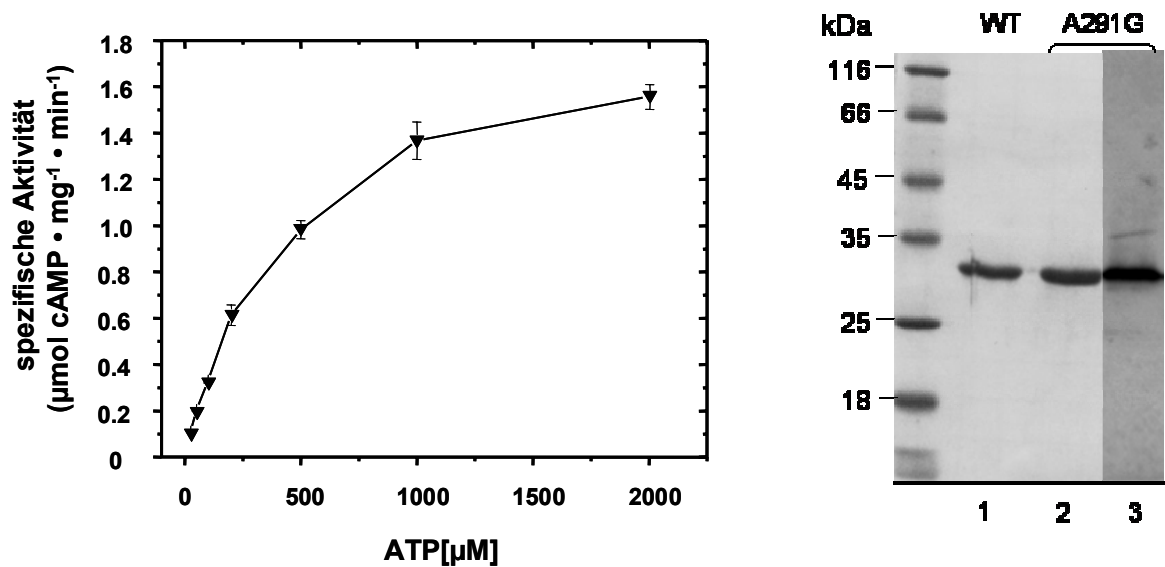


Abbildung 5-20 Substratkinetik und gereinigtes Protein A291G.

Links: Substratabhängigkeit, Auftrag nach Michaelis-Menten, Testbedingungen: Standard, 0,5 μg Protein, 25-2000 μM ATP; n=4.

Rechts: 1 und 2: SDS-Gel (15%), WT (0,9 μg Protein) und A291G (1 μg Protein); 3: Western-Blot A291G, 0,1 μg Protein.

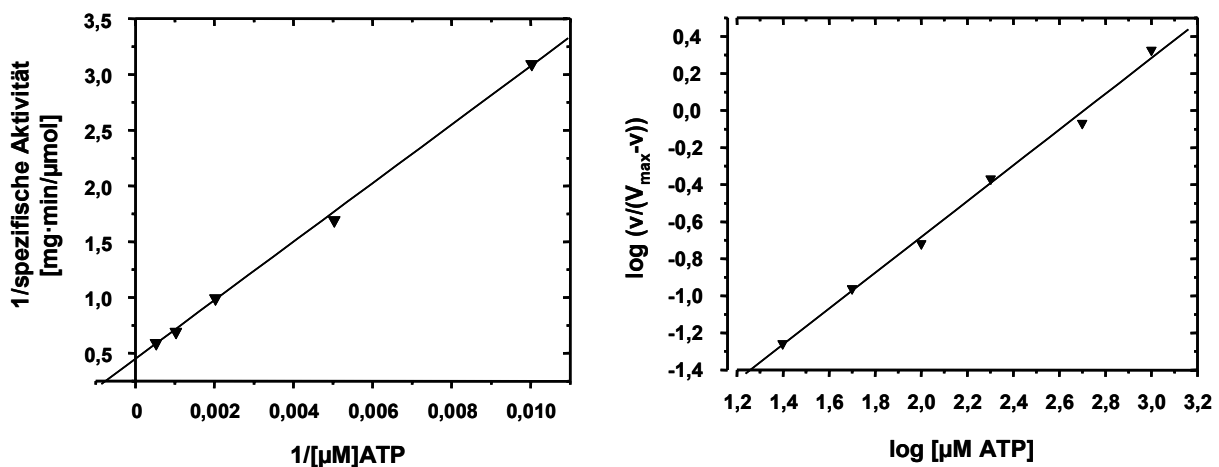


Abbildung 5-21 Substratkinetik A291G.

Links: Darstellung nach Lineweaver-Burk; Geradengleichung $y=0,48957+251,99x$; $R=0,9984$

Rechts: Auftragung nach Hill: $y=-2,61579+0,99652x$; $R=0,9978$

V_{max} von A291G ist mit $2064 \pm 133 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 1,6fach höher als beim WT. Die Substrataffinität ($523 \pm 53 \mu\text{M}$) ist ähnlich wie bei A291C.

Somit scheint die Beweglichkeit der HAMP-Domäne durch die kleinste AS an Position 291 gestiegen zu sein und die Vermutung einer erleichterten Rotation bestätigt. Alle bisherigen Parameter zum Vergleich s. Tabelle 5-2.

Ergebnisse

5.3.4. A291I

Mit den folgenden Aminosäuren wurde das Volumen der Seitenketten systematisch vergrößert. Da bisher die Reaktion linear mit der Zeit war, wurde auf eine erneute Zeitabhängigkeit verzichtet. Es wurden lediglich die kinetischen Eigenschaften der jeweiligen Mutanten bestimmt.

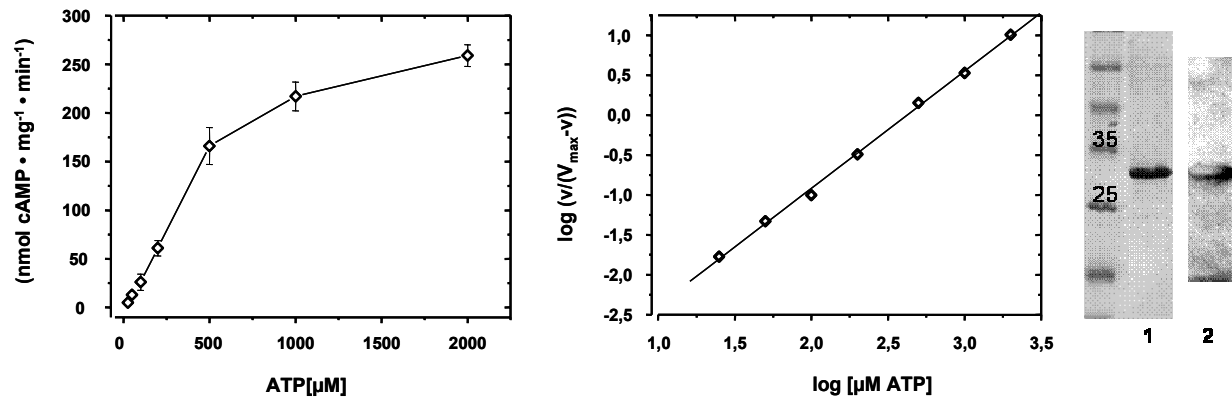


Abbildung 5-22 Substratkinetik und gereinigtes Protein A291I.

Links: Michaelis-Menten-Substratkinetik, Testbedingungen: Standard, 0,5μg Protein, 25-2000μM ATP; n=4

Mitte: Hill-Plot; $y = -3,85359 + 1,46757x$; $R = 0,999$

Rechts: 1: SDS-Gel mit 1,7μg Protein; 2: Western-Blot: 80ng Protein

Zusammenfassung der kinetischen Eigenschaften der bisherigen Mutanten:

Konstrukt	V _{max} (nmol cAMP · mg ⁻¹ · min ⁻¹)	K _m /SC ₅₀ (μM)	Hill-Koeffizient
WT	1296 ± 96	229 ± 60	1.1 ± 0.1
A291V	486 ± 11	752 ± 105	1.2 ± 0.0
A291C	1730 ± 100	520 ± 90	1.0 ± 0.1
A291G	2064 ± 133	523 ± 53	1.0 ± 0.1
A291I	281 ± 11	409 ± 27	1.5 ± 0.0

Tabelle 5-2 Übersicht der kinetischen Parameter von WT und Mutanten 5.3.1-4

Im Vergleich zum WT ist mit $V_{\max} = 281 \pm 11$ nmol cAMP · mg⁻¹ · min⁻¹ die AC Aktivität von A291I um den Faktor 4,6 gesunken, auch ist sie nur noch halb so aktiv wie A291V. Die Mutante zeigt ansatzweise positive Kooperativität.

Ergebnisse

5.3.5. A291L

Die Mutation zu Leucin zeigte keine großen Unterschiede in V_{\max} zu A291I; die kinetischen Parameter dieser Mutante wurden ebenfalls über Hill-fitting bestimmt.

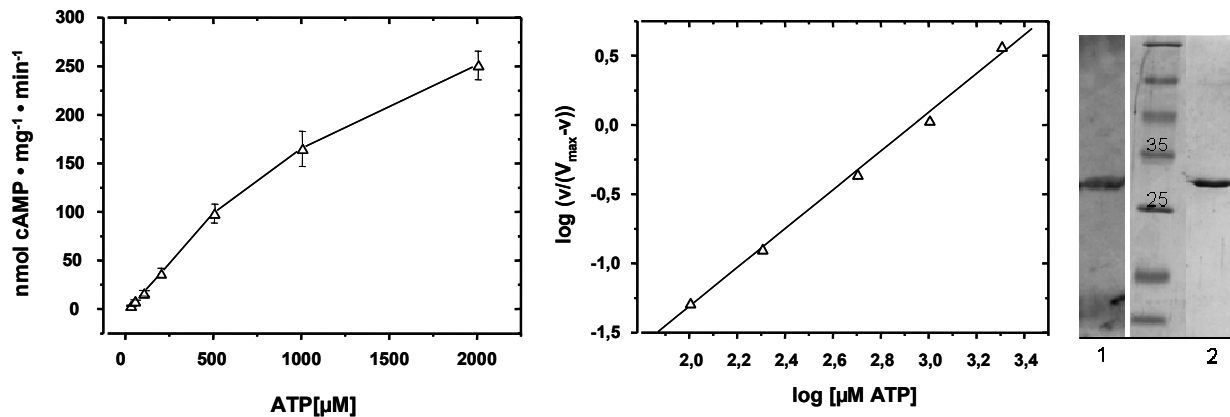


Abbildung 5-23 Substratabhängigkeit und gereinigtes Protein A291L. Links: Auftrag nach Michaelis-Menten, Testbedingungen: Standard, 0,5μg Protein, 25-2000μM ATP; n=4

Mitte : Hill-Plot, $y=-4,1169+1,4029x$; $R=0,998$

Rechts: 1-Western-Blot mit 0,11μg Protein, SDS-Gel mit 1,1μg Protein

V_{\max} beträgt 319 ± 11 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, die Substrataffinität bei A291L ist niedriger als bei A291I: 878 ± 41 μM vs. 409 ± 27 μM. Sie ist gegenüber dem WT um den Faktor 4 erhöht.

5.3.6. A291F

Die Spekulation, ob durch Einführen eines aromatischen Ringes die Anordnung der Helices soweit verändert werden kann, dass die Aktivität noch weiter sinkt, wird im Folgenden untersucht:

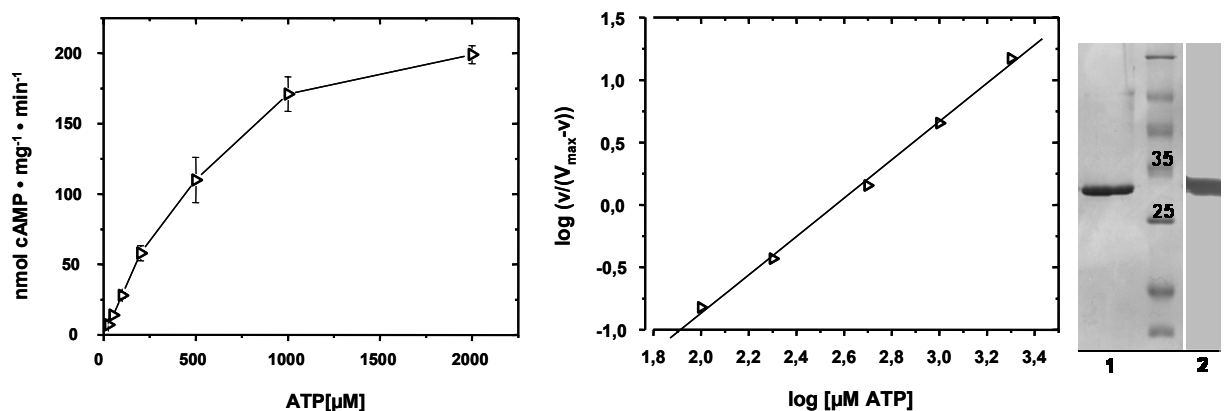


Abbildung 5-24 Substratkinetik, SDS-Gel und Western-Blot von A291F.

Links: Michaelis-Menten-Substratkinetik, n=6, Testbedingungen: Standard, 0,5μg Protein, 25-2000μM ATP

Mitte: Hill-Plot, $y=-3,9886+1,5356x$, $R=0,9985$, Hill-Koeffizient: 1,5

Rechts: 1- SDS-Gel (0,8μg Protein); 2- Western-Blot mit 1,2μg Protein

Ergebnisse

Mit einer V_{\max} von $213 \pm 8 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (gefittet aus dem Hill-Plot), ist die Mutante zwar nicht inaktiv, liegt aber unter der AC Aktivität von A291I ($281 \pm 11 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, vgl. Tabelle 5-2). Verglichen mit dem WT ist die spezifische Aktivität sechsfach niedriger. Im Gegensatz zur verminderten Aktivität ist die Affinität zu ATP nicht beeinträchtigt ($368 \pm 17 \mu\text{M}$). NMR-Studien dieser HAMP-Mutante (nur der HAMP-Domäne) der Kooperationspartner zeigten, dass die Konformation des Homodimers *zum Teil antiparallel* vorliegt, in einem geschätzten Gleichgewicht von 1:1.

5.3.7. A291W

Den größten Seitenkettenrest aller AS hat Tryptophan.

A291W zeigte nicht das übliche Substratsättigungsverhalten (Michaelis-Menten).

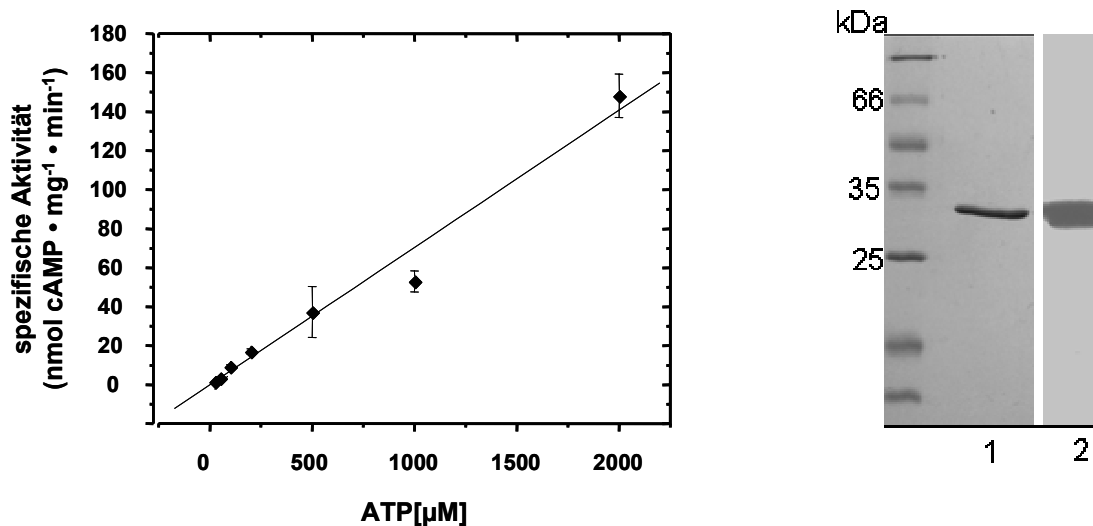


Abbildung 5-25 Substratabhängigkeit und gereinigtes Protein A291W.

Links: Substratabhängigkeit A291W, n=4. Testbedingungen: Standard, 0,5μg Protein, 25-2000μM ATP. Man beachte, dass bis 2mM ATP kein Übergang in den Sättigungsbereich erkennbar ist.

Rechts: 1- SDS-Gel (0,9μg Protein); 2- Western-Blot mit 1,1μg Protein

Da bei 2mM ATP die Gerade noch steil ansteigt, wurde in weiteren Versuchen ATP bis auf 4mM erhöht, um zu sehen, ob sich Sättigung einstellt (Abbildung 5-26).

In gleichen Konzentrationen wurde ab 0,5mM ATP die Mn^{2+} -Konzentration erhöht (was allerdings keinen Effekt hatte; nicht gezeigt). Der WT als Kontrolle wurde durch 4mM ATP auf 77% der maximalen Aktivität reduziert (\pm zusätzlichem Mn^{2+} ; Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

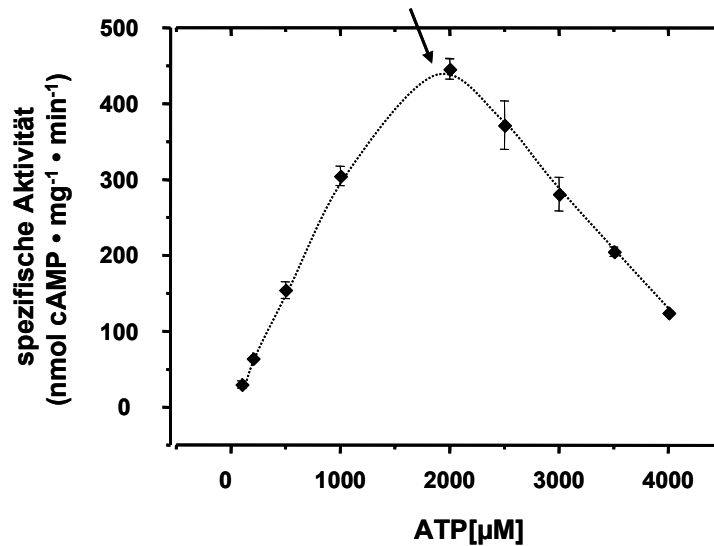


Abbildung 5-26 Substratabhängigkeit A291W, 0,1-4mM ATP, ab 2mM ATP in 0,5molar Abständen, Testbedingungen: Standard, 0,5μg Protein, n=4. Der Pfeil deutet auf die optimale Aktivität $V_{opt} = 446 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Es stellte sich keine Substratsättigung ein. Man kann lediglich die optimale Aktivität angeben, hier $V_{opt} = 446 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, d.h. 34% Restaktivität im Vergleich mit WT.

Möglicherweise würden in diesem Fall weitere Verdünnungen des Proteins zu genaueren Ergebnissen führen, da die Präparation aber ohnehin instabil war (nach 2tägiger Lagerung sank die Basalaktivität bereits auf ein drittel) und auch mittels NMR die Struktur der HAMP-Mutante nicht erfasst werden konnte, wurden diese Versuche unterlassen.

Ergebnisse

5.3.8. Zusammenfassung der Einzelmutationen an Position A291

Konstrukt ²	V_{\max} (nmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	K_m/SC_{50} (μ M)	Seitenkettenvolumen (\AA^3)	Hill- Koeffizient
WT (A291)	1296 \pm 96	229 \pm 60	28.5	1.1 \pm 0.1
A291G	2064 \pm 133	523 \pm 53	0	1.0 \pm 0.1
A291C	1730 \pm 100	520 \pm 90	48.4	1.0 \pm 0.1
A291V	486 \pm 11	752 \pm 105	79.9	1.2 \pm 0.0
A291L	319 \pm 11	878 \pm 41	106.6	1.4 \pm 0.1
A291I	281 \pm 11	409 \pm 27	106.6	1.5 \pm 0.0
A291F	213 \pm 8	368 \pm 17	129.8	1.5 \pm 0.1
A291W	$V_{opt} = 446$	-	167.7	-

Tabelle 5-3 Übersicht Ergebnisse Kap.5.2.2 und 5.3 (1-7)

Auffällig ist, dass nicht nur beim WT, sondern durchgängig bei allen Mutanten die Substrataffinität um ein Vielfaches niedriger ist als bei HAMP-AC Rv3645 ($SC_{50} = 2700 \pm 100 \mu\text{M}$). Die HAMP-Domäne aus *A. fulgidus* orientiert die katalytischen Domänen der AC Rv3645 offenbar so, dass auch ohne weitere Aktivatoren eine hohe Substrataffinität erzeugt wird. Mit einer niedrigeren AC Aktivität geht nicht eine niedrige Substrataffinität einher (Tabelle 5-3); statistische Relevanz s. Tabelle 5-4. Die Unterschiede zwischen diesen Parametern ergeben sich wahrscheinlich durch das Verhalten der HAMP gegenüber der Cyclase. Es wird angenommen, dass die HAMP-Domäne sich bevorzugt in zwei Zuständen: angeschaltet oder ausgeschaltet befindet (Hulko et al., 2006). Damit lassen die V_{\max} -Werte von WT und den Mutanten A291C und A291G die Vermutung zu, dass die Proteine sich wahrscheinlich im angeschalteten Zustand befinden. Bei Mutanten mit größeren Seitenkettenvolumina an Position A291 verschiebt sich das Verhältnis angeschaltet/ausgeschaltet zunehmend in den ausgeschalteten Zustand.

Die Mutanten A291L, A291I und A291F zeigen ansatzweise positive Kooperativität.

² hier ist nur der Name der jeweiligen Mutation aufgeführt, Rv3645AC wird nicht jedes Mal erwähnt

Ergebnisse

Statistische Auswertung von V_{\max} und K_m :

	V_{\max}	A291G	A291C	A291V	A291L	A291I	A291F	V_{\max}
K_m		**	*	**	**	**	**	WT
A291G	*		p>0,05	***	***	***	***	A291G
A291C	*	p>0,05		***	***	***	***	A291C
A291V	*	p>0,05	p>0,05		***	***	***	A291V
A291L	***	**	*	p>0,05		p>0,05	***	A291L
A291I	*	p>0,05	p>0,05	*	***		**	A291I
A291F	p>0,05	p>0,05	p>0,05	*	***	p>0,05		V_{\max}
K_m	WT	A291G	A291C	A291V	A291L	A291I	K_m	

Tabelle 5-4 Statistik der kinetischen Parameter von WT und Mutanten. Die Art der Signifikanz ist mit Sternen angegeben: *statistisch signifikant, $p<0,05$. ** statistisch hoch signifikant, $p<0,01$ und ***statistisch höchst signifikant, $p<0,001$. Nicht signifikant: $p>0,05$. Hellgrau unterlegt: Statistik von V_{\max} , dunkelgrau unterlegt: Statistik von K_m , die leeren Kästchen teilen die Tabelle diagonal.

V_{\max} : in ihren AC Aktivitäten unterscheiden sich alle Mutanten signifikant vom WT (Art der Signifikanz s. Tabelle 5-4, hellgrau unterlegt). Bis auf A291I/A291L und A291G/A291C sind auch die Mutanten untereinander signifikant unterschiedlich.

K_m : nur A291F unterscheidet sich nicht signifikant von WT (Art der Signifikanz s. Tabelle 5-4, dunkelgrau). Die Signifikanz der K_m -Werte der Mutanten untereinander ist nicht so ausgeprägt wie bei V_{\max} .

Die AC Rv3645 ist also in der Lage, die Beeinträchtigung der Drehbarkeit der HAMP-Helices bzw. die Folge von Mutationen in der HAMP-Domäne wiederzugeben. Die angesprochene Abhängigkeit der AC Aktivität bzw. Drehung der HAMP-Domäne vom Seitenkettenvolumen an Position A291 konnte bewiesen werden, denn das Volumen der Seitenketten der AS korreliert direkt mit der spezifischen Aktivität der Konstrukte, mit Ausnahme von A291C:

Ergebnisse

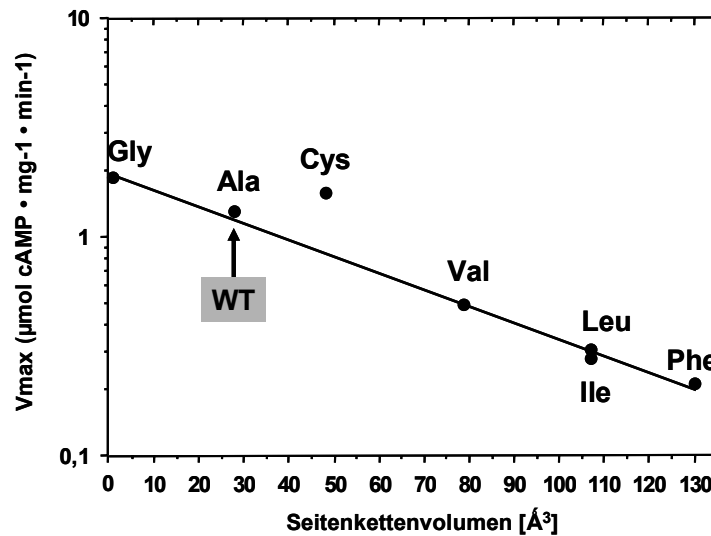


Abbildung 5-27 Korrelation der V_{\max} mit dem Seitenkettenvolumen der AS an Position 291 der *Af1503* HAMP-Domäne (Hulko et al., 2006).

Die angegebenen AS beziehen sich auf die Mutationen des WT an Position 291. Die Gerade zeigt die Abnahme der V_{\max} mit zunehmendem Seitenkettenvolumen der AS an Position 291. Cys bildet die einzige Ausnahme und ist mit dem Chemotaxis-assay nicht im Einklang (5.3.2).

5.3.9. Die x-Positionen – Versuch einer Charakterisierung

In diesem Kapitel war die Frage, ob Alanin an den anderen x -Positionen verträglich ist.

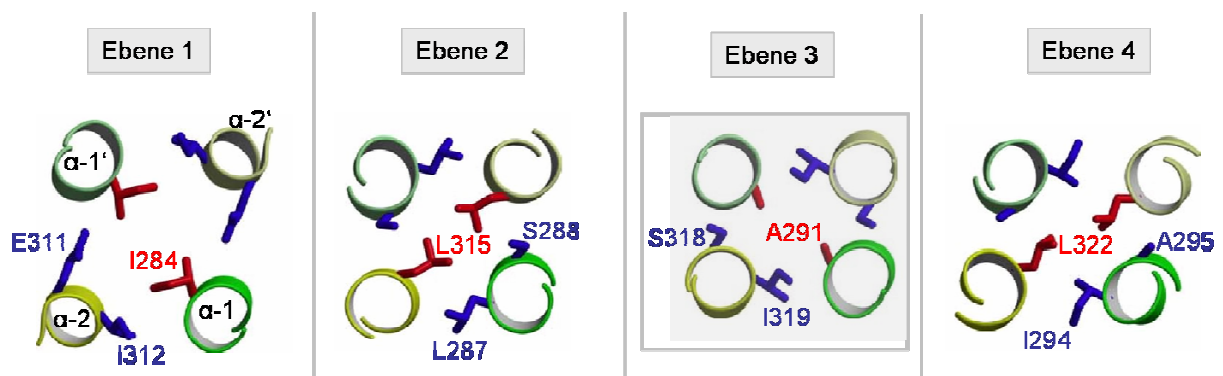


Abbildung 5-28 Querschnitt durch die Ebenen 1-4 des HAMP *Af1503*-Dimers. Ansicht von oben. Modelldarstellung der komplementären x -da Anordnung im Kernstück des Dimers.

Die Helices sind in Form von offenen Kreisen dargestellt (um die Rotation zu andeuten): grün: α -Helix 1, gelb: α -Helix 2, α -1' und α -2' in den entsprechend blässeren Farben. Rote Stifte: die entsprechenden x -Positionen auf allen vier Ebenen, die ins Innere zeigen, Angabe der AS. Blaue Stifte: die jeweiligen AS, die zur Nachbarhelix zeigen, Angabe der AS. Grau eingerahmt: Ebene 3, deren x -Position A291 in Kap. 5.3.1-7 untersucht wurde.

Ergebnisse

In Abbildung 5-28 ist ein Querschnitt durch die tetrahelicale Anordnung der *Af1503* HAMP auf allen vier Ebenen dargestellt. Durch die Ansicht von oben ist hier der Innenraum ersichtlich, in den bei der *komplementären x-da*-Anordnung die Seitenkettenreste der AS in *x*-Position hineinragen (rot). Dabei fällt die bereits untersuchte Position A291 auf, die im Gegensatz zu I284 (Ebene 1), L315 (Ebene 2) und L322 (Ebene 4), wenig Raum im Inneren des Dimers ausfüllt. Ob sich eine Mutation dieser anderen *x*-Positionen zu Ala günstig auf die Aktivität der AC auswirkt, wird durch kinetische Untersuchungen untersucht.

Dazu wurde A291 in Ebene 3 (Abbildung 5-28) zu Isoleucin mutiert, um dann nacheinander die *x*-Positionen in den Ebenen 1, 2 und 4 zu Ala zu mutieren.

1) Ebene 1 und Ebene 3: I284A und A291I

Substratkinetik:

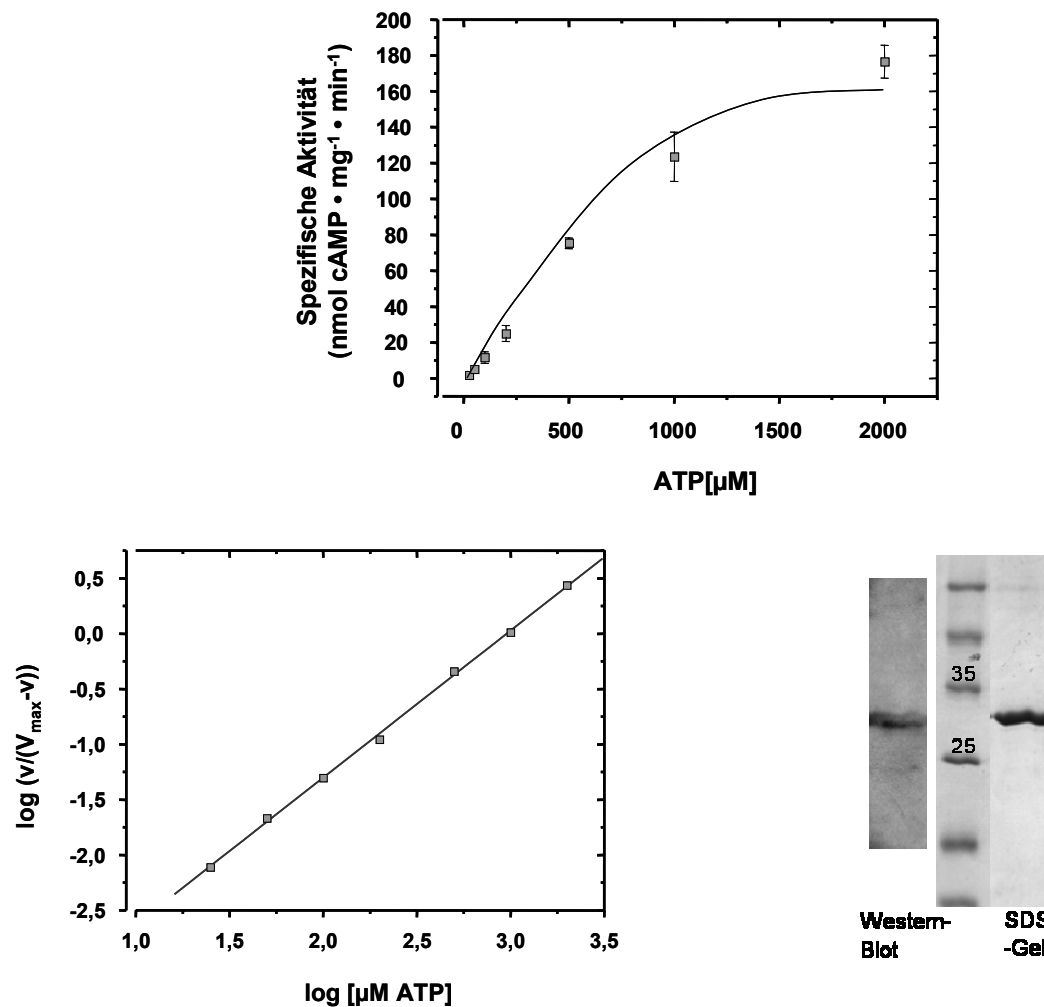


Abbildung 5-29 Kinetik und gereinigtes Protein von I284A, A291I.

Oben Mitte: Substratabhängigkeit I284A, A291I; Auftrag nach Michaelis-Menten. Testbedingungen: Standard, 0,5μg Protein, 25-2000μM ATP; n=4.

Unten links: Hill-Plot, Geradengleichung: $y = -3,958 + 1,3282x$, $R = 0,999$;

unten rechts: Western-Blot (0,1μg Protein) und SDS-Gel (15%) mit 2μg Protein

Ergebnisse

Da Position A291 mit Ile besetzt ist, war anzunehmen, dass die Aktivität wie bei der entsprechenden Einzelpunktmutante gering ist. Diese Vermutung wurde bestätigt, mit $V_{\max} = 243 \pm 13 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ scheint die Zusatzmutation I284 keinen Unterschied hinsichtlich der Aktivität zu ergeben. Die Substrataffinität ($966 \pm 48 \mu\text{M}$) der Doppelmutante nimmt im Vergleich zu A291I ($409 \pm 27 \mu\text{M}$) ab (Tabelle 5-5). Es ist die geringste ATP-Affinität aller bisherigen Mutanten.

2) Ebene 2 und Ebene 3: A291I und L315A

Substratkinetik:

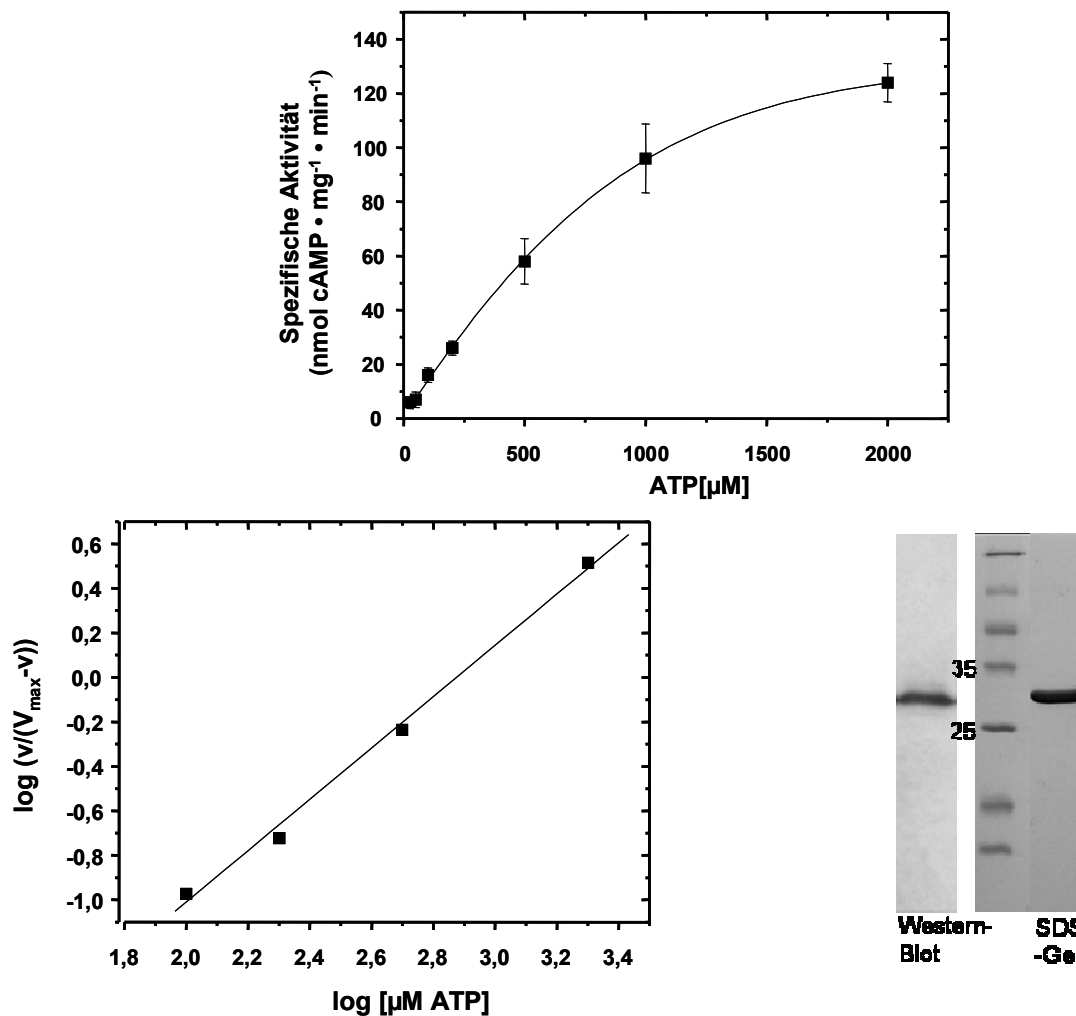


Abbildung 5-30 Kinetik und gereinigtes Protein von A291I, L315A.

Oben Mitte: Michaelis-Menten-Substratkinetik, Testbedingungen: Standard, 0,5μg Protein, 25-2000μM ATP; n=4;

unten links: Hill-Plot mit $y = -3,347 + 1,1624x$, $R = 0,997$;

unten rechts: Western-Blot mit 124ng Protein, SDS-Gel mit 1,24μg Protein

Bei dieser Mutante wurde ein Aktivitätsminimum der bisherigen Mutanten erreicht: $V_{\max} = 165 \pm 16 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Offenbar passt diese AS nicht in die 2. Ebene, möglicherweise treten Faltungsprobleme auf.

Ergebnisse

3) Ebene 3 und Ebene 4: A291I und L322A, Substratkinetik:

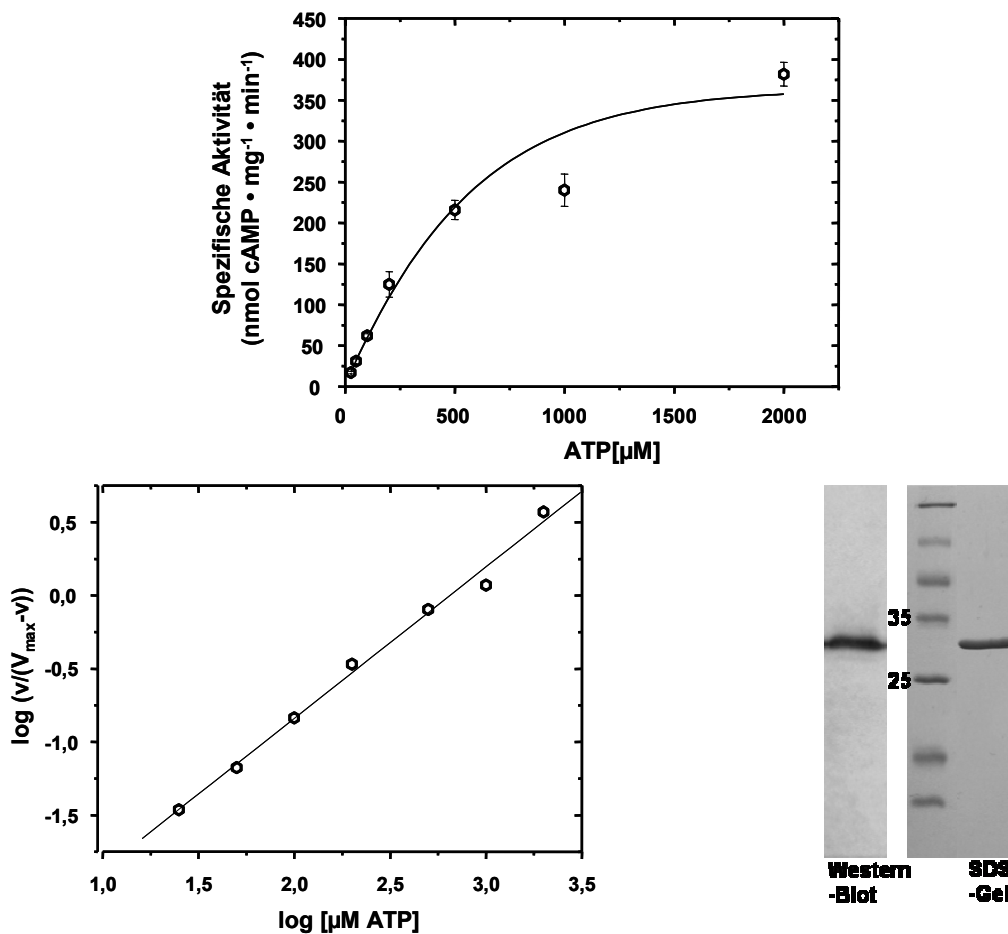


Abbildung 5-31 Substratkinetik und gereinigtes Protein von A291I, L322A.

Oben Mitte: Substratkinetik, Auftrag nach Michaelis-Menten, Testbedingungen: Standard, 0,5μg Protein, 25-2000μM ATP; n=4.

Unten links: Hill-Plot: $y = -2,906 + 1,0337x$, $R = 0,996$;

unten rechts: Western-Blot (95ng Protein) und SDS-Gel mit 0,95μg Protein

Diese Mutante ist mit $493 \pm 36 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ doppelt so aktiv wie A291I ($281 \pm 11 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Das könnte durch die Lage in Ebene 4 in der Nähe des '(α2)-Ausgangs' begründet sein. Die Beweglichkeit der Helices könnte sich durch das kleinere Seitenkettenvolumen verbessert haben.

Konstrukt	V_{\max} (nmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	K_m (μM)	Hill-Koeffizient
A291I	281 ± 11	409 ± 27	1,5 ± 0,0
A291I, I284A	243 ± 13	966 ± 48	1,3 ± 0,1
A291I, L315A	165 ± 16	739 ± 112	1,2 ± 0,1
A291I, L322A	493 ± 36	659 ± 114	1,0 ± 0,0

Tabelle 5-5 Übersicht Kap. 5.3.9, hellgrau unterlegt: Einzelmutante A291I zum Vergleich

Ergebnisse

Alle Doppelmutanten zeigen keine positive Kooperativität. Nur A291I kann mit einem Hill-Koeffizienten von 1,5 als positiv kooperativ eingeordnet werden. Da im Vergleich zu WT (Tabelle 5-3) sowohl die AC Aktivität durchgängig erniedrigt ist, als auch die ATP-Affinität aller Doppelmutanten abnimmt, ist anzunehmen, dass Ala an den x -Positionen der Ebenen 1, 2 und 4 wenig Einfluß hat.

5.3.10. Die kanonische Packung einer coiled-coil

Coiled-coil Strukturen beruhen auf dem Heptadenmuster hydrophober AS in den α -Helices. Dabei werden Leu und Ile an den Positionen a und d bevorzugt (Angabe der Positionen s. Abbildung 5-32). Eine kanonische coiled-coil bezeichnet die Anordnung von a und d innerhalb der Helices. Dabei wird eine hydrophobe AS einer Helix jeweils von vier Seitenkettenresten der ihr zugewandten Helix umrahmt, so entsteht ein Hohlraum, in den sie hineinpasst, das ist die *knobs-into-holes-Anordnung*, die coiled-coils auszeichnet (s. 5.2.1) und an deren Ausbildung zwei Reste per Heptadenmuster beteiligt sind (d und a). Die nicht-kanonische, beobachtete *komplementäre x -da*-Packung benötigt drei Reste per Heptadenmuster (x , d und $a \equiv a$, d und e , bzw. g) zur Ausbildung der Packung.

Es wurde berichtet, dass nur kleine Änderungen im helicalen Register vorgenommen werden müssen, um die kanonische Packung in die x -da-Anordnung umzuwandeln (Deng et al., 2006). Deng et al. mutierten dazu im GCN4-Leucinzipper drei polare g -Positionen zu hydrophoben AS, daraus resultierte eine Beteiligung der Positionen a , d und g an der interhelicalen Packung. Zudem ging damit eine Änderung der Helix-Orientierung von parallel zu antiparallel einher. Alberti et al. konnten durch Mutation der ungeladenen Positionen g und e des Lac-repressors (x -da-Konformation) diesen in eine kanonische Packung umwandeln (Alberti et al., 1993); dazu ersetzten sie g und e durch die entsprechenden geladenen AS des GCN4-Leucinzippers an diesen Positionen. Auch hier änderte sich die Orientierung der Helices: von antiparallel zu parallel.

Die Helices der *Afl503* HAMP sind in paralleler Form angeordnet, was der Orientierung in einer kanonischen coiled-coil bereits entspricht. Das sollte nach Ansicht von A. Lupas eine Umwandlung der hier vorliegenden *komplementären x -da* Packung zu einer kanonischen Packung durch Mutationen der a -und d -Positionen ermöglichen. Dazu hat A. Lupas eine Serie unterschiedlicher Konstrukte entworfen (A, B, C und D). Im Folgenden werden ihre biochemischen Eigenschaften anhand der AC Aktivität untersucht:

Ergebnisse

A)

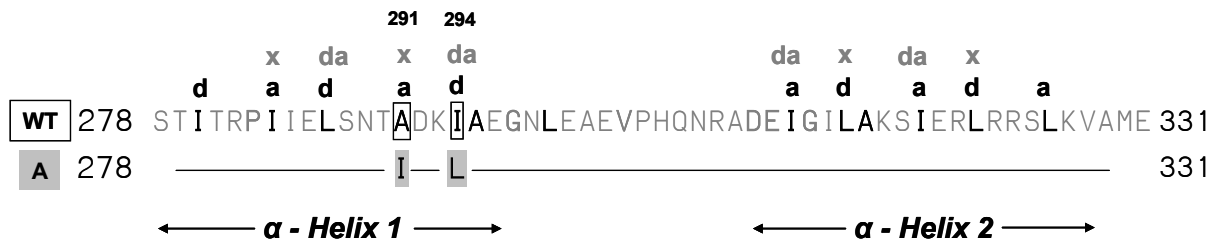


Abbildung 5-32 AS-Sequenz der *Af1503* HAMP₍₂₇₃₋₃₃₁₎, Angabe der α -Helices. Schwarze Buchstaben: hydrophobe AS; graue Buchstaben (fett): hochkonservierte AS

d, a: kanonische Aminosäuren einer coiled coil, hier mit der beinahe umgekehrten Verteilung: Leu an *d* und Ile an *a*

x, da: AS des beobachteten, komplementären *x-da*-Zustands von *Af1503* HAMP

eingerahmt: hydrophobe AS A291 und I294 im WT

grau unterlegt: Mutation dieser AS im Konstrukt A : A291I, I294L

Die Mutante A erhält einen perfekten hydrophoben Ring mit Ile in Position *a* und Leu in Position *d*. Dadurch sind die *a* und *d*-Präferenzen genau gegensätzlich verteilt, nach Vorhersage von A. Lupas sollte diese Anordnung den aktiven Zustand der Cyclase stabilisieren. Kinetische Untersuchungen ergaben Folgendes:

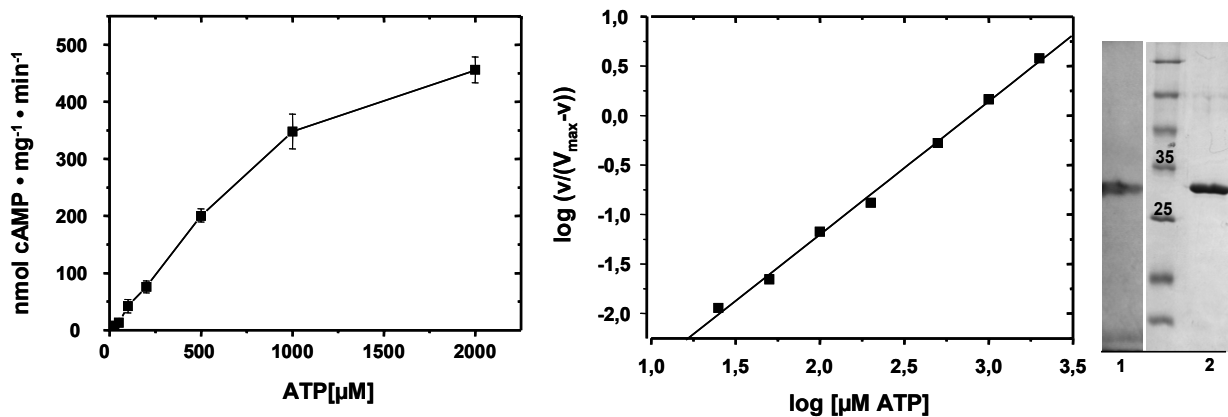


Abbildung 5-33 Substratkinetik und gereingtes Konstrukt A (A291I, I294L).

Links: Substratabhängigkeit, Auftrag nach Michaelis-Menten: Testbedingungen: Standard, 25-2000 μ M ATP, 0,5 μ g Protein, n=4.

Mitte: Hill-Plot, $y = -3,888 + 1,3438x$, $R = 0,998$;

rechts: 1- Western-Blot (0,1 μ g Protein); 2- SDS-Gel mit 2 μ g Protein

Im Vergleich zum WT ($V_{\max} = 1296 \pm 96$ nmol cAMP \cdot mg $^{-1}$ \cdot min $^{-1}$) ist die spezifische Aktivität mit 591 ± 57 nmol cAMP \cdot mg $^{-1}$ \cdot min $^{-1}$ um den Faktor 2 gesunken. Die Affinität zu ATP wurde ebenfalls erniedrigt: 802 ± 73 μ M gegenüber WT mit 229 ± 60 μ M. Mit einem Hill-Koeffizienten von $1,34 \pm 0,1$ ist diese Mutante ansatzweise positiv kooperativ.

Ergebnisse

B)

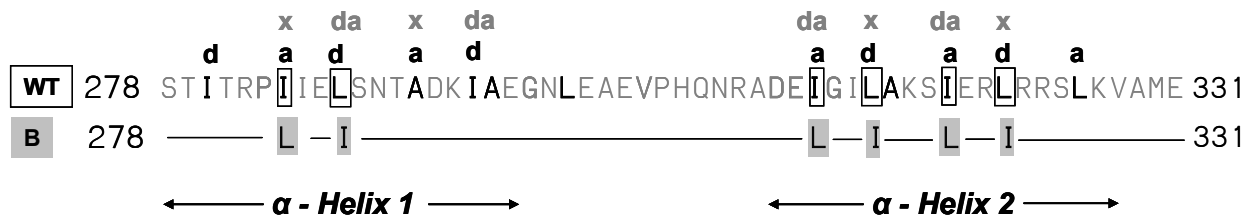


Abbildung 5-34 Mutationskonstrukt B: I284L, L287I, I312L, L315I, I319L, L322I, Beschriftung s. Legende Abbildung 5-32

In Konstrukt B werden mit Ausnahme von A291 die *a*-Positionen zu Leu und die *d*-Positionen zu Ile mutiert. Damit erhält diese Mutante beinahe die bevorzugte Anordnung einer kanonischen coiled-coil. Nach Vorhersage von A. Lupas sollte diese Mutante den ausgeschalteten Zustand bevorzugen. Die Klonierung bereitete Schwierigkeiten, da immer wieder neue Mutationen durch *E. coli* eingeführt wurden, letztendlich führte der richtige Klon zu einem überraschenden Ergebnis:

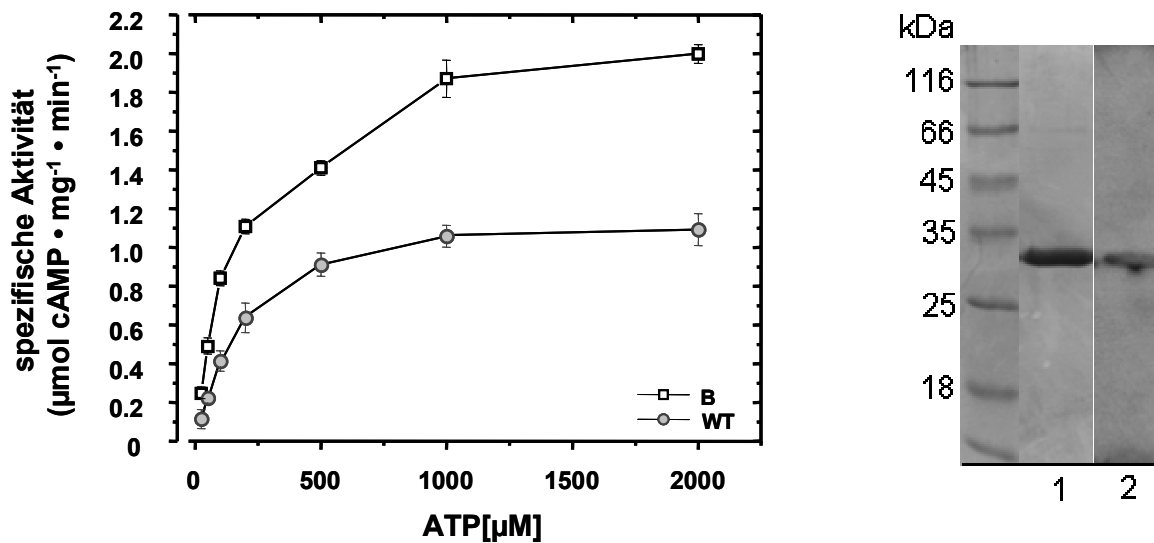


Abbildung 5-35 Substratkinetik von WT und Konstrukt B. Gereinigtes Konstrukt B.

links: Michaelis-Menten-Substratabhängigkeit von WT und Konstrukt B, Testbedingungen: Standard, 25-2000 μM ATP, je 0,5 μg Protein; n=4

rechts: 1: 15%-SDS-Gel mit 1,5 μg Protein (Konstrukt B) und 2: Western-Blot (0,07 μg Protein, Konstrukt B)

Ergebnisse

Abbruchbanden (Abbildung 5-38, rechts). Die Substratabhängigkeit von Konstrukt C ist im Vergleich zu WT und Konstrukt B dargestellt (Abbildung 5-38, links):

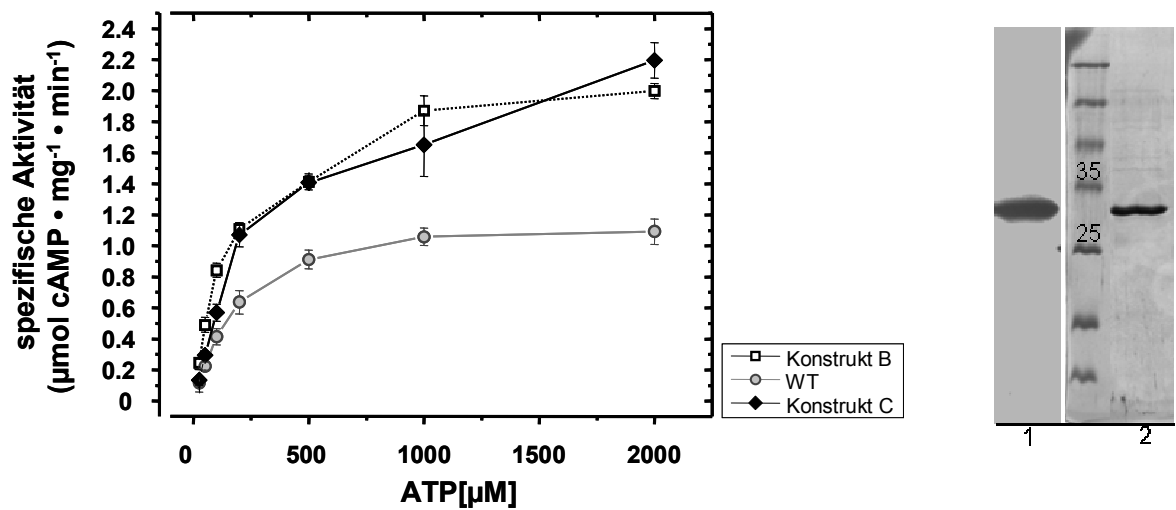


Abbildung 5-38 Substratabhängigkeit der Konstrukte B, C und von WT. Gereinigtes Konstrukt C.

Links: Substratkinetik von WT (n=4), Konstrukt B (n=4), und C (n=3), Auftrag nach Michaelis-Menten. Testbedingungen: Standard, je 0,5µg Protein, 25-2000µM ATP.

Rechts: 1- Western-Blot Konstrukt C; 2-SDS-Gel (15%) Konstrukt C, je 1,2µg Protein

Die spezifische Aktivität von Konstrukt C ähnelt der von Konstrukt B; verglichen mit WT zeigte sich, dass Konstrukt C 1,8fach aktiver ist als der WT:

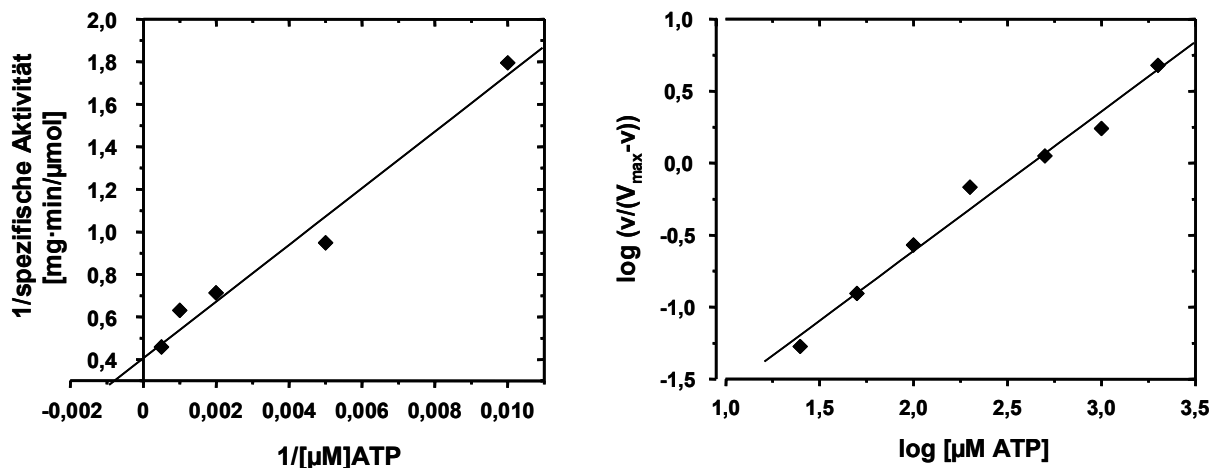


Abbildung 5-39 Substratkinetik Konstrukt C. Links: Lineweaver-Burk-Darstellung:

$y=0,4208+131,96x$, $R=0,987$. Rechts: Hill-Plot: $y=-2,5489+0,969x$, $R=0,992$.

Die Vorhersage stimmte mit dem Ergebnis nicht überein: V_{\max} von Konstrukt C ist mit 2381 ± 63 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ etwas höher als bei Konstrukt B (2049 ± 47 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹), der Unterschied ist signifikant ($p<0,05$). Die Substrataffinität beträgt 312 ± 25 µM und ist damit um den Faktor 2 niedriger als bei B (157 ± 6 µM).

Ergebnisse

Konstrukt D:



Abbildung 5-40 Konstrukt D: I284N und I312N, Beschriftung s. Legende Abbildung 5-32

Die Mutationen sollten nach Einschätzung von A. Lupas die coiled-coil Packung durch Einführen zweier Amid-Gruppen destabilisieren und dadurch die AC Aktivität erniedrigen. Das Ergebnis war in der Tat eine weniger aktive Mutante:

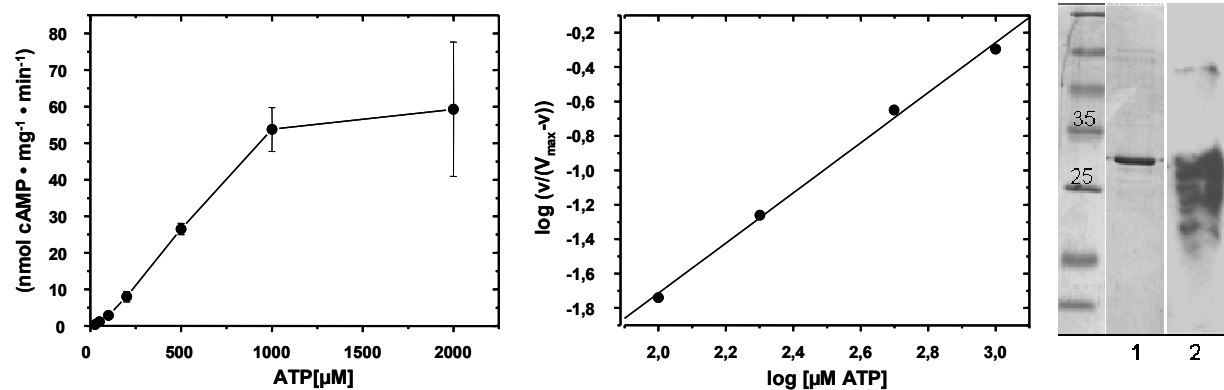


Abbildung 5-41 Substratabhängigkeit Konstrukt D.

Links: Auftragung nach Michaelis-Menten. Testbedingungen: Standard, 25-2000 μM ATP, 0,5 μg Protein; n=4

Mitte: Hill-Plot, Geradengleichung $y = -4,6278 + 1,4566x$, $R = 0,998$

Rechts: 1-(15%) SDS-Gel mit 0,8 μg Konstrukt D und 2-Western-Blot (0,1 μg Protein)

Mit einer V_{\max} von 148 ± 2 nmol cAMP · mg⁻¹ · min⁻¹ ist diese Mutante um den Faktor 9 weniger aktiv als der WT (1296 ± 96 nmol cAMP · mg⁻¹ · min⁻¹) und liegt noch unter der V_{\max} von A291F (213 ± 8 nmol cAMP · mg⁻¹ · min⁻¹; vgl. Tabelle 5-3). Auch die Substrataffinität ist hier von sämtlichen bisherigen Mutanten am niedrigsten: 1558 ± 131 μM. Der Hill-Koeffizient beträgt $1,4 \pm 0,1$.

Ergebnisse

Tabellarische Übersicht der kinetischen Parameter der Konstrukte A-D:

Konstrukt		V_{\max} (nmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	K_m (μM)	Hill-Koeffizient
A	A291I, I294L	591 ± 57	802 ± 73	1,34 ± 0,1
B	I284L, L287I, I312L, L315I, I319L, L322I	2049 ± 47	157 ± 6	0,8 ± 0,1
C	I284L, L287I, A291L, I312L, L315I, I319L, L322I	2381 ± 63	312 ± 25	0,98 ± 0,1
D	I284N, I312N	148 ± 2	1558 ± 131	1,4 ± 0,1

Tabelle 5-6 Übersicht Kap. 5.3.10

5.3.11. Hoch konservierte Bereiche in HAMP *Af1503*

Wie im Alignment in Kapitel 1.2 gezeigt (Hulko et al., 2006) findet man in den Sequenzen verschiedener HAMP-Domänen stark konservierte Aminosäuren. Hier sind diese Positionen in HAMP *Af1503* hervorgehoben (Abbildung 5-42). Folgende AS werden mutiert:



Abbildung 5-42 HAMP *Af1503* mit hochkonservierten Aminosäuren, hervorgehoben durch Einrahmung. Pfeile: die zu mutierenden Positionen D310 und E311, Einzelmutationen.

In Anlehnung an bereits literaturbekannte Mutationen, die einen veränderten Phänotyp zeigten, wurden in HAMP *Af1503* zwei Einzelmutationen vorgenommen:

- 1) **D310E:** Eine Mutation des konservierten Asp an Position 310 der HAMP *Af1503* zu Glu wurde von Buron-Barral et al. im Aer-Protein durchgeführt (Buron-Barral et al., 2006). Aer ist als Chemotaxis-Protein ein Signalüberträger für die Sauerstoffkonzentration und andere Energie-abhängige Vorgänge in *E. coli*. Das Protein besteht N-terminal aus einer cytosolischen PAS-Domäne (FAD-bindend), einer strukturell unbekanntem F1-Region, einer HAMP-Domäne und C-terminaler Signaldomäne. Die Mutation D237E bewirkte in der HAMP-Domäne des Aer-Proteins eine Inaktivierung der Bewegung des Flagellarmotors.
- 2) **E311K:** die Mutation Glu nach Lys in den HAMP-Domänen von Tsr (Ames and Parkinson, 1988) und NarX wurde beschrieben. NarX ist eine nitratabhängige Kinase in *E. coli*, die eine HAMP-Domäne enthält. Durch die Mutation E208K in der HAMP-Domäne von

Ergebnisse

NarX (Kalman and Gunsalus, 1990), konnten Kalman et al. in Abwesenheit von Nitrat eine verstärkte Expression der Operons feststellen, die für die Nitratreduktase und die Formiatdehydrogenase N codieren (normalerweise wird diese Expression von Nitrat induziert). Dieser Effekt wurde von Collins et al. bestätigt (Collins et al., 1992).

In der HAMP-Domäne des Osmosensors EnvZ aus *E. coli* wurde die entsprechende Mutation ebenfalls untersucht. Durch E212K in HAMP_(EnvZ) wurde die Expression der äusseren Membranproteine OmpF und OmpC beeinflusst (Harlocker et al., 1993; Park and Inouye, 1997).

Ad 1) Welche Auswirkung hat die Mutation D310E in HAMP *Afl503* auf die Aktivität der AC *Rv3645*?

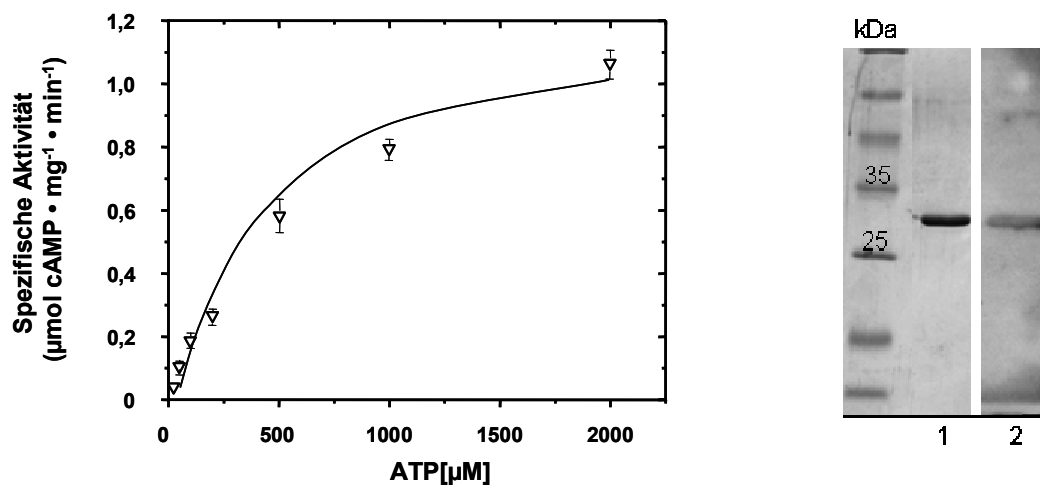


Abbildung 5-43 Substratkinetik und gereinigtes Protein D310E.

Links: Substratabhängigkeit, Auftragung nach Michaelis-Menten. Testbedingungen: Standard, 25-2000 μM ATP, 0,5 μg Protein, n=4.

Rechts: 1- SDS-Gel, 0,9 μg Protein 2- Western-Blot, 80ng Protein

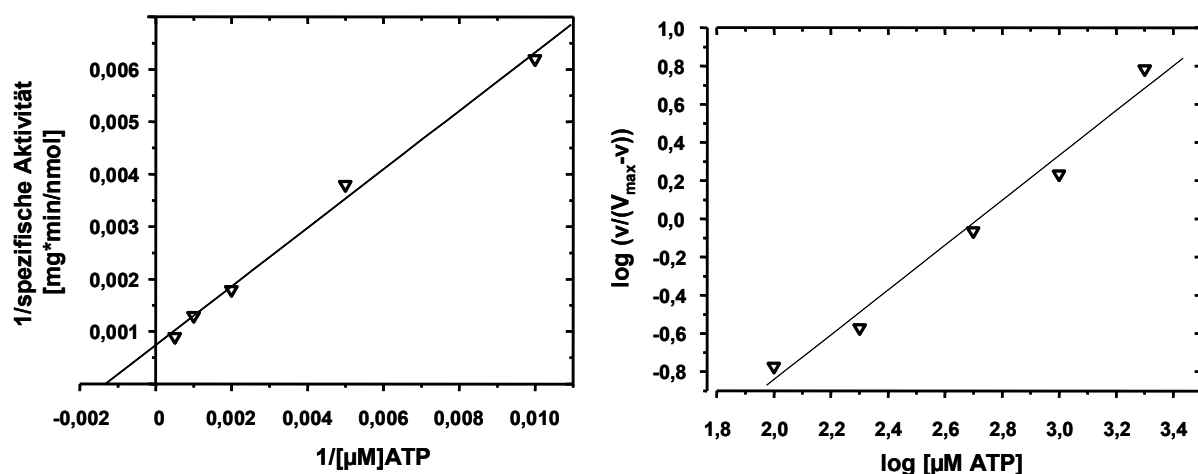


Abbildung 5-44 links: Lineweaver-Burk Darstellung von D310E: $y=7,3147 \cdot 10^{-4}+0,559x$, $R=0,997$

rechts: Hill-Plot D310E: $y=-3,229+1,184x$, $R=0,989$

Ergebnisse

D310E ($V_{\max}=1284 \pm 100 \text{ nmol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) führte hier zu keiner veränderten Aktivität im Vergleich mit dem WT ($1296 \pm 96 \text{ nmol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p>0,05$). Die Substrataffinität ist niedriger als bei WT: $K_m = 655 \pm 41\mu\text{M}$; in diesem Punkt unterscheidet sich D310E statistisch hoch signifikant von WT ($229 \pm 60\mu\text{M}$; $p<0,01$). Der Hill-Koeffizient ($1,2 \pm 0,1$) deutet nicht auf positive Kooperativität.

Ad 2) Was bewirkt die Mutation E311K?

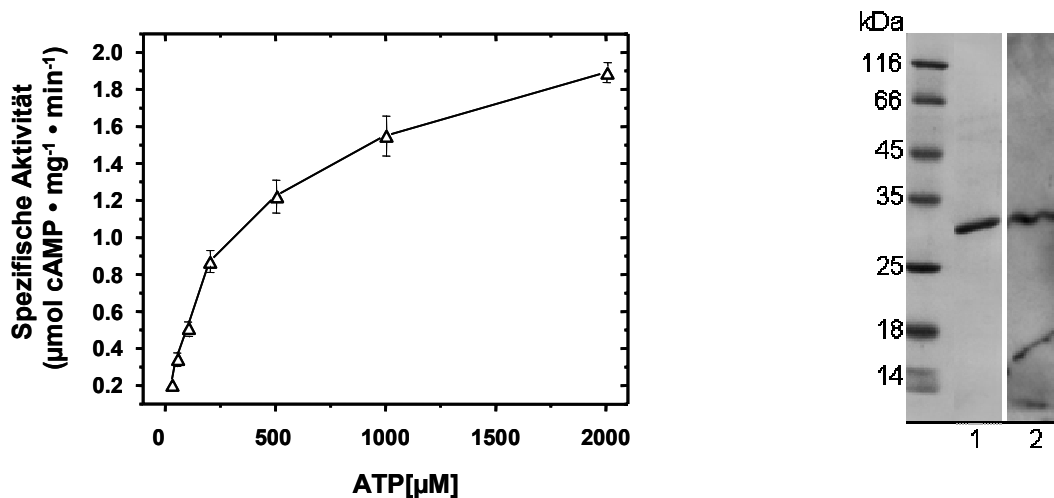


Abbildung 5-45 Substratkinetik und gereinigtes Protein von E311K.

Links: Substratabhängigkeit, Auftragung nach Michaelis-Menten.
 Testbedingungen: Standard, 25-2000 μM ATP, 0,5 μg Protein, n=4.

rechts: 1- SDS-Gel, 1,0 μg Protein; 2- Western-Blot, 90ng Protein

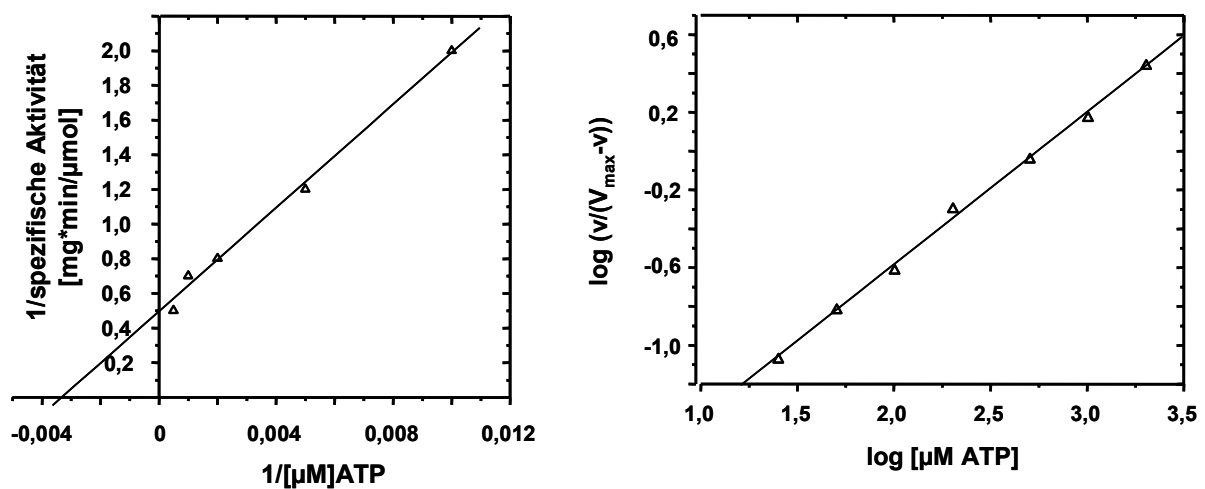


Abbildung 5-46 links: Lineweaver-Burk Darstellung E311K; $y=0,4826+150,65x$, $R=0,996$

rechts: Hill-Plot E311K; $y=-2,154+0,786x$, $R=0,998$

Ergebnisse

E311K bewirkt eine Erhöhung von V_{\max} um den Faktor 1,6 ($V_{\max} = 2082 \pm 85 \text{ nmol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) und unterscheidet sich damit hoch signifikant von WT ($p < 0,01$). Im Vergleich zu D310E ist die Substrataffinität dieser Mutante erhöht ($284 \pm 24\mu\text{M}$, der Unterschied zu D310E ist statistisch höchst signifikant, $p < 0,001$). Das Verhalten dieser Mutante ist nicht positiv kooperativ (Hill-Koeffizient: $0,78 \pm 0,0$).

5.4. Kristallisation WT

Der nächste Schritt wäre, die Struktur des in Kap.5.2.2 charakterisierten WT zu lösen. Dabei wäre es wünschenswert, wenn die HAMP-Domäne in beiden möglichen Rotationszuständen im Zusammenhang mit der Cyclase zu sehen wäre. Für die Kristallisation waren zunächst weitere Reinigungsschritte des Proteins nötig.

5.4.1. Umstellung von Ni^{2+} -NTA (Qiagen®) auf Profinity™ IMAC Resin (Biorad) für die Proteinreinigung

Für die Reinigung der Proteine mit Ni^{2+} -NTA von Qiagen setzt man während der Bindung des Proteins an die Affinitätsmatrix 15mM Imidazol zu. Auch in den Waschpuffern A und B waren 15mM Imidazol-Zugabe nötig (nach (Linder et al., 2004)). Um erstens herauszufinden, ob bei Verwendung von Ni^{2+} -IDA der Firma Biorad beim Binden an die Affinitätsmatrix auf die Imidazol-Zugabe verzichtet werden kann und zweitens, ob weniger oder gar kein Imidazol für die Waschpuffer nötig ist, wurde die folgende Versuchsreihe gestartet. Obendrein sollte ermittelt werden, ob die Konzentration von 250mM Imidazol im Elutionspuffer durch den Einsatz von Ni^{2+} -IDA reduziert werden kann. Eine weitere Frage war, ob mit Ni^{2+} -IDA die Proteinausbeute verbessert werden kann (Bindekapazität Ni^{2+} -IDA: 15mg Protein/ml Harz; Bindekapazität Ni^{2+} -NTA: 5-10mg Protein/ml Harz).

Im Versuch erfolgte die zweistündige Bindung des Proteins WT an 250 μl Ni^{2+} -IDA ohne Zusatz von Imidazol. Im anschließenden Waschgang wurde eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen im Waschpuffer B durchgeführt (0, 5, 15, 30, 50, 100, 150, 200, 250mM Imidazol). Die Kontrolle mit Ni^{2+} -NTA und herkömmlicher Waschmethode (Kap. 4.7) wird mit Standard bezeichnet. Ergebnis s. Abbildung 5-47.

Ergebnisse

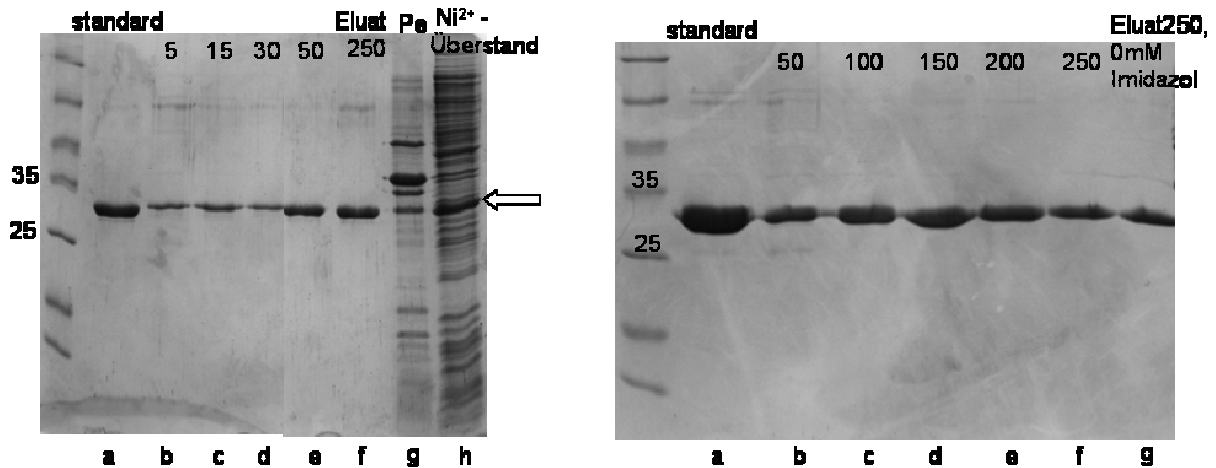


Abbildung 5-47 Versuchsreihe Proteinreinigung WT nach Bindung an Ni^{2+} -IDA und anschließendem Waschen mit steigenden Imidazol- Konzentrationen im Waschpuffer B, Darstellung auf 15% igen SDS-Gelen. Standard: Bindung an Ni^{2+} -NTA und anschließende herkömmliche Waschmethode (Kap. 4.7)

SDS-Gel links: a-Standard, 2,2 μg Protein; b-e: Versuchsreihe nach Bindung an Ni^{2+} -IDA und anschließendem Waschgang mit 5, 15, 30 und 50mM Imidazol in Waschpuffer B, aufgetragen je 0,8-1,2 μg Protein, f-Eluat nach dem Imidazolwaschgang: 1,1 μg Protein; g-Pellet, 5 μl ; h- Ni^{2+} -Überstand (5 μl) nach 2h Bindung an Ni^{2+} -IDA, Pfeil: deutet auf ungebundenes Protein WT (30,6kDa) im Ni^{2+} -Überstand

SDS-Gel rechts: a-Standard, 3,0 μg Protein; b-f: Versuchsreihe nach Bindung an Ni^{2+} -IDA und anschließendem Waschgang mit 50, 100, 150, 200 und 250mM Imidazol in Waschpuffer B: 1,5-2,0 μg Protein je Spur; g-Eluat ohne Imidazol in Waschpuffer B, 250mM Imidazol direkt in Elutionspuffer, 1,5 μg Protein

Erstens: die Bindung mit Ni^{2+} -IDA kann ohne Imidazol erfolgen, es ist kein Unterschied zur Standardmethode erkennbar (Abbildung 5-47, rechts, g). Zweitens: ohne Imidazol im Waschpuffer B (Abbildung 5-47 rechts, g), ist das Protein bereits sauber. Es kann auf die Imidazol-Zugabe im Waschpuffer verzichtet werden.

Drittens: die Konzentrationen von 5-50mM Imidazol im Waschpuffer B liefern unreines Protein. Sauberes Protein wird ab 100mM Imidazol im Waschpuffer B eluiert (Abbildung 5-47 rechts, c). Da jedoch bei dieser Imidazol-Konzentration die Proteinausbeute abnimmt und erst bei einem Zusatz von 250mM Imidazol eine der bisherigen Ausbeute vergleichbare Proteinkonzentration erhalten wurde (ca. 1,5mg/ml), wird für den Elutionspuffer die Konzentration von 250mM Imidazol beibehalten.

Im Nickelüberstand ist nicht-gebundenes Protein zu erkennen (Abbildung 5-47 links, h). Um die Ausbeute effizienter zu gestalten, wurde der Überstand für die Nickelbindung in Portionen à 10ml aufgeteilt. Dieses Verfahren erwies sich als effektiver als denselben Überstand (20ml) zweimal hintereinander binden zu lassen (durch diese Behandlung erhielt man im zweiten Bindungsgang weniger Protein (ca. 0,5-0,9mg/ml). Die Ausbeute an sauberem Protein konnte

Ergebnisse

auf diese Weise verdoppelt werden: 3mg aus 200ml Kultur. Ein AC Aktivitätsvergleich der mit den unterschiedlichen Ni^{2+} -Materialien gereinigten Proteinen ergab keine Unterschiede (nicht gezeigt). Alle folgenden Proteine werden ohne Imidazol-Zusatz während der Bindung und mit Ni^{2+} -IDA Profinity™ IMAC (Biorad) gereinigt. Die Aufteilung der Überstände erfolgt wie oben beschrieben, Waschpuffer ohne Imidazol s.3.5.3.2.

5.4.2. Gelfiltration mit ÄKTA

Nach Dialyse und Aufkonzentrieren des Proteins folgt in der Regel eine Gelfiltration. Dieser Schritt ist eine Routine, die selbst bei SDS-PAGE sauberen Proteinen angewandt wird. Dabei werden schonend und effizient kleine Peptidbruchstücke und gegebenenfalls Salzreste der vorherigen Puffer abgetrennt. Obendrein wird dabei erkannt, ob das zu kristallisierende Protein monomer ist. Für den WT wurde die Säule Superdex 200 (10/30) verwendet, (Gelfiltrationspuffer wie in 3.5.3.4). Eichung der Säule (Konzentration der Markerproteine je $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$):

Marker	MW (kDa)	Elution (ml)
Chymotrypsinogen A	25	17,673
Ovalbumin	43	15,86
BSA (Monomer)	66	14,669
Phosphorylase b	96	13,86

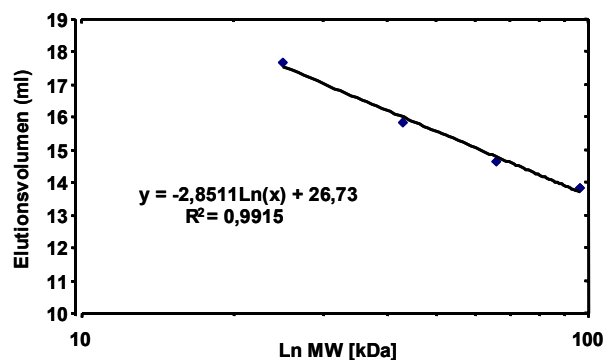


Abbildung 5-48 links: Markerproteine für Superdex 200 (10/30);
rechts: Eichgerade mit Gleichung

Ergebnisse

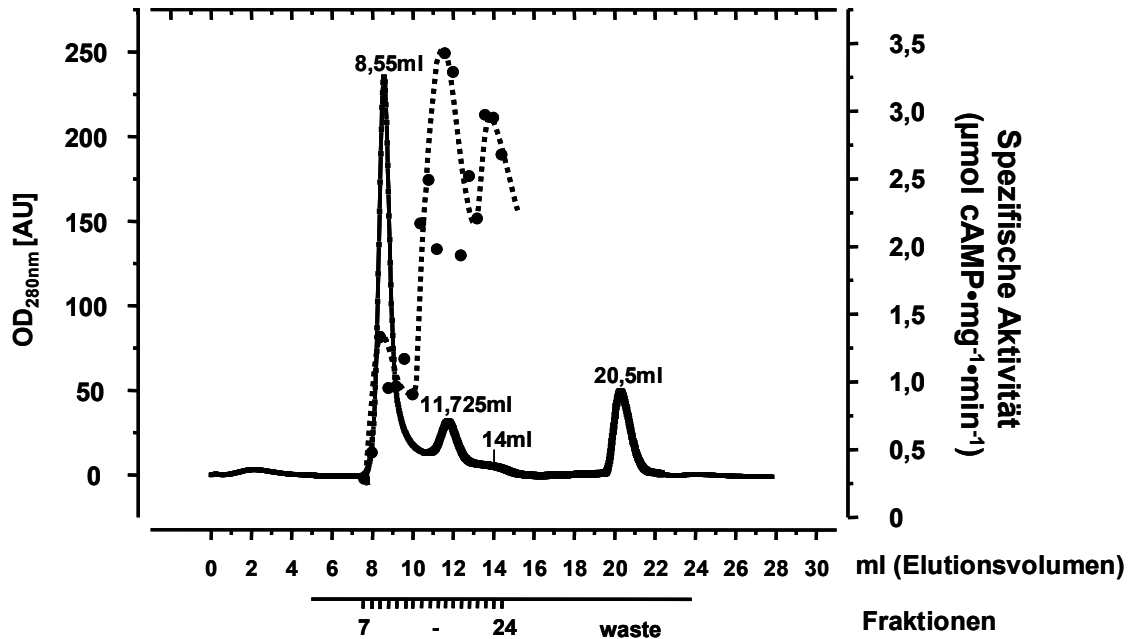


Abbildung 5-49 Chromatografie von WT an Superdex 200 (10/30), ÄKTA. Auftrag: 2,08mg Protein. Flußrate: 0,4ml·min⁻¹. Ab 7ml wurde fraktioniert (0,5ml Fraktionen)
durchgehende Linie: Absorption bei 280nm,
gepunktete Linie: Test auf enzymatische Aktivität der Fraktionen 7-24, aufgetragen ist die spezifische Aktivität (Testbedingungen: Standard, 0,5µg Protein pro Fraktion)

Das Molekulargewicht des Monomers_{WT} trägt 30,6kDa. Das Dimer_{WT} entspricht in etwa der Schulter zwischen 14ml und 14,5ml. 11,725ml entsprechen einem Tetramer. Die Trennung ist nicht optimal, möglicherweise wurde Protein aufgetragen, welches sich aufgrund der hohen Ausgangskonzentration zusammengelagert hat (Agglomeratbildung, diese erscheinen im Ausschlussvolumen). Das Aktivitätsprofil läßt erkennen, dass sich die Hauptaktivität in der Nähe der Di- und Tetramere befindet, dort sind Aktivitätsspitzen von bis zu 3,2 µmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. Die Aktivität des Proteins vor dem Lauf betrug 1,07 µmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. Da das Dimer im Verhältnis zu anderen, nicht weiter spezifizierbaren Spezies weniger als 10% betrug, waren weitere Reinigungsversuche notwendig.

5.4.3. Versuche mit einer SMART-Apparatur

In Kooperation mit Prof. Stehle, Biochemie Tübingen, wurde deren SMART-System genutzt; die Superdex 75-Säule benötigt nur 1/10 des Protein-Auftragsvolumens der Superdex 200. So konnten sehr rasch verschiedene Zusätze ausprobiert werden, die eine Anreicherung des Dimers unter Erhalt der AC Aktivität begünstigen könnten. Gelfiltrationspuffer wie in 3.5.3.4. Eichung der Säule:

Ergebnisse

Protein	MW (kDa)	V _{Elution} (ml)
Ovalbumin	43	1,54
Albumin	67	1,49
Aldolase	158	1,39
Ferritin	440	1,2
Dextran Blue	2000	0,899

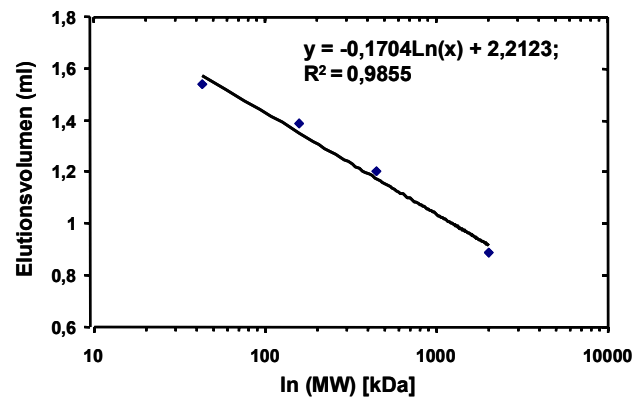


Abbildung 5-50 links: Tabelle mit Markerproteinen für die Superdex 75.

Rechts: Eichgerade mit Gleichung

Zusatz von 1,5M Guanidiniumchlorid oder 1M NaCl verschoben das Gleichgewicht nicht zum Dimer (nicht gezeigt). Zugaben von 10mM EDTA und/oder 2mM DTT hatten einen günstigen Effekt (Abbildung 5-51 bis 53). Aufgetragen wurden pro Lauf 20µl (230µg Protein). Die Aktivität des WT vor den Zusätzen (Kontrolle) war 896 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹.

1) Zugabe von 10mM EDTA

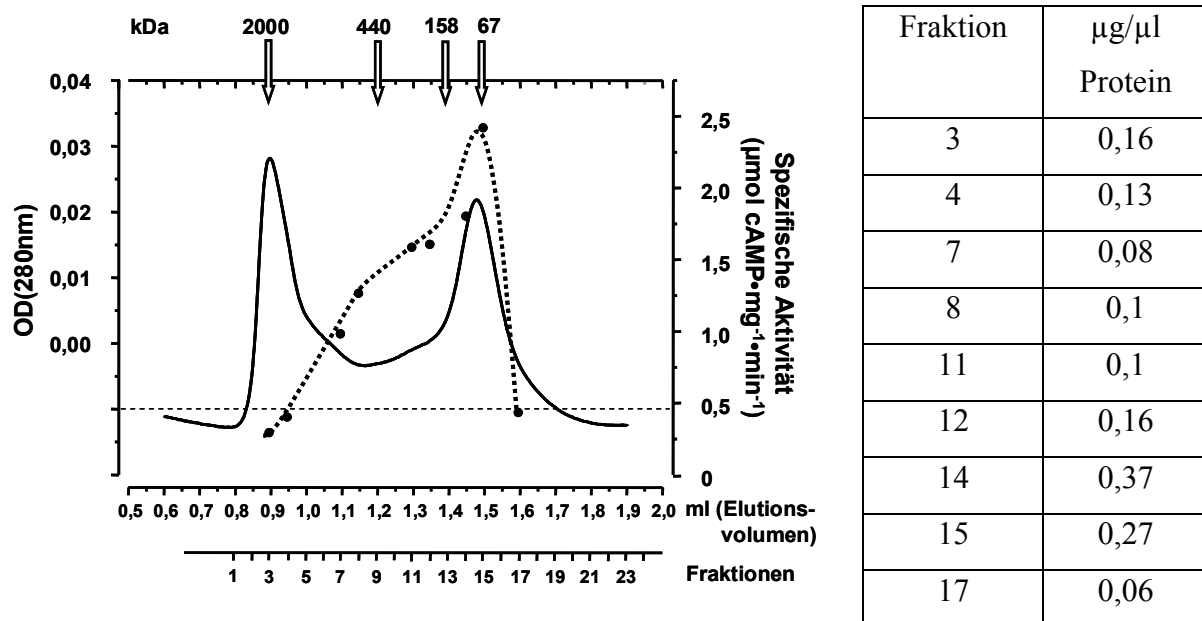


Abbildung 5-51 Chromatografie von WT mit 10mM EDTA an Superdex 75, SMART-Apparatur. Proteinauftrag: 230µg, Fraktionsgröße: 50µl.

Durchgezogene Linie: Absorption bei 280nm. Gestrichelte horizontale Linie: Basislinie. Gepunktete Linie: spezifische Aktivität der Fraktionen (Testbedingungen s. Legende Abbildung 5-49). Oben angegeben: Proteinmarker in kDa.

Rechts: Fraktionen mit Proteinkonzentration

Ergebnisse

Der Lauf ergab zwei getrennte Proteinpeaks je mit einer leichten Schulter, im Wesentlichen ein Multimerenpeak (Spezies > 600kDa) und ein Dimerenpeak (67kDa \equiv 1,5ml) im Verhältnis 60 zu 40. Die AC Aktivität des Proteins war in Richtung Dimer verschoben, wobei auch der 'Talbereich' der Oligomere noch AC Aktivität aufweist. Die Aktivität des WT mit 10mM EDTA vor dem Lauf (Kontrolle) betrug 1147 nmol cAMP \cdot mg $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$.

2) 2mM DTT

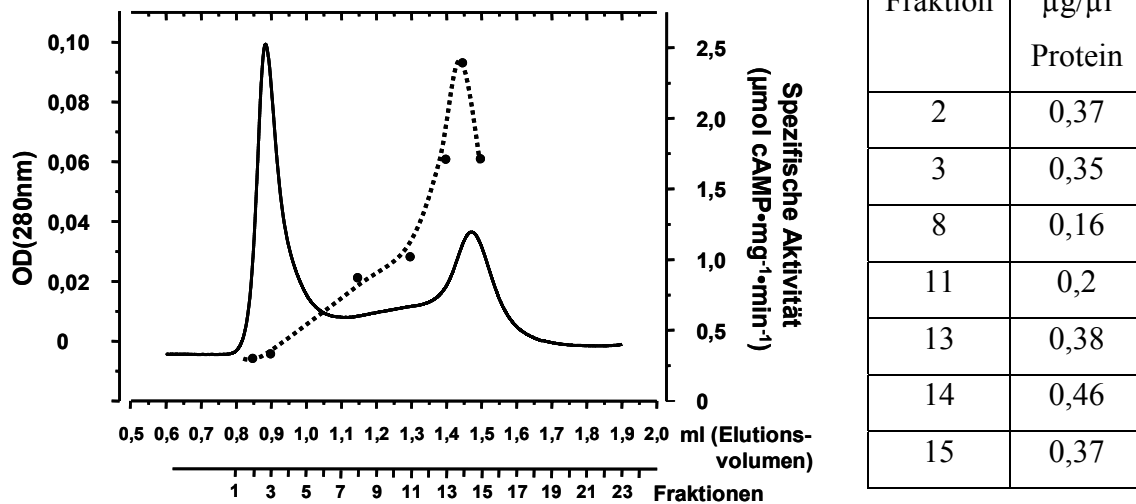


Abbildung 5-52 Chromatografie von WT mit 2mM DTT an Superdex 75, SMART-Apparatur. Proteinauftrag: 230 μg , Fraktionsgröße: 50 μl .

Durchgezogene Linie: Absorption bei 280nm. Gepunktete Linie: spezifische Aktivität der Fraktionen (Testbedingungen s. Legende Abbildung 5-49).

Rechts: Fraktionen mit Proteinkonzentration

Hier war die Anreicherung des Dimers nicht viel besser als ohne DTT-Zusatz, doch konnte die Aktivität in den Bereich des Dimers verschoben werden. Das wurde bei der Auswertung der Aktivität nach Volumen (nmol cAMP \cdot ml $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$) deutlicher (nicht gezeigt). Kontrollwert WT mit 2mM DTT: 1196 nmol cAMP \cdot mg $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$.

Ergebnisse

3) 2mM DTT und 10mM EDTA

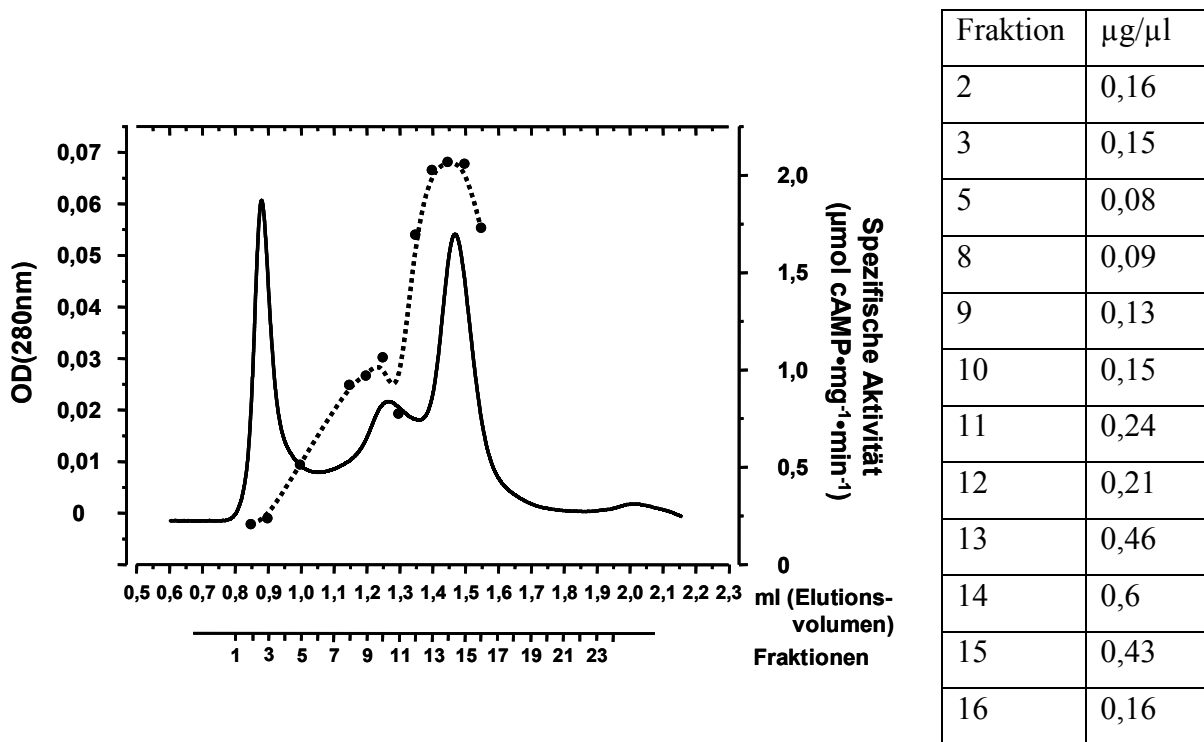


Abbildung 5-53 Chromatografie von WT mit 2mM DTT und 10mM EDTA an Superdex 75, SMART-Apparatur. Proteinauftrag: 230µg, Fraktionsgröße: 50µl.

Durchgezogene Linie: Absorption bei 280nm. Gepunktete Linie: spezifische Aktivität der Fraktionen (Testbedingungen s. Legende Abbildung 5-49).

Rechts: Fraktionen mit Proteinkonzentration

Die Schulter zwischen 1,2 und 1,35ml sollte noch abgetrennt werden, um eine saubere Dimerenfraktion zu erhalten. Somit konnte die Verteilung der Spezies beinahe 50:50 erhalten werden. Kontrolle WT mit 2mM DTT und 10mM EDTA: 961 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹.

4) SDS-Gel zur Überprüfung der Reinheit der Fraktionen (Auszug)

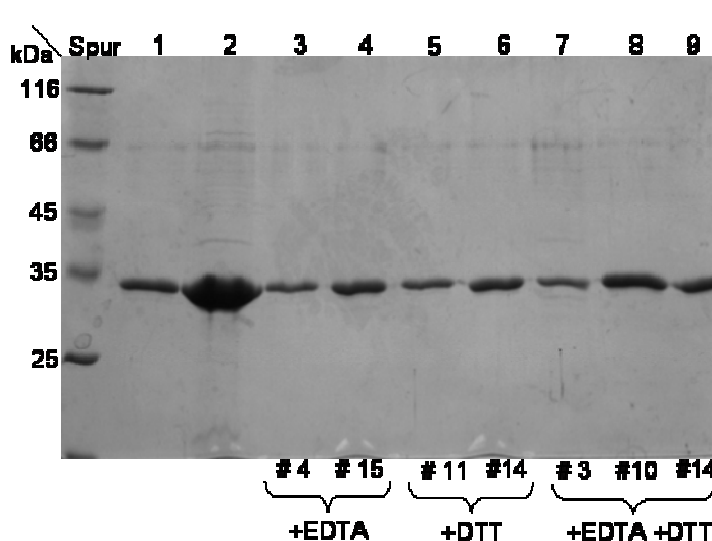


Abbildung 5-54

SDS-Gel (15%) mit Protein WT nach Gelfiltration (SMART) aus verschiedenen Fraktionen. Die Fraktionsnummern (#) entsprechen den Läufen 1-3.

1: 1µg Protein (Kontrolle, ohne Zusatz, vor dem Lauf)

2: 10µg Protein (Kontrolle, ohne Zusatz, vor dem Lauf); WT sauber

3 und 4: EDTA-Fraktionen, je 1,3µg Protein

5 und 6: DTT-Fraktionen, 1,0µg und 1,4µg Protein

7-9: EDTA- und DTT-Fraktionen, 1,5µg, 1,3µg und 1,2µg Protein

Ergebnisse

5) Schließlich wurde überprüft, ob die beiden Hauptpeaks (Multimer – Dimer) nach Trennung, Poolen und Aufkonzentrieren stabil waren (Abbildung 5-55).

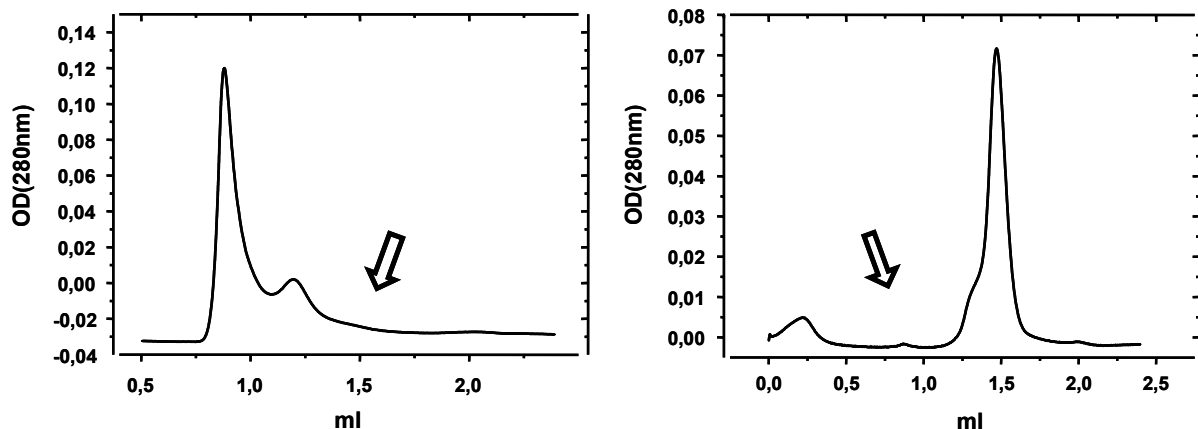


Abbildung 5-55 Gelfiltration der gepoolten und wiederaufkonzentrierten Multimer-/Dimerfraktionen.

Links: Gelfiltration der gepoolten und *wieder* aufkonzentrierten *Multimere* an Superdex 75, SMART-Apparatur, Absorption der Multimere bei 280nm. Pfeil: deutet auf die Stelle bei 1,5ml \equiv 67kDa, an der sich kein Dimer mehr gebildet hat;

rechts: Gelfiltration des abgetrennten und *wieder* aufkonzentrierten *Dimers* an Superdex 75, SMART-Apparatur, Absorption des Dimers bei 280nm. Pfeil: deutet auf den Bereich zwischen 0,8ml und 1,2ml: keine Multimere.

Aus den Multimeren bildete sich kein Dimer nach. Was für die Kristallisation wichtig ist: aus dem Dimer bilden sich keine Multimere nach - das Dimer ist stabil.

6) Um die Stabilität des *isolierten* Dimers zu prüfen, wurden zwei und fünf Tage nach der Reinigung (Tag 0) AC-Assays durchgeführt, durch die die Lagerungstemperatur mit 10% Glycerolzusatz (mehr ist weder für Säule noch Ansetzen von Kristallen tragbar) überprüft werden sollte.

	Lagerung	Tag 2 ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	Tag 5 ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
Dimer _{WT}	4°C	3,6	2,6
Gesamtprotein _{WT}	4°C	2,7	2,2
Dimer _{WT}	23°C	nicht getestet	2,2
Gesamtprotein _{WT}	23°C	3,0	1,9

Tabelle 5-7 Stabilitätstest WT Dimer und Gesamtprotein, Bedingungen: Standard, 1mM ATP

Das Dimer ist bei 4°C am stabilsten, die Aktivität nimmt um 18% ab. Die Lagerung bei 23°C ist für das Dimer ungünstig (Aktivitätsverlust 39%). Dies trifft auch auf das Gesamtprotein zu (-37%).

Ergebnisse

5.4.4. Inhibitoren

Es ist bekannt, dass viele Strukturen von Proteinen u.a. nur dadurch gelöst werden konnten, weil sie in Anwesenheit eines Stabilisators kristallisiert worden sind (Tesmer et al., 1997).

Um mögliche Co-Kristallisatoren zu finden, wurden potentielle AC Inhibitoren untersucht. Dabei wurde ohne Vorinkubation getestet.

5.4.4.1. Substratanaloga und Phosphate

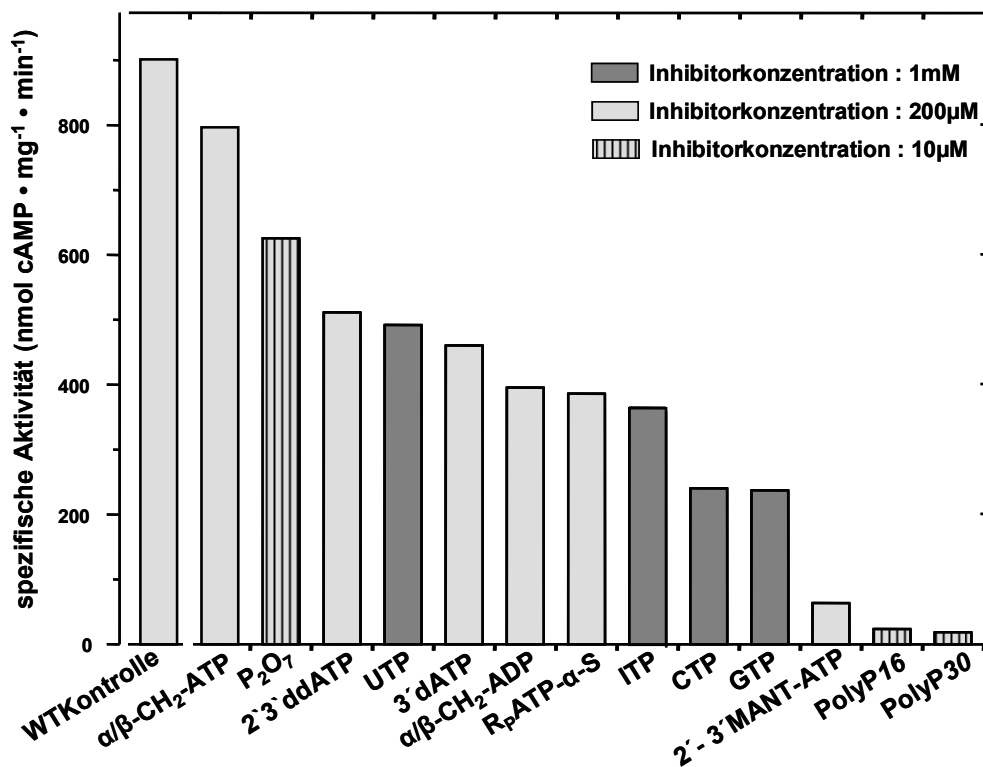


Abbildung 5-56 Mögliche Inhibitoren für WT Gesamtprotein unter Angabe der spezifischen Aktivität, Testbedingungen: Standard, 0,5µg Protein, 200µM ATP; WT=100%

Abkürzungen: α/β-CH₂-ATP: α,β-Methylenadenosin-5'-triphosphat; P₂O₇: Pyrophosphat; 2'3'ddATP: 2'3'-dideoxy-adenosin-5'-triphosphat; UTP: Uridintriphosphat; ITP: Inosintriphosphat; CTP: Cytidintriphosphat; GTP: Guanosintriphosphat; 3'dATP: 3'-desoxy-ATP, α/β-CH₂-ADP: α,β-Methylenadenosin-5'-diphosphat; RₚATP-α-S: Adenosin-5'-[α-thio]-triphosphat, Rp: R-Stereoisomer; 2',3'-MANT-ATP: 2'(3')-O-(N-methylantraniloyl)-adenosin-5'-triphosphat; PolyP₁₆: Polyphosphat, Kettenlänge 16; PolyP₃₀: Polyphosphat, Kettenlänge 30

Die Substratkonzentration war 200µM, d. h. suboptimal, die Aktivität WT_{Kontrolle} war 901 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. Die Substratanaloga UTP, ITP, CTP und GTP wurden bei 1mM gemessen. CTP und GTP hemmten ca. 74%. 200µM 2',3'-MANT-ATP [2'(3')-O-(N-methylantraniloyl)-adenosin-5'-triphosphat], das als kompetitiver Inhibitor von Membran-ACn im Bereich von 10-100nM bekannt ist (Mou et al., 2006), hemmt die AC zu 93%. 10µM

Ergebnisse

Polyphosphat P30 und -P16 hemmen zu 98%. Polyphosphate sind kettenförmige Kondensationsprodukte der ortho-Phosphorsäure. Zu ihrer Herstellung wird Na_2HPO_4 verwendet. Die Angaben 30 bzw. 16 beziehen sich auf die Kettenlänge (n) der allgemeinen Formel: $\text{Na}^+\text{-O-[P(OMe}^+)(\text{O)-O]}_n\text{-Na}^+$. Pyrophosphat, das bei der Cyclasereaktion gebildet wird, hemmt nur gering (30% bei $10\mu\text{M}$). Für die beiden Polyphosphate wurden Dosis-Wirkungskurven aufgenommen (Abbildung 5-57).

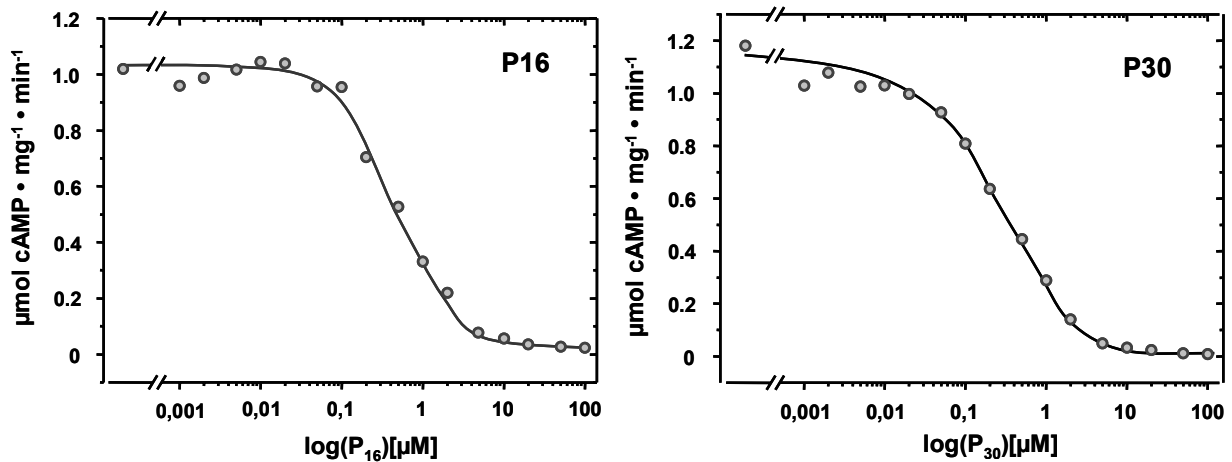


Abbildung 5-57 Hemmung des isolierten Dimers_{WT} durch P16 und P30 (je 1-100 μM).

Dosis-Wirkungskurven, n=2. AC-Test mit $200\mu\text{M}$ ATP als Substrat, $0,5\mu\text{g}$ Protein/Test, Bedingungen: Standard, SEMs nicht gezeigt.

Die IC_{50} -Werte sind $0,5\mu\text{M}$ und $0,2\mu\text{M}$ für P16 bzw. P30. $300\mu\text{M}$ Pyrophosphat hemmte zu 91%.

5.4.4.2. Hemmung durch Ölsäure

Es wurde gefunden, dass die AC Rv2212 aus *M. tuberculosis* von Fettsäuren beeinflusst wird (Abdel Motaal et al., 2006). Hier war die Frage, ob dies auch auf die AC Rv3645 zutrifft. Dazu wurde der Einfluss von Ölsäure auf die AC Rv3645, auf HAMP-AC Rv3645 und auf das Holoenzym Rv3645 getestet (Abbildung 5-58, links). In einem weiteren Versuch wurde der WT untersucht (Abbildung 5-58, rechts) im Vergleich zur AC Rv3645 und zu HAMP-AC Rv3645.

Ergebnisse

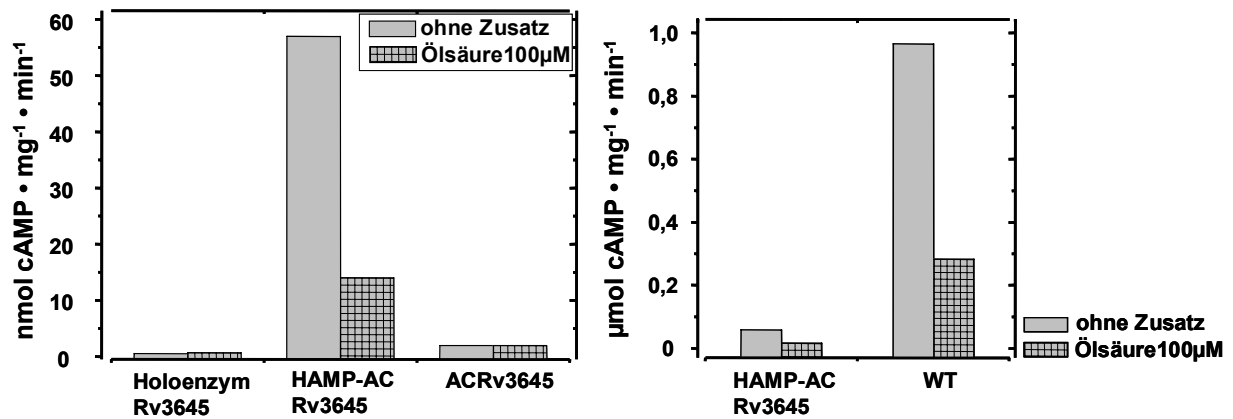


Abbildung 5-58 Einfluß von Ölsäure auf AC Rv3645. Testbedingungen: Standard, 200µM ATP.

Links: spezifische Aktivität von Holoenzym Rv3645 (24µg Protein/Test, aus Membranpräparation, + regenerierendes System im AC-Test), HAMP-AC Rv3645 (1µg Protein/Test) und AC Rv3645 (10µg Protein/Test) ± 100µM Ölsäure; n=2-4, SEMs nicht gezeigt

Rechts: spezifische Aktivität von HAMP-AC Rv3645 und WT (0,5µg Protein/Test) ± 100µM Ölsäure; n=2. Man beachte die unterschiedlichen Skalen.

Das Holoenzym Rv3645 wird von der Ölsäure ebenso wie die Cyclase nicht beeinträchtigt. Im WT wird die spezifische Aktivität durch die Ölsäure auf 29% reduziert. Eine Dosis-Wirkungs-Kurve für Ölsäure ergab keine vollständige Hemmung bis 100µM (Abb. 5.59).

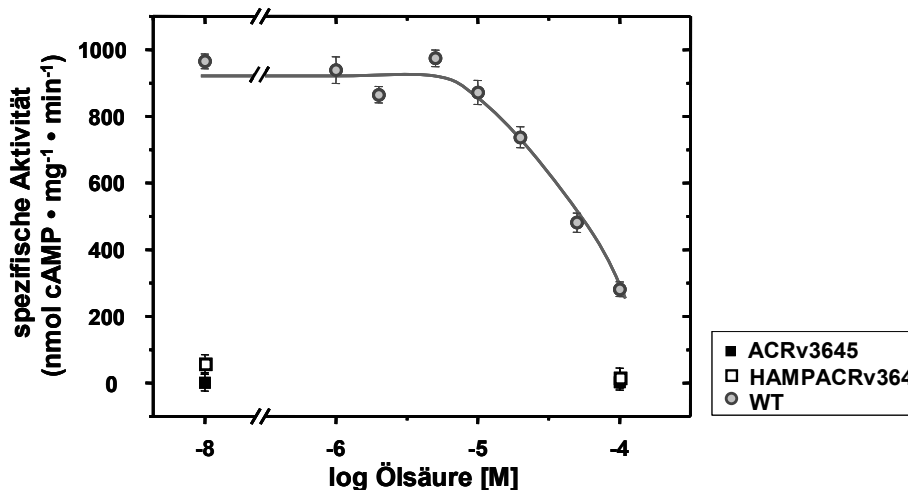


Abbildung 5-59 Dosis-Wirkungskurve für Ölsäure auf WT. Testbedingungen: Standard, 0,5µg Protein, 200µM ATP; n=4

Ab 20µM Ölsäure ist eine Abnahme der Aktivität erkennbar, über 100µM Ölsäure wurde nicht getestet, da keine physiologische Relevanz vorliegen dürfte.

Ergebnisse

5.4.5. Kristallisation

Die Kristallisation des WT wurde mit einem Roboter (Genomic Solutions, Cartesian Dispensing Systems) am MPI Tübingen, Arbeitsgruppe Prof. Lupas durchgeführt. 10mg Protein (in 1ml) reichen, um 1000 Bedingungen zu testen. Zur Kristallisation wurde nur das aufkonzentrierte Dimer des WT angesetzt (5.4.3, Abs. 5). Zusätzlich wurden Ansätze mit verschiedenen Inhibitoren angesetzt. Die Säule, welche für den abschließenden Reinigungsschritt eingesetzt wurde, war Superdex 200 (16/60, prep. grade). Die Trennleistung für die Reinigung von WT war so gut, daß Dimer in ausreichenden Mengen erhalten wurde. Zur Anschauung zwei der insgesamt sechs Gelfiltrationsläufe (Abbildung 5-60).

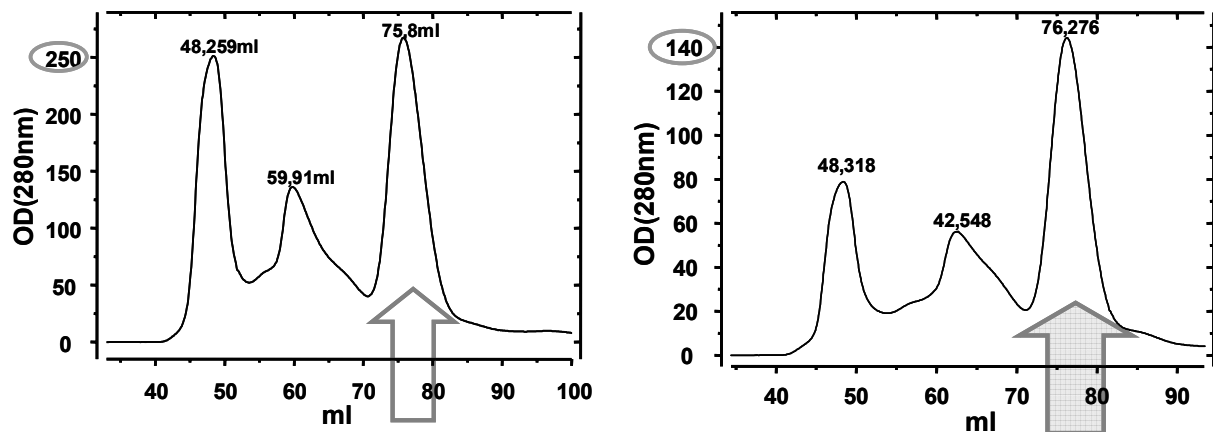


Abbildung 5-60 Chromatografie von WT an Superdex 200 (16/60, prep. grade), ÄKTA.

Links: Auftrag von 28mg Protein WT; 75,8ml \equiv Dimer (62kDa), peaks bei 48,259ml und 59,91ml: Multimere, Verteilung etwa 65:35 (Dimer). Die Aggregation zu Multimeren wird durch höhere Proteinkonzentration gefördert (s. OD_{280nm}). Blockpfeil: Dimer-Fractionen zum Aufkonzentrieren.

Rechts: Auftrag von 12mg Protein WT; 76,276ml \equiv Dimer, peaks bis 42,548ml: Multimere, Verhältnis zu Dimer: etwa 50:50. Blockpfeil: Dimer-Fractionen zum Aufkonzentrieren; niedrigere Proteinkonzentration begünstigt Dimer-Ausbeute.

Das aus den Gelfiltrationsläufen erhaltene Dimer wurde gepoolt, aufkonzentriert und zur Kristallisation angesetzt.

5.4.5.1. Kristallisation ohne Inhibitor

Im ersten Screen mit 1000 Bedingungen entwickelten sich Kristalle nach ungefähr 25 Tagen.

Ergebnisse

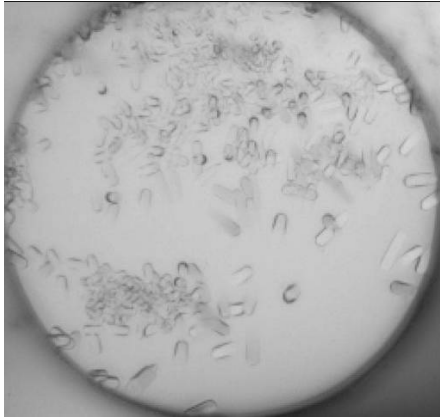


Abbildung 5-61

Minikristalle (ca. 9µg Protein/Tropfen),

Bedingung: HAMPTON Research Index 30, das entspricht: 0,1M NaCl; 0,1M Bis/Tris pH 6,5; 1,5M Ammoniumsulfat

Anschließend wurde ein so genannter Additive Screen durchgeführt, der mit weiteren 100 Ansätzen eine Variation des Puffers untersucht, mit dem Kristalle wuchsen. Diese Ansätze erfolgten manuell. Ziel dieses Screens: die Kristalle auf eine vermessbare Größe zu 'züchten'.

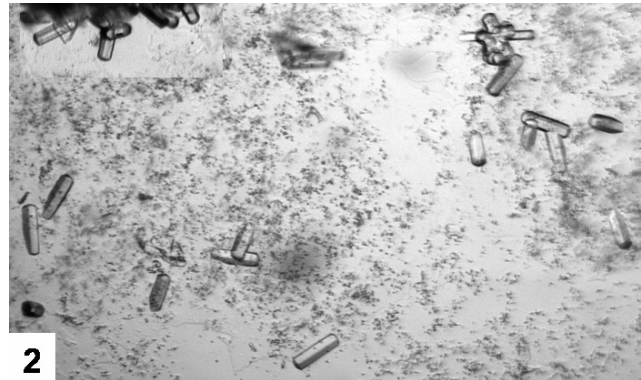
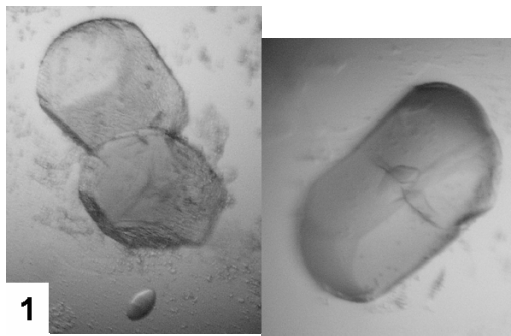


Abbildung 5-62 Kristalle aus HAMPTON Research Index 30 (0,1M NaCl; 0,1M Bis/Tris pH 6,5; 1,5M (NH₄)₂SO₄) plus verschiedene Zusätze aus HAMPTON Additive Screen™ HR2-428.

1: plus 0,1M NaI, Größe: 200x300µm

2: plus 3% (w/v) 1,5-Diaminopentan-dihydrochlorid, Größe: 100x30µm

Die Proteinkristalle waren nun für eine Vermessung groß genug. Mit dem Additiv NaI (0,1M) sahen die Kristalle vielversprechend aus, daher wurde nochmals der Ausgangspuffer (Index 30) mit den verschiedenen Additiven und zusätzlich überall 0,1M NaI angesetzt. Kristalle bildeten sich bereits nach 3 Tagen mit einer Größe von ca. 200x200x300µm. Eine Vermessung am Synchrotron, SLS Zürich, ergab eine Streuung etwa bis 4Å, jedoch lag kein auswertbarer Datensatz vor. Die Kristalle mit 1,5-Diaminopentan-dihydrochlorid-Zusatz (Abbildung 5-62; 2) streuten mit 3Å; hier wird ein Datensatz ausgewertet.

5.4.5.2. Kristallisation mit Inhibitor

Als Inhibitor wurde 1mM GTP mit 1mM MgCl₂ zugesetzt, zweitens Polyphosphat P16 (0,4mM) und drittens GTP und Polyphosphat gemeinsam. Auch hier entwickelten sich Kristalle, deren Vermessung jedoch aussteht.

Ergebnisse

5.5. Holoenzyme: *Rv3645* und *Corynebacterium glutamicum*

Wie eingangs gezeigt besteht eine hohe Ähnlichkeit der Sequenzen von *Corynebacterium glutamicum Cgl0311* und den vier mykobakteriellen Holoenzymen der Klasse IIIb ACn. Da sich diese Arbeit im Besonderen mit HAMP und AC aus *Rv3645* beschäftigt, ist im Folgenden nochmals ein Ausschnitt im Alignment gezeigt.

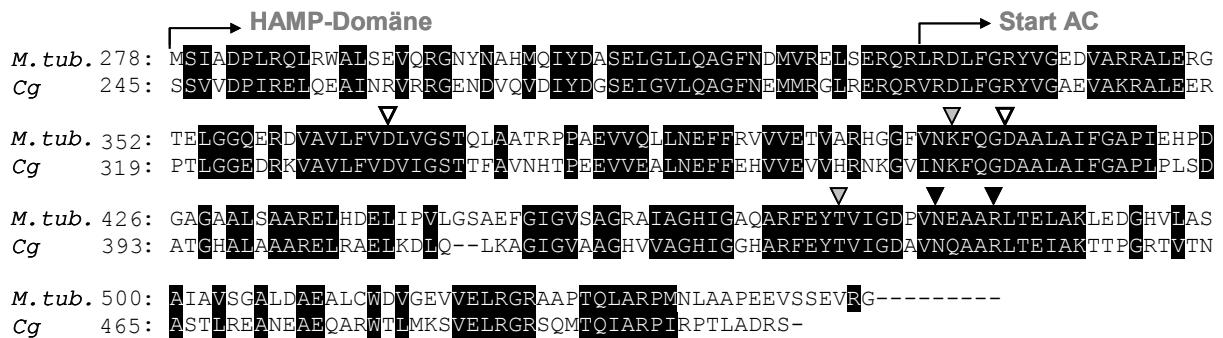


Abbildung 5-63 Alignment der ACn *Rv3645* aus *M. tuberculosis* (*M. tub.*) und *Corynebacterium glutamicum Cgl0311* (*Cg*).

Mit Pfeilen angezeigt ist der Beginn der HAMP- und AC-Domänen (Start AC). Schwarz unterlegt: identische und ähnliche AS, Alignment nach Clustal W.

▽: AS; welche für die Me^{2+} - Bindung verantwortlich sind; ▽: AS, die Adenin/Purin spezifizieren, ▼:AS, die den Übergangszustand der AC stabilisieren

C. glutamicum besitzt nur *eine* AC, die aus einer Transmembranregion, anschließender HAMP-Domäne und C-terminaler AC besteht. Daher ist *C. glutamicum* in unser Interesse gerückt. Das AC-Holoenzym von *C. glutamicum Cgl0311* sollte kloniert, exprimiert und auf AC Aktivität getestet werden.

5.5.1. Expression und Aktivitätstest

Die Expression des Holoenzym *Cgl 0311* erfolgte bei 16°C über Nacht, bei 20°C und 30°C je fünf Stunden mit 50µM bzw. 500µM IPTG. Die Kombination aus 50µM IPTG, 20°C, 5 Stunden hat sich bewährt (Abbildung 5-64) und wurde im Weiteren angewendet. AC Aktivität wurde mit einer Membranpräparation mit regenerierendem System getestet.

Ergebnisse

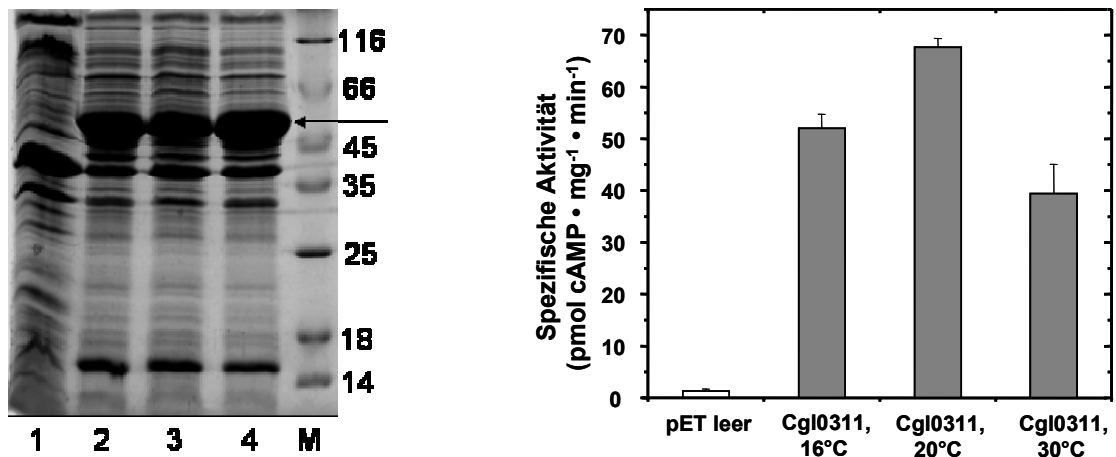


Abbildung 5-64 Expression des Holoenzym Cgl0311 bei verschiedenen Temperaturen, AC-Test.

Links: SDS-Gel (15%), 1: pET-Leervektor Kontrolle (15µg M-Präp.); 2: Holoenzym Cgl0311, 16°C (20µg M-Präp.); 3: Holoenzym Cgl0311, 20°C (14µg M-Präp.); 4: Holoenzym Cgl0311, 30°C (14µg M-Präp.). Der Pfeil markiert die erwartete Größe von 55,5kDa. Trennung aufgrund des 15%igen SDS-Gels nicht optimal.

Rechts: AC-Test des bei unterschiedlichen Temperaturen (50µM IPTG) exprimierten Holoenzym Cgl0311; Bedingungen: Standard, 200µM ATP, regenerierendes System, 23-28µg Protein/Test aus M-Präp.; Kontrolle pET Leervektor (keine Aktivität); n=2

Das Holoenzym *Cgl0311* ist aktiv (68 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹). Benötigt die AC aus *Cgl0311* Mn²⁺ oder Mg²⁺ als Cofaktor? Dies wurde getestet. 3mM Mn²⁺ ist als Cofaktor bevorzugt (nicht gezeigt). Abschließend wurde die pH-Abhängigkeit bestimmt (pH 6,5 – 9), Abbildung 5-65.

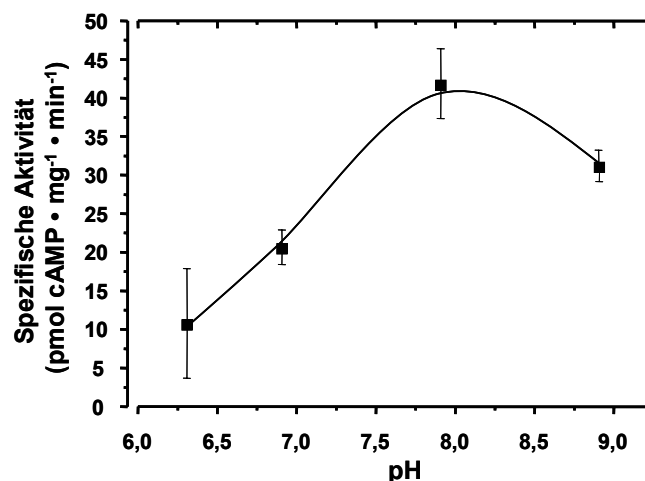


Abbildung 5-65 pH-Abhängigkeit Holoenzym Cgl0311 bei pH 6,3-8,9 (pH-Werte bei 37°C). Puffer pH 6-9: Tris/HCl. Testbedingungen: Standard, 200µM ATP, regenerierendes System, 23µg Protein (M-Präp.); n=2.

Das pH-Optimum liegt bei pH 8.

Ergebnisse

5.5.2. Adenylatcyclaseaktivität in *C. glutamicum* Cgl0311

Corynebakterien wurden bei 30°C angezchtet (Medium s. 3.5.2.3), zuerst in einer Vorkultur über Nacht, anschließend Überimpfung in zwei 200ml-Kolben. Bei einer OD=0,73 nach 3,5 Stunden wurde der erste Kolben geerntet. Der zweite Kolben wurde nach 8 Stunden bei OD=1,83 geerntet. Die Membranpräparation der Zellen wurde auf AC Aktivität untersucht.

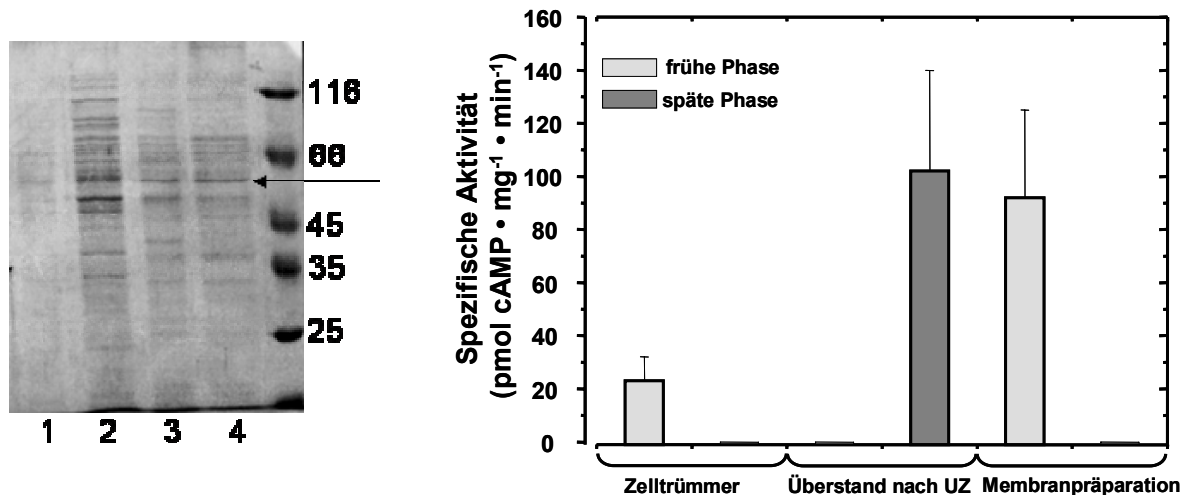


Abbildung 5-66 Bakterienaufzucht Cgl0311 mit Test auf AC Aktivität.

Links: SDS-Gel (12,5%) mit verschiedenen Wachstums- und Präparationsstadien des gezüchteten Bakteriums Cgl0311; 1: Überstand nach UZ, frühe Phase, 1,3µg; 2: Überstand nach UZ, späte Phase, 1,6µg; 3: M-Präp frühe Phase, 1,6µg; 4: M-Präp späte Phase, 1,3µg. Pfeil: markiert die Position des erwarteten AC-Proteins mit 56 kDa.

Rechts: AC-Test unter Angabe der spezifischen Aktivität, Testbedingungen: Standard, 200µM ATP, regenerierendes System, zwischen 6µg und 24µg Protein aus M-Präp., n=2

Bei diesem Versuch wurde eine mit dem rekombinanten Protein vergleichbare spezifische AC Aktivität gefunden. Dabei ist bemerkenswert, dass während der frühen Wachstumsphase nur in der Membran Aktivität vorliegt (92 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹), während das Protein der späten Wachstumsphase nicht mehr in der Membranfraktion vorliegt. Im cytosolischen Überstand findet sich AC Aktivität der späten Wachstumsphase (101 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹). Dies sollte bei weiteren Versuchen beachtet werden.

5.5.3. Einfluss von Detergenzien

Um das Holoenzym aus *C. glutamicum* aus der Membranfraktion zu erhalten, wird ein Detergenz-Zusatz nötig sein. Dabei sollte die AC Aktivität nicht zu sehr beeinträchtigt werden. Es wurde eine Auswahl von Tensiden getestet. Das Detergenz wurde unmittelbar vor dem Test zur Membranpräparation gegeben und einige Minuten vor dem Start der Reaktion inkubiert.

Ergebnisse

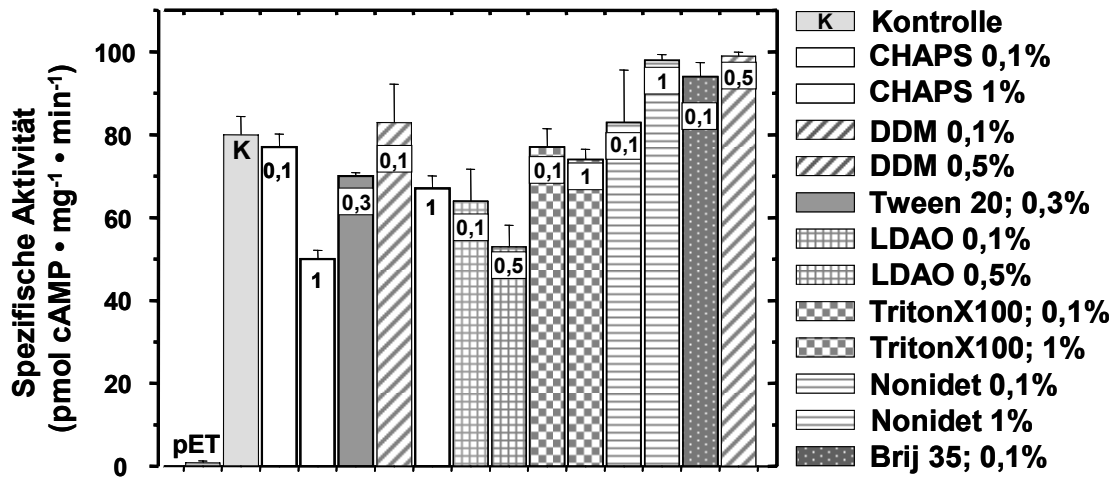


Abbildung 5-67 Detergenz-Einfluss auf Holoenzym Cgl0311. Testbedingungen: Standard, 200µM ATP, 38µg Protein aus M-Präp, regenerierendes System, n=2. K=Kontrolle ohne Detergenzbehandlung, die Zahl innerhalb der Säulen ist die Konzentrationsangabe (%) des jeweiligen Detergenz (mit Mustern markiert, Beschriftung rechts der Grafik). Abkürzungen: CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonsäure; DDM: Dodecyl-β-D-maltosid; Tween20: Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat; LDAO: Lauryl-dimethyl-amin-N-oxid; Triton X 100: 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenyl-polyethylenglykol, Nonidet: Octylphenoxypolyethoxyethanol, Brij 35: Polyoxyethylen(23)-laurylether

5.5.4. Chimären

Die Domänenstrukturen der AC Cgl0311 und der mykobakteriellen AC Rv3645 sind identisch. Daher wurden Chimären hergestellt, in denen Domänen ausgetauscht wurden. Obendrein war die Frage, ob die jeweilige HAMP-Domäne funktionell durch HAMP *Af1503* ersetzt werden kann.

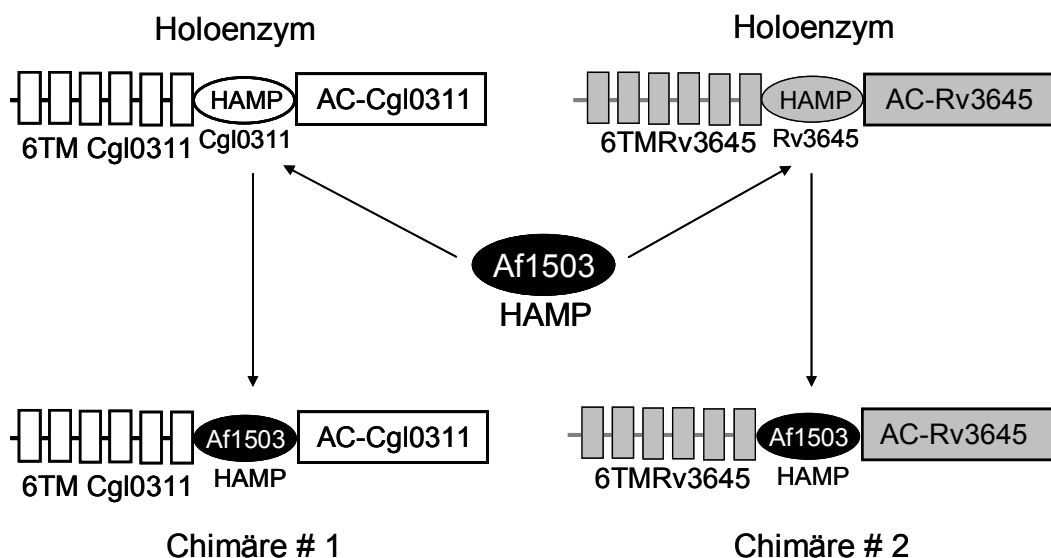


Abbildung 5-68 Einbau der HAMP-Domäne *Af1503* in die beiden Holoenzyme *Cgl0311* und *Rv3645*. Berechnetes MW der Konstrukte: Chimäre #1: 55,4kDa und Chimäre #2: 58kDa

Ergebnisse

Die Chimären wurden unter den gleichen Bedingungen exprimiert wie die Holoenzyme. Die Membranpräparation erfolgte nach Standardbedingungen.

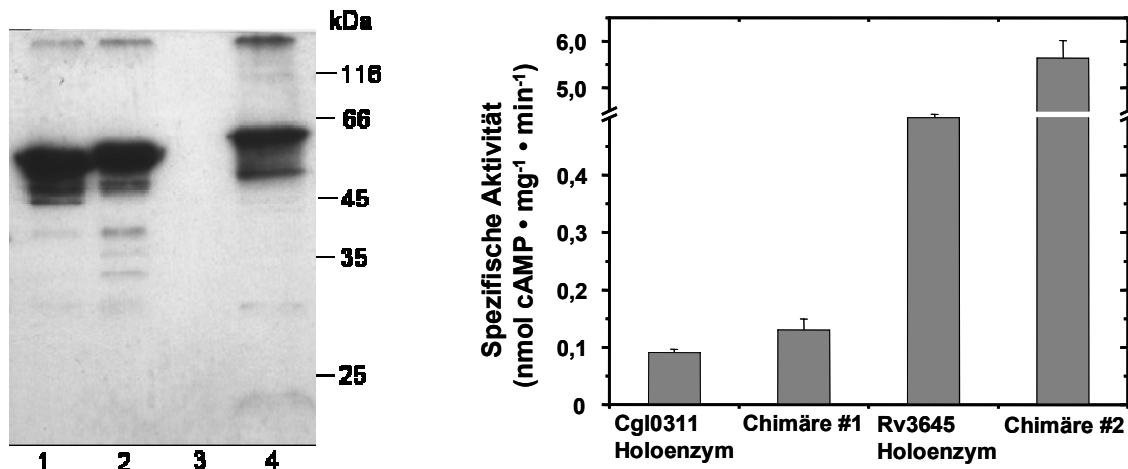


Abbildung 5-69 Western-Blot und AC Aktivität der Holoenzyme *Cgl0311* und *Rv3645* sowie ihrer Chimären (#1 und #2); Membranpräparationen.

Links: Western-Blot (12,5%iges Gel), 1: *Cgl0311* Holoenzym, 28,8µg; 2: Chimäre #1, 28,8µg; 3: *Rv3645* Holoenzym, 19,2µg, kein Signal, trotz korrektem AK (RGS-AK für 6xHis-Tag, vgl. 4.12.3); 4: Chimäre #2, 19,2µg

Rechts: AC-Test Holoenzyme und Chimären, n=2. Testbedingungen: Standard, regenerierendes System, 38µg Protein (aus M-Präp) für Holoenzym *Cgl0311* und Chimäre #1; 24-30µg (aus M-Präp.) für Holoenzym *Rv3645* und Chimäre #2

Im Western-Blot deutlich zu sehen ist die Bande des Holoenzym *Cgl0311* sowie seiner Chimäre bei 55kDa. Mögliche Abbruchbanden können durch zuviel aufgetragenes Protein begründet sein. Das Holoenzym *Rv3645* zeigt so kein Signal im Western-Blot, diese Beobachtung konnte von Dr. J. Linder bestätigt werden. Im Holoenzym *Rv3645* geht der N-terminale His-Tag wahrscheinlich durch posttranslationale Prozessierung verloren. Nach Information von Dr. J. Linder lassen sich kleine Mengen des Proteins mit His-Tag anreinigen und ergeben dann eine Bande im Western Blot. Die Chimäre des Holoenzym *Rv3645* ergibt eine deutliche Bande bei 58kDa.

Betrachtet man die spezifische Aktivität der Chimären, lässt sich feststellen, dass in Chimäre #1 der Ersatz der HAMP-Domäne durch die aus *Afl503* die AC Aktivität unverändert lässt (bleibt bei rund 100 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹). Dagegen verhält sich Chimäre #2 anders; sie ist mit der *Afl503* HAMP-Domäne um den Faktor 8 aktiver als das Holoenzym *Rv3645*:

$5,6 \pm 0,4$ nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ gegen $0,7 \pm 0,05$ nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹.

Ergebnisse

5.6. *Corynebacterium glutamicum* Cgl0311

Die Cyclase des Holoenzym von *C. glutamicum* hat nur geringe AC Aktivität. Im folgenden Kapitel wird das lösliche Protein untersucht. In diesem Zusammenhang sollte die Cyclase aus *Cgl0311* charakterisiert werden.

5.6.1. Expressionsbedingungen AC und HAMP-AC aus *Cgl0311*

Aus Vorversuchen (Daten hier nicht gezeigt) sowie in Anlehnung an die Expressionsbedingungen des Holoenzym Cgl0311, ergaben sich für die Konstrukte AC und HAMP-AC folgende Expressionsbedingungen:

Temperatur	Zeit	IPTG
20°C (nach Animpfen bei 30°C bis OD 0,4-0,6)	5h	50µM

Die Reinigung erfolgte nach 5.4.1. Allerdings war die Ausbeute nach der Reinigung gering (im Durchschnitt 0,3-0,4mg/ml je Protein). Die AC ließ sich sauber reinigen. Die HAMP-AC zeigte jedoch sowohl auf dem SDS-Gel als auch auf dem Western-Blot eine Abbruchbande.

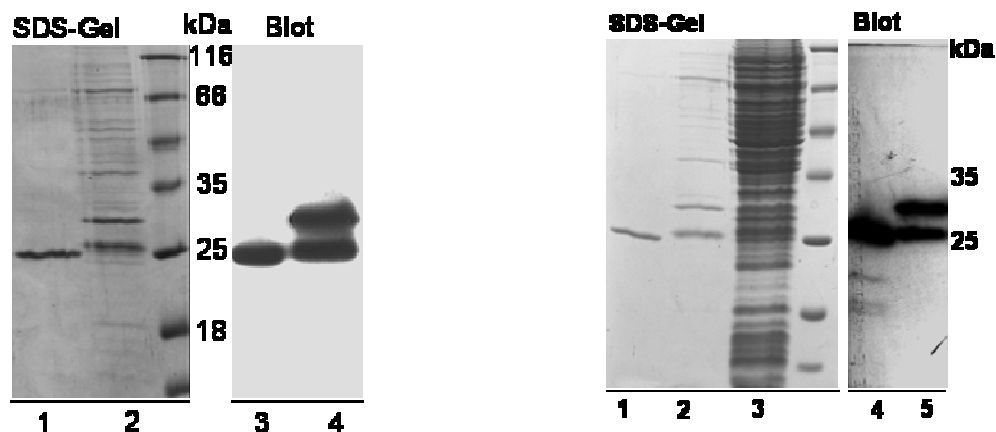


Abbildung 5-70 SDS-Gel (15%) und Western-Blot von AC Cgl0311 und HAMP-AC Cgl0311, Reinigung der Proteine ohne und mit Proteasehemmer.

Links: Reinigung ohne Proteasehemmer. 1 und 2: SDS-Gel, 1: AC, 1,6µg, erwartetes MW bei 23,5kDa; 2 HAMP-AC, 2,4µg, erwartetes MW bei 29,6kDa, Abbruchbande bei 26kDa. 3 und 4: Western-Blot, 3: AC und 4: HAMP-AC, Abbruchbande bei 26kDa ebenfalls detektiert. Auftrag: jeweils gleiche Proteinmenge wie beim Gel.

Rechts: Reinigung mit Proteasehemmer. 1, 2 und 3: SDS-Gel, 1: AC, 1,6µg; 2: HAMP-AC, 1,8µg; 3: Nickelüberstand HAMP-AC; 4 und 5: Western-Blot, 4: AC (0,8µg); 5: HAMP-AC mit 0,9µg, Abbruchbande bei 26kDa wiederum detektiert.

Die Cyclase *Cgl0311* zeigt die erwartete Bande bei 23,5kDa. HAMP-AC Cgl011 mit MW 29,6kDa hat eine definierte Abbruchbande bei 26kDa. Selbst in einem weiteren Reinigungsversuch mit einem Proteasehemmer erschien diese Bande wieder. Wenn diese rund 35 AS im C-terminalen Bereich der AC fehlen (C-terminal, da sich der His-Tag mit der

Ergebnisse

Erkennungsregion für den AK am N-terminus befindet), wird wahrscheinlich das für die Aktivität essentielle katalytische Zentrum der AC nicht tangiert. Da sich die Aktivität von HAMP-AC als sehr gering herausstellte, kann man nicht eindeutig sagen, ob dies das Resultat dieser Verkürzung ist.

5.6.2. Aktivitätstests

Die Testung beider Proteine erwies sich als problematisch, da sie wenig aktiv waren. Vorversuche, bei denen zum wiederholten Male die Identität des metallischen Cofaktors belegt werden sollte, zeigten, dass dies Mn^{2+} ist (s. auch Holoenzym). Auch höhere Substratkonzentrationen ergaben keine hohe Aktivität. Die Klonierung in den pET-Vektor und anschließende Expression in pLysS-Zellen brachte keinen Erfolg wie der Versuch, mit verschiedenen Nickelaffinitätsmaterialien zu reinigen. Die Proteinabhängigkeit von 25-4000ng wurde getestet und war linear (Abbildung 5-71).

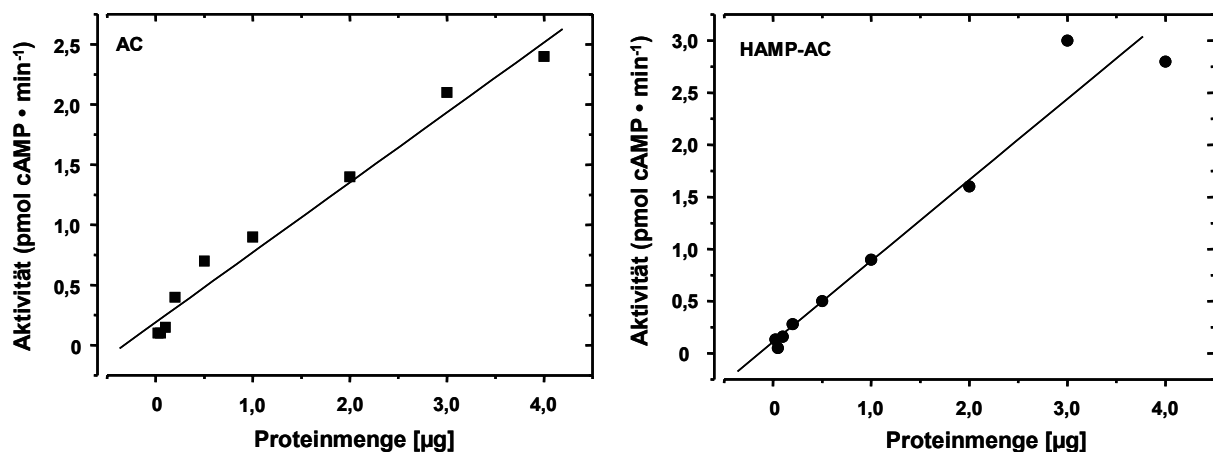


Abbildung 5-71 Proteinabhängigkeit von AC Cgl0311 und HAMP-AC Cgl0311. Testbedingungen: Standard, 200µM ATP, 25-4000ng Protein.

Links: AC Cgl0311, n=2. Rechts: HAMP-AC Cgl0311, n=2.

Die kinetische Charakterisierung wurde mit 25ng Protein/Test durchgeführt.

Konstrukt	V_{\max} (nmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	K_m bzw. SC_{50} (µM)	Hill-Koeffizient
AC	32 ± 7	1109 ± 75	$1,2 \pm 0,0$
HAMP-AC	22 ± 6	515 ± 51	$1,8 \pm 0,0$

Tabelle 5-8 Ergebnisse der kinetischen Untersuchung von AC und HAMP-AC aus *C. glutamicum Cgl0311*, Testbedingungen: Standard, 25-2000µM ATP, 25ng Protein; n=4.

V_{\max} der beiden Konstrukte unterschied sich nicht signifikant ($p > 0,05$). Auffallend ist, dass die HAMP-Domäne vor der katalytischen Domäne in einer eindeutigen Kooperativität und in (2fach) verbesserter Substrataffinität resultiert ($p < 0,05$; Unterschied signifikant).

Ergebnisse

5.6.3. Af1503 HAMP-Corynebacterium AC

Im Falle der mycobakteriellen *Rv3645* AC wurde erhöhte AC Aktivität mit der HAMP-Domäne *Af1503* aus *A. fulgidus* gefunden (s. 5.2.2). Wie verhält sich AC *Cgl0311*, wenn HAMP *Cgl0311* gegen HAMP *Af1503* ausgetauscht wird? Ein Alignment zeigt Gemeinsamkeiten und Unterschiede der HAMP-Domänen von *Af1503*, *Rv3645* und *Cgl0311*.



Abbildung 5-72 Alignment der HAMP-Domänen aus *A. fulgidus Af1503*, *M.tuberculosis Rv3645* und *C. glutamicum Cgl0311*, nach Clustal W. schwarz unterlegt: identische und ähnliche AS in allen Sequenzen. Grau unterlegt: identische und ähnliche AS in zwei Sequenzen, hauptsächlich bei *Rv3645* und *Cgl0311*. Pfeile: *a* und *d*-Positionen, die die bevorzugten hydrophoben AS in α -helicalen coiled-coil kennzeichnen und HAMP-Domänen zugrunde liegen.

5.6.3.1. Expression und Reinigung

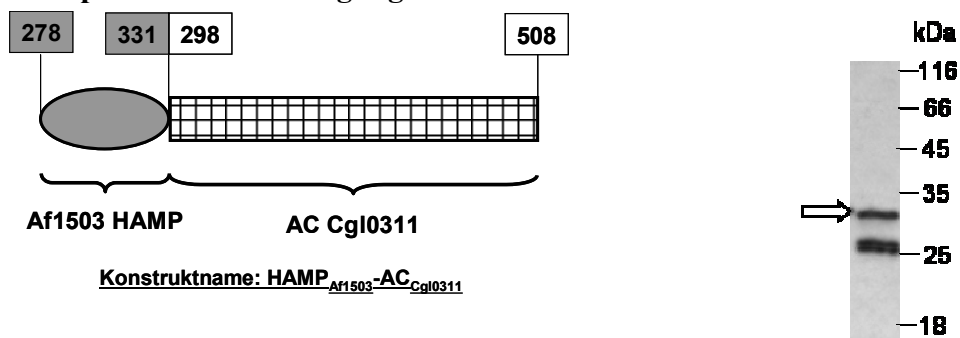


Abbildung 5-73 Konstrukt HAMP_{Af1503}-AC_{Cgl0311} mit Western-Blot. Links: HAMP_{Af1503}-AC_{Cgl0311} unter Angabe der AS: HAMP-Domäne *Af1503*: 278 bis 331, AC *C. glutamicum Cgl0311*: 298 bis 508, berechnetes MW des Konstruktes: 30kDa.

rechts: Western-Blot von HAMP_{Af1503}-AC_{Cgl0311} mit 80ng Protein, Pfeil: gewünschtes Protein bei 30kDa; Abbruchbande bei 26kDa detektiert.

Es wurde bei 16°C über Nacht exprimiert, da zu diesem Zeitpunkt mit 200µM ATP Aktivität gut messbar war. Die Reinigung erfolgte nach Standardbedingungen, die Ausbeute war nicht groß (0,1-0,15 mg/ml). Sowohl auf dem SDS-Gel (nicht gezeigt) als auch im Western-Blot (Abbildung 5-73, rechts) erscheint die gleiche Bande bei 26kDa wie schon bei HAMP-AC *Cgl0311* (s. Kap. 5.6.1). Wie dort ausgeführt, handelt es sich um ein C-terminal verkürztes Protein, da der His-Tag, der im Western-Blot detektiert wird, N-terminal sitzt. Es fehlen etwa 4kDa, in etwa 33-38 AS entsprechend. In der Sequenz ist keine Proteaseschnittstelle augenscheinlich (Abbildung 5-63, S. 96). Man könnte versuchen, eine AC zu klonieren, die C-terminal um diesen Bereich verkürzt ist.

Ergebnisse

5.6.3.2. Proteinabhängigkeit

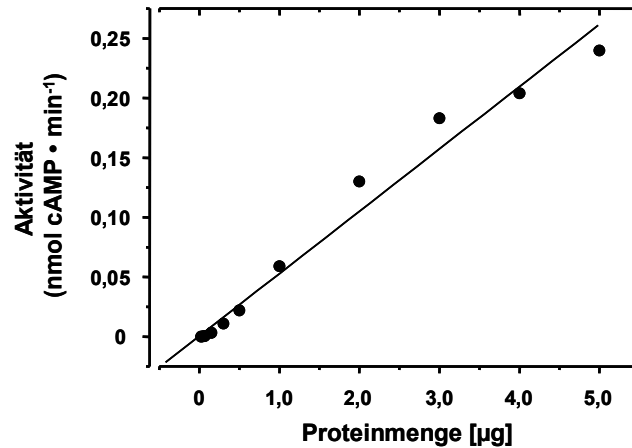


Abbildung 5-74 Proteinabhängigkeit HAMP_{Afl503}-ACC_{g10311}; Testbedingungen: Standard, 200µM ATP, 25-5000ng Protein; n=2

Die Proteinabhängigkeit ist linear. Im Folgenden wird mit 1,5µg Protein/Test gearbeitet.

5.6.3.3. Temperaturabhängigkeit

Diese wurde von 0°-60°C gemessen. Zudem wurden die Lagerungsbedingungen für das Protein untersucht.

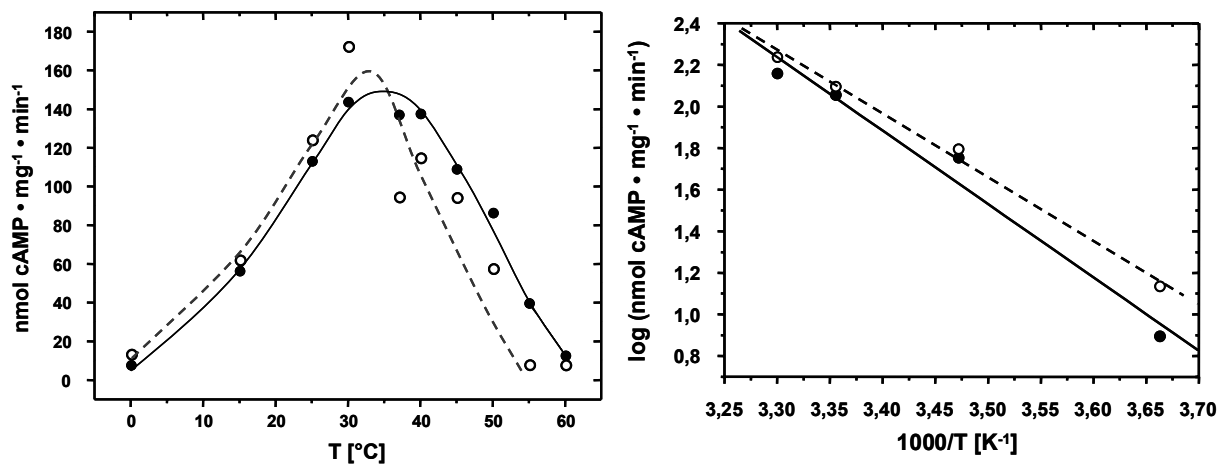


Abbildung 5-75 Temperaturabhängigkeit HAMP_{Afl503}-ACC_{g10311} und Arrhenius-Plot.

Links: spezifische Aktivität des bei unterschiedlichen Bedingungen gelagerten Proteins; —●—: -20°C, 40% Glycerol; -○- -: 4°C, 20% Glycerol
Testbedingungen: Standard, 1,5µg Protein, n=4.

Rechts: Arrhenius-Plot, Symbole wie links. Geradengleichungen:
—●—: $y=13,88-3,5286x$ und -○- -: $y=12,31-3,0429x$.

Die Lagerung bei -20°C mit 40% Glycerol scheint günstiger zu sein als die bei 4°C mit 20% Glycerol (schwankende Werte). Für den Arrhenius-Plot wurde die Aktivität beider Lagerungen separat und die Temperaturen von 0–30°C verwendet (linearer Bereich). Die Steigung der Plots beträgt $m = -3,5286$ bzw. $m = -3,0429$ (Abbildung 5-75, rechts). Daraus

Ergebnisse

lässt sich nach der Gleichung $m = -E_A / (2,3 \cdot R)$ (mit $R=8,276 \text{ J/mol}$) die Aktivierungsenergie berechnen: $E_A = 67 \text{ kJ}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ bzw. $60 \text{ kJ}/(\text{mol} \cdot \text{K})$. Mit diesen Werten liegt die AC Cgl0311 durchaus in dem beschriebenen Bereich für ACn (Tang and Hurley, 1998).

5.6.3.4. pH-Optimum

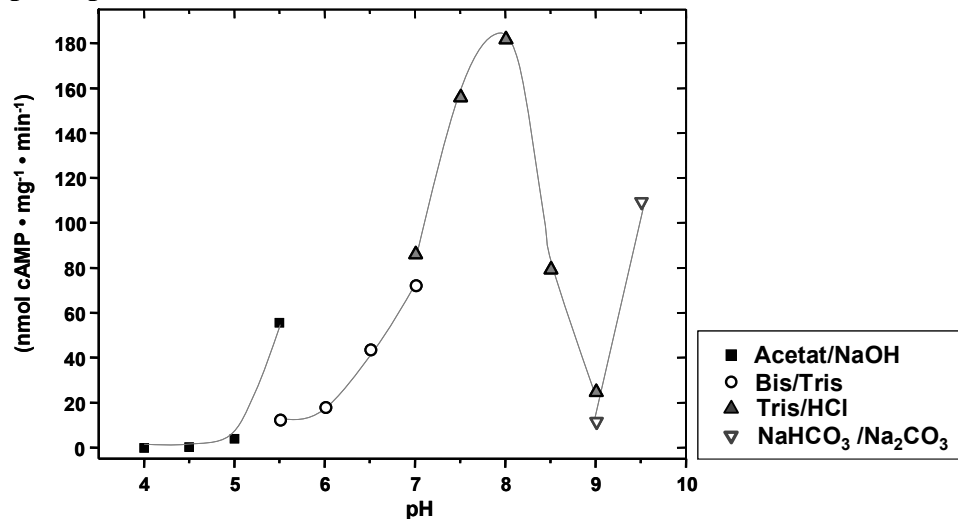


Abbildung 5-76 pH-Optimum $\text{HAMP}_{\text{Afl503}}\text{-AC}_{\text{Cgl0311}}$; Testbedingungen: Standard, $1,5\mu\text{g}$ Protein, je 50mM Puffer, $n=2$.

Das Optimum liegt bei pH 8,0. Auch hier ähnelt die Cyclase den Klasse III-ACn (Linder, 2006; Linder et al., 2004; Sinha et al., 2005; Wetterer, 2004).

5.6.3.5. Kinetische Charakterisierung

Die Kinetik der AC Cgl0311 wurde bei 37°C , pH 8,0 mit $1,5\mu\text{g}$ Protein untersucht.

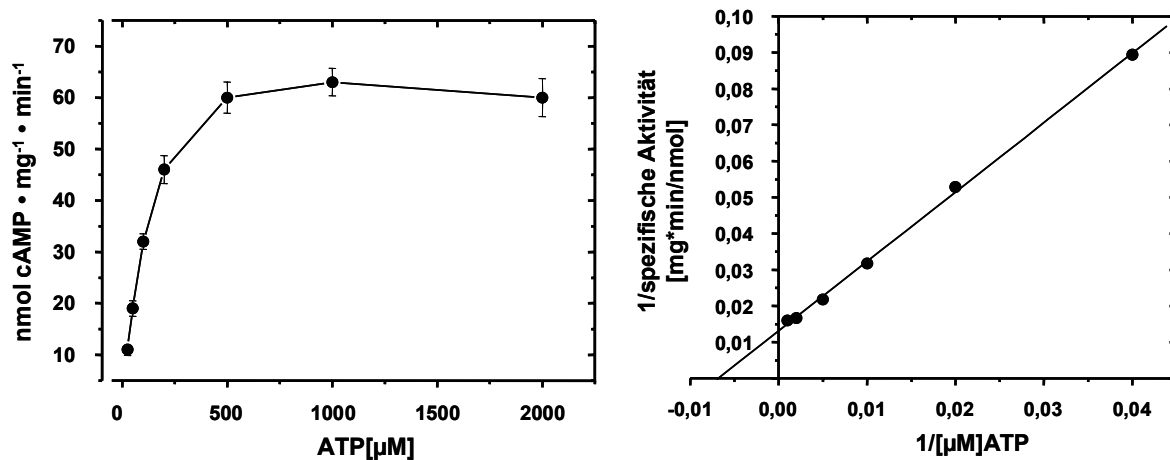
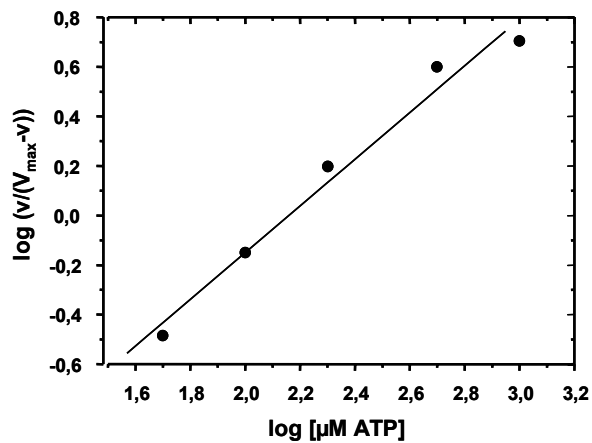


Abbildung 5-77 Substratkinetik von $\text{HAMP}_{\text{Afl503}}\text{-AC}_{\text{Cgl0311}}$. Testbedingungen: Standard, $25\text{-}2000\mu\text{M}$ ATP; $n=4$. Auftrag nach

links: Michaelis-Menten und rechts: Lineweaver-Burk, $y=0,0131+1,9165x$, $R=0,999$

Ergebnisse



V_{\max} (nmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	75 ± 5
K_m (μM)	143 ± 17
Hill-Koeffizient	0,9 ± 0,1

Abbildung 5-78 Hill-Plot HAMP_{Af1503}-AC_{Cg10311} (links), $y=-2,095+0,967x$, $R=0,993$; $n=4$;

rechts: Zusammenfassung der kinetischen Parameter HAMP_{Af1503}-AC_{Cg10311} (Tabelle)

V_{\max} von HAMP_{Af1503}-AC_{Cg10311} beträgt 75 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. Aus dem niedrigen K_m -Wert geht hervor, dass die Affinität zu ATP hoch ist. Das Konstrukt zeigt keine positive Kooperativität.

5.6.4. 'Linker'-Austausch

Bisher wurden vor allem die beiden α -Helices der HAMP-Domäne untersucht. Stellte sich nun die Frage, ob und wie der 12 bzw. 13 AS lange Linker dazwischen beteiligt ist.

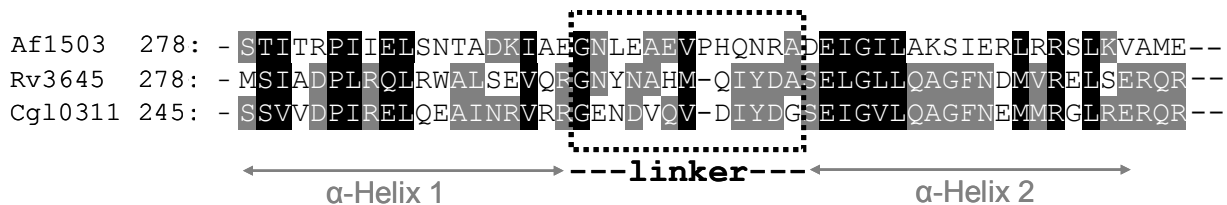


Abbildung 5-79 Alignment der HAMP-Domänen aus *A. fulgidus* Af1503, *M. tuberculosis* Rv3645 und *C. glutamicum* Cg10311, nach Clustal W.

Gestrichelter Kasten: Linker-Bereich zwischen α -Helix 1 und α -Helix 2. Schwarz unterlegt: identische und ähnliche AS in allen drei HAMP-Domänen, grau unterlegt: identische und ähnliche AS in je zwei HAMP-Domänen

Da im Linker-Bereich die meisten HAMP-Domänen unterschiedliche AS aufweisen (s. auch Abbildung 1-3), kann man vermuten, dass er zur Stabilisierung der Helices beiträgt und auf jede einzelne HAMP-Domäne abgestimmt ist.

Als erstes wurden in den Af1503 und Cg10311 HAMP-Domänen die Linker getauscht (Abbildung 5-79, Nomenklatur der Konstrukte s. Glossar).

Ergebnisse

5.6.4.1. Linker Cgl0311 und Linker Af1503

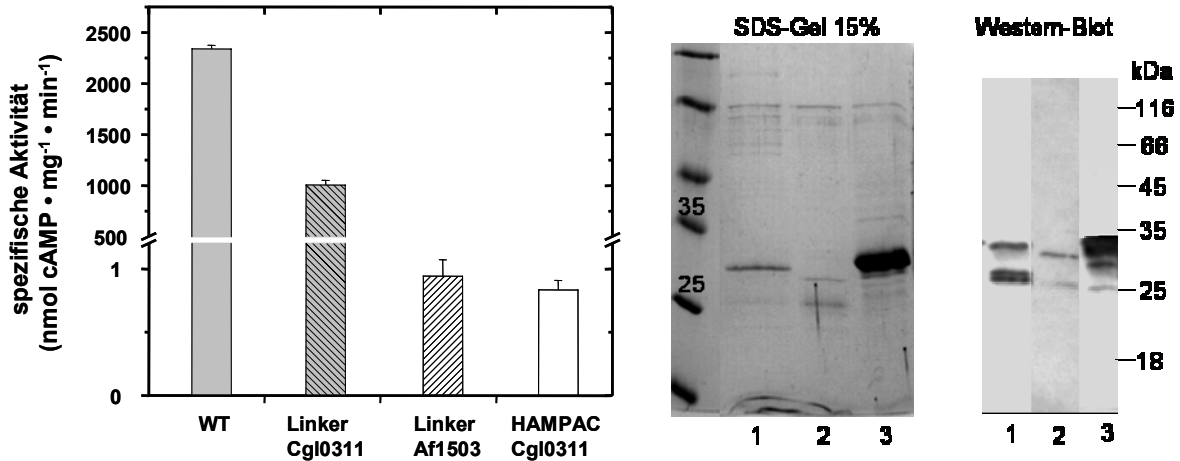


Abbildung 5-80 AC Aktivität und gereinigte Linker-Chimären Linker Cgl0311 und Linker Af1503.

Links: Aktivitätsvergleich der Linker-Chimären. WT (grau) und Linker Cgl0311 (grau, gestreift); HAMP-AC Cgl0311 (weiß) und Linker Af1503 (weiß, gestreift). Testbedingungen: Standard, je 0,5µg Protein; n=2.

Mitte: SDS-Gel; 1: HAMP_{Af1503}-AC_{Cgl0311}, 0,9µg Protein, 30kDa, 2: LinkerAf1503, 1,15µg Protein, 30kDa. 3: Linker Cgl0311, 1,27µg Protein, 30,5kDa.

Rechts: Western-Blot, 1: HAMP_{Af1503}-AC_{Cgl0311}, 80ng Protein, 2: LinkerAf1503, 0,12µg Protein; 3: LinkerCgl0311, 0,13µg Protein

In Linker Cgl0311 bewirkte der Linker-Austausch eine Erniedrigung der AC Aktivität im Vergleich zu WT, wobei WT eine ungewöhnlich hohe Aktivität aufweist (WT bei 1mM ATP betrug üblicherweise ca. 1 µmol cAMP·mg¹·min¹). In Linker Af1503 zeigte der Austausch keine Auswirkungen (Abbildung 5-80, links). Der Western-Blot weist die für das Corynebacterium typische Abbruchbande auf, bei der Chimäre Linker Cgl0311 ist nicht eindeutig, ob es sich hier um zuviel appliziertes Protein oder um Abbruchbanden handelt (Abbildung 5-80, rechts 1, 2 und 3). Auf dem SDS-Gel sind Verunreinigungen bei allen drei Proteinen zu sehen (Abbildung 5-80, Mitte).

5.6.4.2. Kinetik Linker Cgl0311

Im Folgenden wird die Chimäre Linker Cgl0311 kinetisch charakterisiert.

Ergebnisse

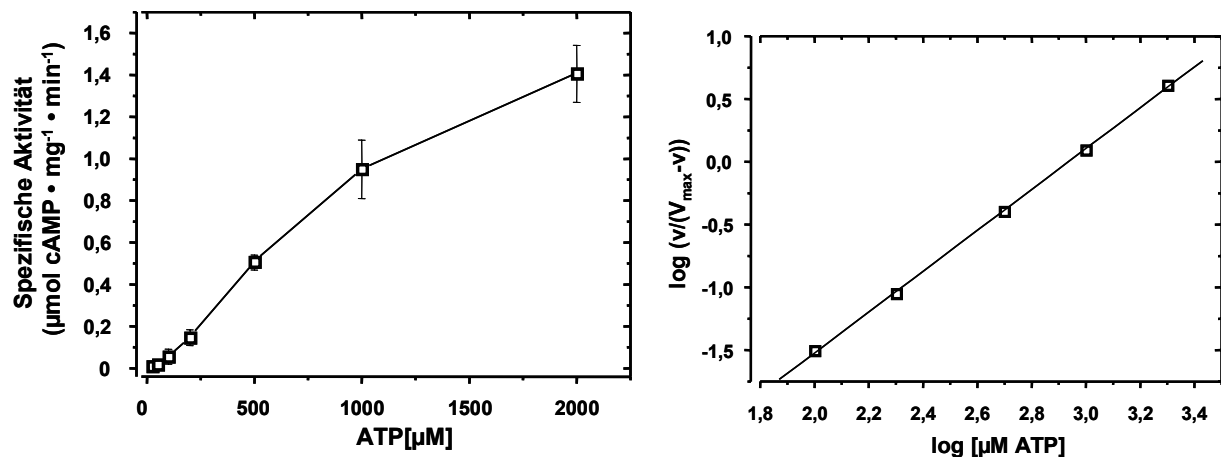


Abbildung 5-81 Substratkinetik von Linker Cgl0311. Testbedingungen: Standard, 25-2000µM ATP, 0,6µg Protein, n=4.

Links: Auftragung nach Michaelis-Menten. Rechts: Hill-Plot, $y=-4,777+1,627x$, $R=0,999$

Eine Lineweaver-Burk-Auswertung war nicht möglich, da die Gerade durch den Ursprung geht. V_{\max} wurde über Hill-fitting mit $1850 \pm 253 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ermittelt, der SC_{50} -Wert liegt bei $950 \pm 175 \text{ µM}$. V_{\max} von WT und Linker Cgl0311 unterscheiden sich nicht signifikant, die SC_{50} -Werte sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Das Enzym ist positiv kooperativ (Hill-Koeffizient=1,6).

5.7. Tsr-Rezeptor

Wie eingangs erläutert, steht M in HAMP für methyl-accepting chemotaxis proteins. Vertreter dieser Gruppe in *E. coli* sind Rezeptorproteine für Serin (*Tsr*), Aspartat (*Tar*), Galaktose, Ribose (*Trg*) und Dipeptide (*Tap*). Bereits Jin und Inouye untersuchten erfolgreich Chimären von *Tar* und EnvZ (Jin and Inouye, 1993; Jin and Inouye, 1994). Hier wurde versucht, den Rezeptorteil mitsamt der HAMP-Domäne vor die AC *Rv3645* zu hängen. Diese Versuche wurden von PD Dr. J. Linder durchgeführt (unveröffentlicht). Nur in der *Tsr*-Chimäre wurde die AC durch Serin reguliert. Da sowohl Input als auch Output bekannt sind, stellt sich zunächst die Frage, ob es bei diesem Prozess notwendig ist, dass die HAMP-Domäne von *Tsr* das Signal weiterleitet, oder ob dies auch von anderen HAMP-Domänen erledigt werden kann (Zhu and Inouye, 2004)?

Das folgende Alignment zeigt die HAMP-Domänen, die ausgehend von dieser Frage bis dato in unserem Labor untersucht worden sind (Abbildung 5-82):

Ergebnisse

```

          d   a   d   a   d               a   d   a   d   a
Rv3645    278: M S I A D P L R Q L R W A L S E V Q R G N Y N A H M Q - I Y D A S E L G L L Q A G F N D M V R E L S E R Q R
Af1503    278: S T I T R P I I E L S N T A D K I A E G N L E A E V P H Q N R A D E I G I L A K S I E R L R R S L K V A M E
Tar (e. coli) 214: R M L L T P L A K I I A H I R E I A G G N L A N T L T - I D G R S E M G D L A Q S V S H M Q R S L T D T V T
Tsr (e. coli) 216: A S L V A P M N R L I D S I R H I A G G D L V K P I E - V D G S N E M G Q L A E S I R H M Q G E L M R T V G
  
```

Abbildung 5-82 Alignment der HAMP-Domänen aus *M. tuberculosis* Rv3645, *A. fulgidus* Af1503, *E. coli* Aspartat-Rezeptor Tar und Serinrezeptor Tsr; hochkonservierte Bereiche in allen Sequenzen: schwarz; konserviert in zwei bis drei Sequenzen: grau-Abstufungen, Alignment nach Clustal W. *a* und *d*: kennzeichnen hydrophobe AS, in kanonischen coiled-coils herrschen Präferenzen für Leu an Position *a* und Ile an Position *d*.

Zur Übersicht eine Tabelle mit den Ergebnissen von Dr. J. Linder, der den Tar bzw. Tsr-Rezeptor inklusive HAMP-Domänen gegeneinander austauschte und dabei die AC Rv3645 als Reporter beibehielt.

Rezeptor	HAMP-Domäne	AC Aktivität	reguliert
Tsr	Tsr	+++	ja, durch Ser
Tar	Tar	+++	nein (durch Asp)
Tar	Tsr	++	nein
Tsr	Rv3645	+	ja, durch Ser
Tsr	Tar	++	ja, durch Ser
Tsr	Af1503	++	nein
Tsr	Af1503 mut.A291V	+	nein

Tabelle 5-9 Ergebnisse der AC Aktivität [nmol cAMP/(mg · min)] der Rezeptor-Chimären:

(+++) aktiv, (++) mäßig aktiv, (+) geringe Aktivität

Die Tsr-Chimäre mit der HAMP-Domäne aus *A. fulgidus* (Tsr-HAMP_{Af1503}-AC_{Rv3645}) ist genügend aktiv, die A291V-Mutante reduzierte die AC Aktivität (was dem Verhalten des löslichen Proteins entspricht, s. Kap. 5.3.1). Beide Chimären wurden nicht durch Serin reguliert (Tabelle 5-9). Zur Erweiterung dieser Ergebnisse wurde die Mutante der Af1503 HAMP-Domäne in den Tsr-Rezeptor eingebaut, die an den Positionen *a* zu Leu und an Positionen *d* zu Ile mutiert wurde und somit der Anordnung der hydrophoben AS in einer kanonischen coiled-coil entspricht (Abbildung 5-83).

Ergebnisse

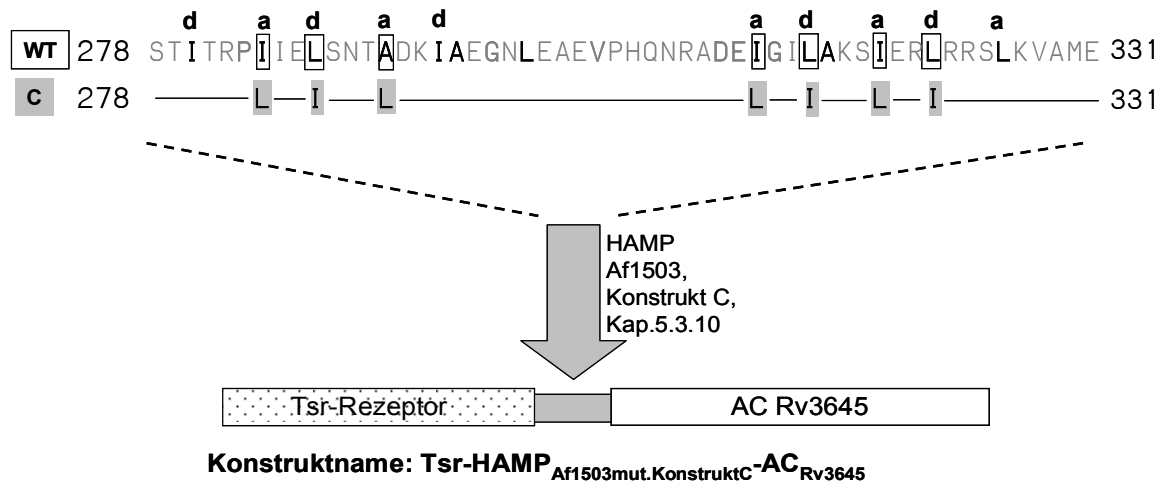


Abbildung 5-83 Einbau der HAMP_{Af1503}-Mutante Konstrukt C in den Tsr-Rezeptor.

Angabe der *a* und *d*-Positionen. Eingerahmte AS im WT: Positionen *a* und *d*, die mutiert werden, grau unterlegt: mutierte AS in Konstrukt C: I284L, L287I, A291L, I312L, L315I, I319L, L322I. *Af1503* Konstrukt C₍₂₇₃₋₃₃₁₎ wird hinter den Tsr-Rezeptor₍₁₋₂₁₅₎ gehängt mit der AC Rv3645₍₃₃₁₋₅₄₉₎ als read-out. Angabe des Konstruktname der Triple-Chimäre. Errechnetes MW: 54,2kDa.

Konstrukt C aus Kapitel 5.3.10 führte im löslichen Protein zu einer Aktivitätssteigerung um den Faktor 1,8. Ob dieses Ergebnis im Membranprotein bestätigt wird und ob eine Signalweiterleitung stattfindet, wird im Folgenden untersucht.

5.7.1. Triple-Chimäre

Die Expression von Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645} erfolgte bei 22°C und bei 30°C für 5 Stunden unter Zugabe von 100µM IPTG (in Anlehnung an die Experimente von PD Dr. J. L.). Die anschließende Membranpräparation erfolgte nach Standardbedingungen und konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

Ergebnisse

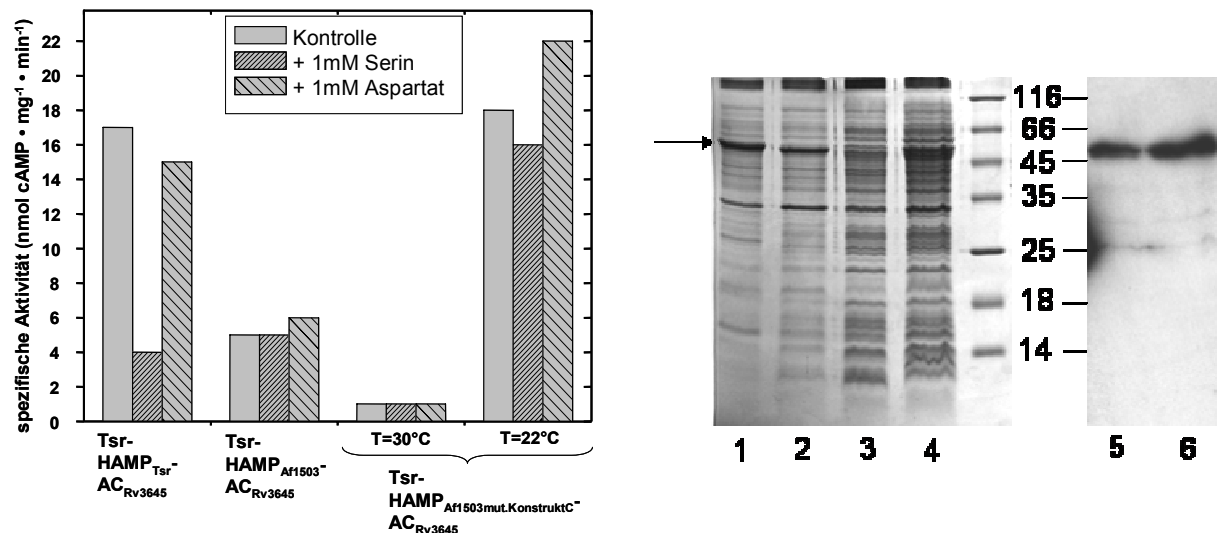


Abbildung 5-84 Aktivitätstest, SDS-Gel und Western-Blot von Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645}.

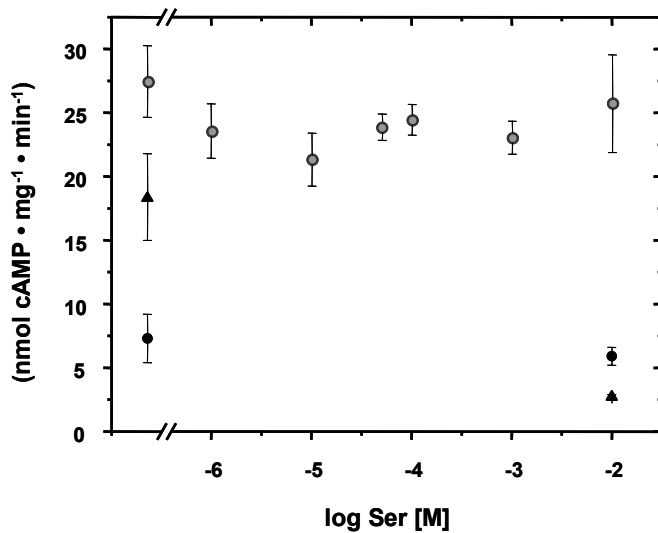
Links: AC Aktivität von Tsr-HAMP_{Tsr}-AC_{Rv3645}, Tsr-HAMP_{Af1503}-AC_{Rv3645} und Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645} (T_{Expression}=22°C und 30°C), alle ± Serin/Aspartat. Testbedingungen: Standard, 200µM ATP, + regenerierendes System, 21-24µg Protein aus M-präp., n=2, SEMs nicht gezeigt.

Rechts: 1-4: SDS-Gel (15%): 1: Tsr-HAMP_{Af1503}-AC_{Rv3645}, 10,2µg Protein. 2: Tsr-HAMP_{Tsr}-AC_{Rv3645}, 8,5µg Protein. 3: Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645}, T_{Expression}=30°C, 15µg. 4: Konstrukt wie 3, T_{Expression}=22°C, 17µg Protein. Pfeil: gewünschte Größe aller Konstrukte bei 54kDa. 5 und 6: Western-Blot, 5: Tsr-HAMP_{Tsr}-AC_{Rv3645}, 10,2µg; 6: Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645}, 17µg Protein.

Die Expression von Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645} bei 30°C war erfolglos. Die Expression bei 22°C war erfolgreich: die AC Aktivität von Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645} ist um den Faktor 3,6 höher als bei Tsr-HAMP_{Af1503}-AC_{Rv3645}. Gegenüber Tsr-HAMP_{Tsr}-AC_{Rv3645} zeigt Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645} keine höhere Aktivität. Sowohl bei Tsr-HAMP_{Af1503}-AC_{Rv3645} als auch bei Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645} findet keine Regulation über Serin statt. Aspartat diente als Kontrolle (Abbildung 5-84, links).

Es wurde eine Serin-Dosis-Wirkungskurve an Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645} erstellt (Abbildung 5-85).

Ergebnisse



- Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645}
- Tsr-HAMP_{Af1503}-AC_{Rv3645}
- ▲ Tsr-HAMP_{Tsr}-AC_{Rv3645}

Abbildung 5-85

Dosis-Wirkungs-kurve für Serin auf Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645}. Testbedingungen: Standard, 200µM ATP, + regenerierendes System, 21-24µg Protein aus M-pröp., n=4. Zur Kontrolle dient Tsr-HAMP_{Tsr}-AC_{Rv3645}.

Die Hemmung von Tsr-HAMP_{Tsr}-AC_{Rv3645} durch Serin beträgt 85% (wie auch bei früheren Versuchen, s. Tabelle 5-9). Tsr-HAMP_{Af1503mut.KonstruktC}-AC_{Rv3645} wird durch Serin nicht beeinflusst.

5.7.2. Tsr: sensitiv für Serin?

An Tsr-HAMP_{Tsr}-AC_{Rv3645} wurden alle 20 AS mit 1mM getestet.

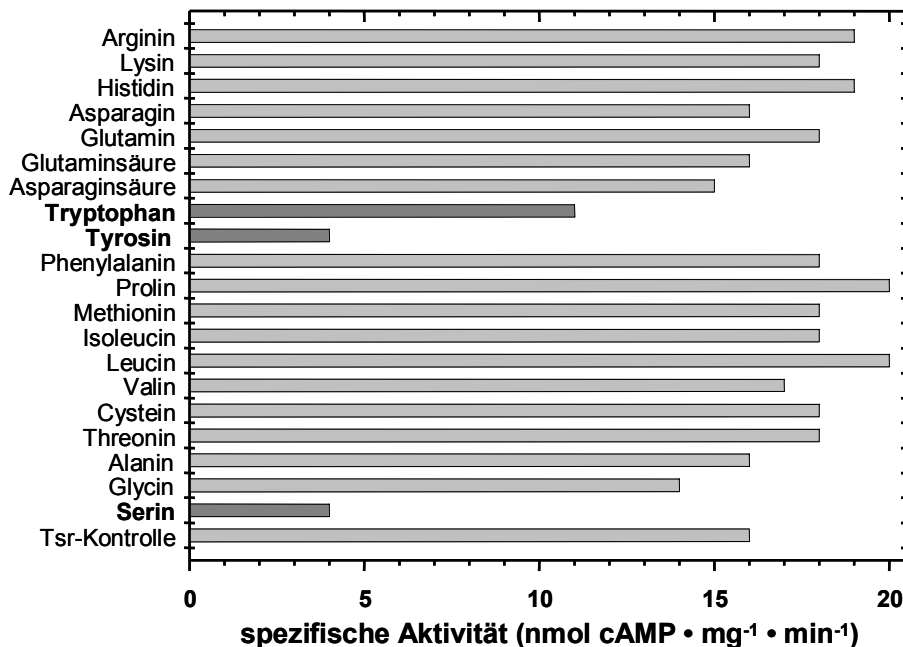


Abbildung 5-86 Spezifische Aktivität (x-Achse) von Tsr-HAMP_{Tsr}-AC_{Rv3645} vor (Tsr-Kontrolle) und nach Zugabe von je 1mM Aminosäurelösung. Testbedingungen: Standard, + regenerierendes System, je 17µg Protein, n=2. Dunkler hervorgehoben: Tyr, Trp, Ser.

Deutlich sichtbar sind die Hemmung durch Serin und Tyrosin (25% Restaktivität), sowie Tryptophan (Hemmung nur 32%). Es wurden Dosis-Wirkungskurven für Tyr und Trp erstellt:

Ergebnisse

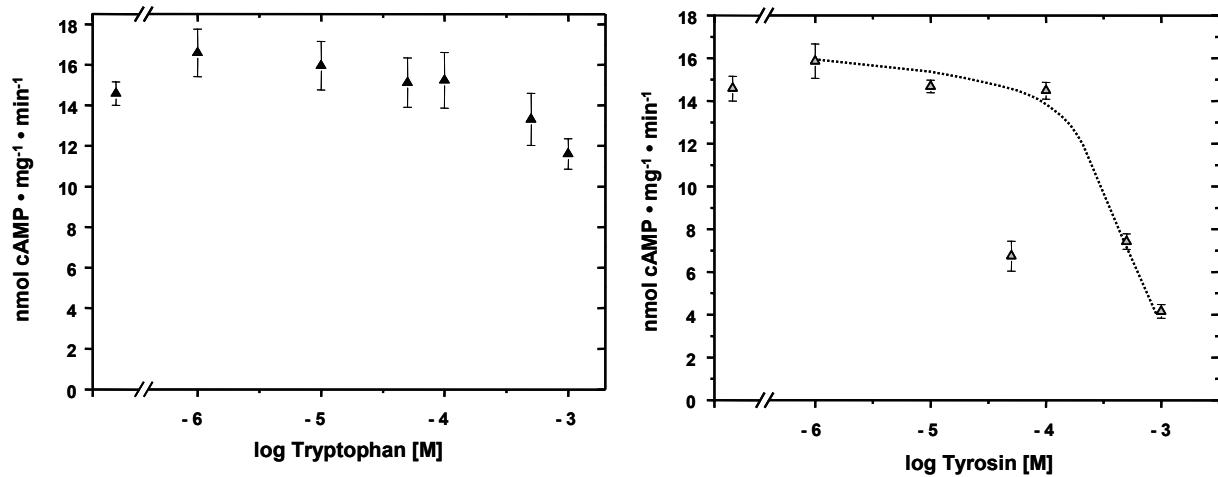


Abbildung 5-87 Dosis-Wirkungskurven für Tyrosin und Tryptophan an Tsr-HAMP_{Tsr}-AC_{Rv3645}. Spezifische Aktivität, Testbedingungen: Standard, 200µM ATP, + regenerierendes System, 17µg Protein aus M-Präp.

Links: Tryptophan (1-1000µM), n=4 und rechts: Tyrosin (1-1000µM), n=4

Tryptophan hat keinen Einfluss auf die Regulation der Signalweiterleitung, es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p > 0,05$). Nach Zugabe von 500µM Tyrosin ist die Hemmung von Tsr-HAMP_{Tsr}-AC_{Rv3645} hoch signifikant ($p < 0,01$). Bemerkung: die Stammlösung (10mM) von Tyrosin wurde in 1M Tris hergestellt und hat pH=10. Der Tris/HCl-Puffer im Test sollte dies noch ausreichend abpuffern, um das pH-Optimum der AC zu gewährleisten.

6. Diskussion

"Es führen viele Wege zum Gipfel des Berges, doch die Aussicht bleibt immer die Gleiche" (Chinesisches Sprichwort). Unter diesem Aspekt sind die Ansätze zu verstehen, mit denen versucht wurde, die Funktion der HAMP – Domäne bei der Signaltransduktion zu verstehen.

6.1. Expression und Reinigung von WT

Es wurde gezeigt, dass unter optimalen Expressionsbedingungen ein sehr aktives Protein erhalten werden konnte. Letzlich sind die Ausgangsbedingungen für alle Proteine HAMP-Rv3645, -Af1503 und die angehängte AC Rv3645 dieselben und man kann sie als Ursache für Aktivitätsunterschiede ausschließen. Für Kristallisationszwecke mussten die Reinigungsbedingungen optimiert werden. Für die Kristallisation von HAMP-AC Rv3645 wurde zunächst keine Gelfiltration durchgeführt, allerdings wurden keine ausreichend brechenden Kristalle erhalten. Bei der Gelfiltration des WT zeigte sich, dass das Protein nicht nur als Dimer vorliegt, sondern sich zu Oligomeren zusammenlagert. Mg^{2+} im Puffer trägt möglicherweise zur Agglomeratbildung bei, indem es an die Oberfläche des AC-Proteins bindet. Dadurch werden die Proteine gewissermassen verbrückt, was durch Zugabe des Komplexbildners für zwei- und mehrwertige Kationen, EDTA, aufgehoben wird. Es ist nicht auszuschließen, dass 'freies' EDTA als Zwitterion auch direkt an das AC-Protein bindet. Dadurch könnte es Epitope abdecken, die ansonsten Interaktionen mit weiteren AC-Molekülen eingehen und Aggregation förderten.

Es ist möglich, dass die amphipatischen HAMP-Domänen van der Waals- oder Salzbrückenbindungen mit weiteren HAMP-Helices eingehen und es so zur Agglomeratbildung kommt (Alberti et al., 1993). Das erklärt, warum NaCl keinen Einfluss auf die Dimerenbildung hatte (Bordignon et al., 2005). DTT kann als Reduktionsmittel vorhandene Disulfidbrücken aufspalten, z.B. verursacht durch das einzige Cystein (Cys513) der AC. Durch die Isolierung des Dimers wurde gezeigt, dass maximale Aktivität im Bereich des Dimers liegt (bis $3,6 \mu\text{mol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; 5.4.3). Dies kann als Indiz für die Funktionstüchtigkeit der HAMP-Domäne in einer tetrahelicalen Anordnung als Dimer bewertet werden (Zhu and Inouye, 2004), da die AC ihrerseits nur als Dimer aktiv ist (Linder, 2006; Zhang et al., 1997). Diese Phänomene wurden nicht nur an der hier untersuchten AC beobachtet, sondern auch an anderen der HAMP-Domäne nachgeschalteten Effektoren, die dimerisieren (Yoshida et al., 2007); oder im Gesamtkomplex mit Rezeptorteil, die als "Trimers of Dimers" aktiv sein sollen (Studdert and Parkinson, 2005).

Diskussion

6.2. Kinetik von WT

WT ist mit $V_{\max} = 1296 \pm \text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 150mal aktiver als die isolierte katalytische Domäne von *Rv3645* ($8,2 \pm 0,6 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Die Wechselzahl von WT beträgt 40/min und ist damit höher als bei HAMP-AC *Rv3645* (18/min); bei AC *Rv3645* liegt die Wechselzahl bei 0,1/min. Der K_m -Wert von WT ($229 \pm 60 \mu\text{M}$) ist um den Faktor 5 niedriger als bei AC *Rv3645* ($1200 \pm 100 \mu\text{M}$). Im Vergleich zu HAMP-AC *Rv3645* ($2700 \pm 100 \mu\text{M}$) ist der K_m -Wert 12fach niedriger, was bedeutet, dass HAMP *Afl503* die katalytischen Domänen von *Rv3645* offenbar so orientiert, dass eine höhere Substrataffinität erzeugt wird. Mit einem Hill-Koeffizienten von $1,1 \pm 0,1$ ist WT genauso wie die isolierte AC *Rv3645* nicht positiv kooperativ, was der Substratsättigungskurve nach Michaelis-Menten entspricht. Die Daten zur isolierten katalytischen Domäne *Rv3645* wurden publiziert von Linder et al. (2004).

6.3. Charakterisierung der Mutanten

Um einen Nachweis für den hypothetischen Rotationsmechanismus der HAMP-Domäne *Afl503* zu finden, wurde die möglicherweise für die Rotation wichtige Position A291 einer Punktmutationsanalyse unterzogen. Je größer der Aminosäurerest an Position 291 wurde, desto weniger aktiv war die Mutante (aus Kapitel 5.3 (1-7), in Tabelle 5-3 zusammengefasst). Die bildliche Darstellung der spezifischen Aktivität der Mutante gegenüber dem Seitenkettenvolumen der jeweiligen AS zeigte eine direkte Korrelation dieses Verhältnisses (Hulko et al., 2006):

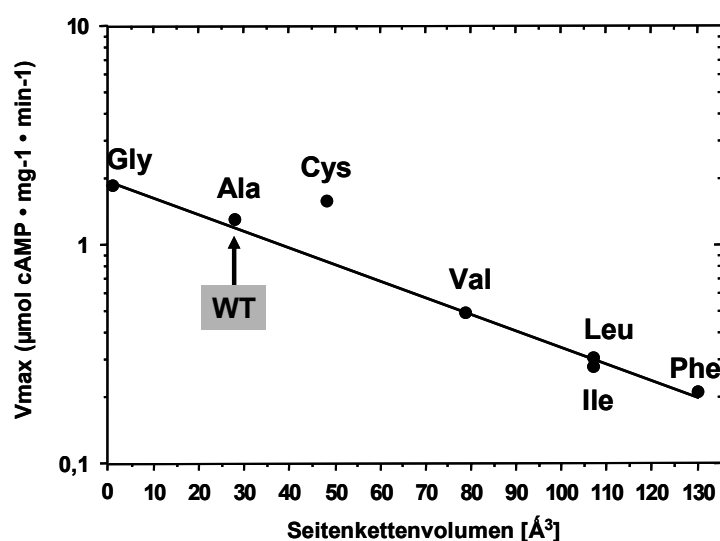


Abbildung 6-1 Korrelation der V_{\max} mit dem Seitenkettenvolumen der AS (Hulko et al., 2006). Die angegebenen AS sind die Mutationen an Position A291 des WT. Die Gerade zeigt die Abnahme der V_{\max} mit zunehmendem Seitenkettenvolumen der AS an Position 291.

Diskussion

Das zunehmende Seitenkettenvolumen an Position 291 der HAMP *Afl503* resultierte in einer Abnahme der AC Aktivität, die Proteine bevorzugten den ausgeschalteten Zustand. Es wurde beschrieben, dass es sich bei der Aktivierung und Inaktivierung von Cyclase-Dimeren generell um einen Drehmechanismus handelt (Sinha et al., 2005; Tews et al., 2005). Die erschwerte Drehung und damit einhergehende Bevorzugung des inaktiven Zustandes führte bei der A291W-Mutante zu einer nicht messbaren AC Aktivität. Bis 2mM ATP trat keine Substratsättigung ein, bis 4mM Substrat wurde die Restaktivität von A291W auf 28% reduziert. Eine zu hohe Substratkonzentration trägt nicht zur Sättigung bei, sondern führt zu einer Aktivitätsabnahme, daher kann man von einer Hemmung der AC Aktivität durch Substratüberschuss sprechen. 2mM ATP ist die optimale Substratkonzentration, die sich aus dem Verhältnis von Substratspezifität und Substratüberschusshemmung ergibt.

Die Ergebnisse der Mutationen an A291 der HAMP *Afl503* wurden durch weiterführende Untersuchungen an der HAMP-Domäne der Histidinkinase EnvZ bestätigt; die Autoren beschreiben, dass Mutationen an exakt dieser Position einen Einfluss auf die Kinase haben (Kishii et al., 2007). Da die kinetischen Eigenschaften der Einzelmutanten im Ergebnisteil dargestellt worden sind (5.3.8), wird auf die Mutanten eingegangen, deren Eigenschaften wenig zur Rotationshypothese beigetragen haben:

Mutante		V_{\max} [nmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹]	K_m/SC_{50} [μM]	Hill-Koeff.
WT		1296 ± 96	229 ± 60	1,1 ± 0,1
A	A291I, I294L	591 ± 57	802 ± 73	1,34 ± 0,1
B	I284L, L287I, I312L, L315I, I319L, L322I	2049 ± 47	157 ± 6	0,8 ± 0,1
C	I284L, L287I, A291L, I312L, L315I, I319L, L322I	2381 ± 63	312 ± 25	0,98 ± 0,1
D	I284N, I312N	148 ± 2	1558 ± 131	1,4 ± 0,1
-	D310E	1284 ± 100	655 ± 41	1,2 ± 0,1
-	E311K	2082 ± 85	284 ± 24	0,78 ± 0

Tabelle 6-1 Ergebnisse der Kapitel 5.3.10 und 5.3.11, n=4

Die K_m -Werte der Mutanten A bis D sind sehr unterschiedlich. Da in dieser Mutationsreihe die bevorzugt hydrophoben Positionen *a* und *d* mutiert wurden, lassen sich die Unterschiede der ATP-Affinitäten im Vergleich zu WT folgendermaßen erklären:

Diskussion

In Mutante A sind alle *a*-Positionen mit Ile und alle *d*-Positionen mit Leu besetzt (entspricht der umgekehrten Verteilung von Ile und Leu, die in kanonischen coiled-coils bevorzugt an Position *d* bzw. *a* sitzen). Dies führt zu einer vierfachen Erniedrigung der Substrataffinität. V_{\max} sinkt auf 50%. Verglichen mit der Einzelmutante A291I ($V_{\max}=281\pm 11 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ und $SC_{50}=409 \pm 27 \mu\text{M}$, Hill-Koeffizient: 1,5, Kap. 5.3.4), sind sich die kinetischen Eigenschaften ähnlich, was auf das Einführen einer voluminöseren Seitenkette an Position 291 zurückzuführen ist. Mutante A ist im Gegensatz zu A291I nicht mehr positiv kooperativ, verursacht durch Leu an Position 294.

In Mutante B sind alle *a* und *d* Positionen mit den bevorzugten AS Leu bzw. Ile besetzt, mit Ausnahme von A291. K_m ist im Vergleich zu WT höher (1,4fach). Die Besetzung der *a* und *d* Positionen von HAMP mit den einer kanonischen coiled-coil entsprechenden AS resultiert in einer verbesserten ATP-Affinität der AC. Die Verdoppelung der V_{\max} im Vergleich zu WT bestätigt eine höhere Umsetzung des Substrats durch die Cyclase (63 Moleküle ATP \cdot min⁻¹). Mutante C besitzt, trotz A291L (einziger Unterschied zu B), ebenfalls sehr hohe katalytische Aktivität (Wechselzahl: 73 \cdot min⁻¹). Die etwas geringere Substrataffinität (als bei B) zeigt, dass zwischen V_{\max} und K_m bzw. SC_{50} kein Zusammenhang besteht. Die Anordnung von Leu und Ile in den von coiled-coil bevorzugten Positionen der HAMP hat keine aktivitätsmindernden Eigenschaften auf die AC. Auch die Affinität für ATP bleibt bei dieser Anordnung weitgehend unbeeinträchtigt. Entgegen der Vorhersagen von A. Lupas verschiebt sich der Zustand durch die Umordnung der AS in den *a* und *d* Positionen in HAMP *Af1503* in Zusammenhang mit der AC nicht gegen inaktiv, sondern scheint den aktiven Zustand zu stabilisieren.

Der Ersatz der hydrophoben Reste durch Säureamide in der Seitenkette führte bei Mutante D zu einem Protein, das im Vergleich zu WT noch 11% AC Aktivität besitzt. Die Affinität der Cyclase zu ATP ist stark erniedrigt (7fach). Durch Einführung von hydrophilen Seitengruppen 'am Eingang' der α -Helices (Ebene 1) und damit Unterbrechung des Heptadenmusters können die resultierenden Aktivitätsverluste und die niedrigere Substrataffinität erklärt werden. Die verminderte ATP-Affinität kann auch ein Anzeichen für eine leicht gestörte Packung der katalytischen Furche sein, zu der beide Monomere in unterschiedlicher Weise beitragen müssen. Bemerkenswert ist die ansatzweise positive Kooperativität dieser Mutante.

D310E: die vergleichbare, positionsäquivalente Mutation, die im Aer-Protein zu einer Inaktivierung führt (Buron-Barral et al., 2006; Watts et al., 2004), hatte bei *Af1503* keine Bedeutung. Lediglich die Substrataffinität wurde etwas erniedrigt. Diese Diskrepanz lässt sich

Diskussion

damit deuten, dass die HAMP-Domäne im Aer-Protein mit einer PAS-Domäne, die für FAD-Bindung zuständig ist, verknüpft ist.

Der Effekt einer Mutation an der hochkonservierten Glutaminsäure E311 entsprach den Erwartungen, da in den HAMP-Domänen der Histidinkinasen NarX (Collins et al., 1992) und EnvZ (Harlocker et al., 1993) derartige Mutationen zu einer Aktivierung geführt haben. E311K führt zu einer Aktivitätszunahme (1,6fach), die Substrataffinität wird nicht verändert.

6.4. Die Bedeutung des Linkers

Die beiden Helices α_1 und α_2 der HAMP *Af1503* werden durch einen 13 AS langen Linker verbunden. Hat dieser Strukturbestandteil Funktionen, die über eine reine Verknüpfung hinausgehen? Die Länge des Linkers darf entsprechend der parallelen Anordnung der Helices nicht kürzer als 12 AS sein, da ansonsten die Distanz zwischen den Helices nicht mehr gespannt werden kann. In Abbildung 6-2 besitzen bis auf *Af1503* (Linker: 13 AS) und *A. platensis CyaG* (Linker: 20 AS) alle HAMP-Domänen einen 12 AS langen Linker. In Abbildung 1-3, S. 3, sieht man in einem repräsentativen Auszug eines Alignments von 250 HAMP-Domänen keinen Linker, der *kürzer* als 12 AS ist.

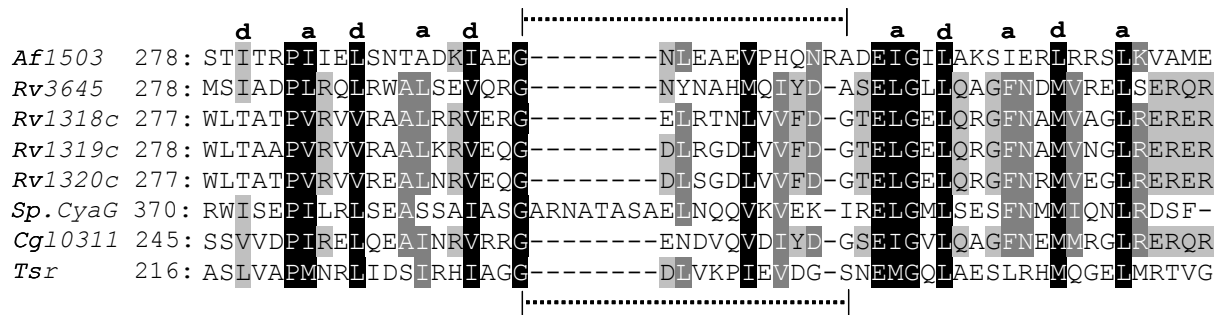


Abbildung 6-2 Clustal W-Alignment der HAMP-Domänen aus *A. fulgidus Af1503*, *M. tuberculosis Rv3645*, *Rv1318c*, *Rv1319c*, *Rv1320c*, *Arthrosira platensis CyaG*, *C. glutamicum Cgl0311* und *E. coli Tsr* (Serin-Rezeptor).

Schwarz: identische und ähnliche AS in allen acht HAMP-Domänen, grau-Abstufungen: identische und ähnliche AS in fünf bis sieben Sequenzen. |-----|: Linker-Bereich, Start für alle Domänen aus diesem Alignment am hochkonservierten G, bei *Af1503*: G297-A309. Linker der anderen Domänen entsprechend angegebener Nummerierung. *d*, *a*: Angabe der Positionen *d* und *a* in coiled-coil-Nomenklatur.

Hier wurde der 13 AS Linker aus *Af1503* gegen den 12 AS Linker aus *Cgl0311* ausgetauscht, um neben einer Funktionsäquivalenz per se auch mit einem Linker zu testen, der die beobachtete minimale Länge mit sich bringt. An der Maximalgeschwindigkeit änderte sich trotz des verkürzten Linkers nichts, jedoch stieg K_m von $229 \pm 60 \mu M$ auf $950 \pm 175 \mu M$. Bis

Diskussion

auf zwei konservierte hydrophobe AS in 'der Mitte' der Linker sind die AS weitgehend verschieden (s. Abbildung 6-2) und scheinen somit auf die HAMP-Helices abgestimmt. Da der Linker straff in die Furche der beiden Helices gepackt ist, kann die Rotation der HAMP durch das Einführen anderer AS im Linker erschwert werden, was in erniedrigter ATP-Affinität der AC resultiert. Das wahrscheinlich für die Flexibilität und damit den Erhalt der AC Aktivität hochkonservierte Glycin (G297 bei *Afl503*) ist unverändert. Bemerkenswert ist die durch den Linker-Austausch erhaltene positive Kooperativität der Chimäre (Hill-Koeffizient: 1,6).

6.5. Modulatoren des WT

6.5.1. Ölsäure

Auf die Frage, ob Fettsäuren an der Regulation der AC beteiligt sind wie bei AC *Rv2212* aus *M. tuberculosis* (Abdel Motaal et al., 2006), fand sich folgende Antwort (s. Abbildung 5-58): Ölsäure hatte keinen Einfluss auf die AC Aktivität. Auch bei dem wenig aktiven Holoenzym zeigte sich kein Effekt. In Gegenwart der HAMP-Domänen (sowohl HAMP *Rv3645* als auch *Afl503*) wurde die AC zu 70% durch 100µM Ölsäure gehemmt. Aufgrund ihrer amphoteren Eigenschaften (Linder et al., 2004) können die α -Helices einerseits Wechselwirkungen untereinander eingehen (Bordignon et al., 2005), andererseits auch in Gegenwart von lipophilen Reagenzien. Es sind zwei Vorstellungen denkbar, wie die HAMP-Domäne durch Ölsäure beeinflusst wird: die hydrophoben Reste wölben sich in Richtung der Fettsäure, sie drehen sich aus ihrer dichten Packung nach außen. Oder die Ölsäure schiebt sich zwischen das tetrahelicale Bündel und beeinträchtigt die interhelicale Anordnung. In der Literatur sind bisher weder dieser noch andere Effekte bekannt, die die HAMP-Domäne in ihrer Funktion als Signalmodul hindern. In Gegenwart der sechs Transmembranspannen (Holoenzym *Rv3645*) hat die Ölsäure keinerlei Auswirkung auf die AC Aktivität, sie verhindern aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften Wechselwirkungen der FS mit der HAMP-Domäne.

6.5.2. Inhibitoren der Adenylatcyclase *Rv3645*

Für die Cyclasen sind eine Reihe von Inhibitoren gründlich untersucht worden, beispielsweise für Säuger ACn (Dessauer and Gilman, 1997). Dessauer et al. beschreiben Adenosin-Analoga, die u. a. für die Auswahl der hier getesteten Inhibitoren herangezogen wurden (Dessauer et al., 1999). Von Mou et al. wurde ein hemmender Effekt der MANT-Nukleotide beschrieben

Diskussion

(Mou et al., 2006), von denen das hier applizierte 2'-3'-MANT-ATP bei 200 μ M die AC zu 93% hemmt (Abbildung 5-56). Besser als 1mM der Substratanaloga ITP, CTP und GTP hemmen Polyphosphate, die bei 10 μ M eine 100%ige Hemmung erzielen. P16 und P30 sind chemisch nicht ganz eindeutig definiert.

Bei der enzymatischen Umsetzung von ATP entsteht cAMP und Pyrophosphat. Es ist allgemein bekannt, dass cAMP die Klasse III ACn nicht hemmt, da es nicht bindet und schnell abdiffundiert (Linder, 2006). PP_i, das eine höhere Affinität hat und langsam abgeht, wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zum Test gegeben, hemmt allerdings erst ab physiologisch irrelevanten Konzentrationen > 300 μ M (s. 5.4.4.1). Pyrophosphat spielt eine Rolle in Kombination mit P-site Inhibitoren der Säuger ACn, diese Inhibitoren binden nur in Gegenwart von PP_i an die AC (Dessauer and Gilman, 1997; Dessauer et al., 1999).

Bei den bisherigen Kristallisationsansätzen mit Inhibitor gibt es keine nennenswerten Erfolge. Es besteht aber die Möglichkeit, zu den Kristallen, die bisher immer reproduzierbar waren und auf ausreichende Größe herangezüchtet werden konnten, einen Inhibitor im Nachhinein zuzusetzen. Man spricht vom 'soaking' von Inhibitoren.

Vor zwei Jahren wurde die Struktur der AC *CyaC* aus *Arthrospira platensis* aufgeklärt (Steegborn et al., 2005a). Der Komplex besteht aus dem in der katalytischen Furche gebundenen ATP und einem Inhibitor, der zu ATP nicht kompetitiv ist; ein Katechol-Estrogen, das in der Nähe des katalytischen Zentrums einen Chelatkomplex mit dem für die Katalyse benötigten Magnesiumion einzugehen scheint. Da diese AC ebenfalls der Klasse IIIb angehört, könnte nicht nur die Information des neuartigen Inhibitors von Bedeutung für die Untersuchung von AC *Rv3645* sein, sondern auch die Struktur selbst, die zum molecular replacement herangezogen werden kann, um die Kristallstruktur von WT zu lösen.

6.6. Rotation?

Letztendlich kann nur die Struktur der AC *Rv3645* zusammen mit der HAMP *Af1503* genaueres zur Aufklärung des Mechanismus beitragen, dessen sich das HAMP-Modul zur Signalweiterleitung bedient. Natürlich wäre von Vorteil, eine Struktur im angeschalteten und ausgeschalteten Zustand zu erhalten, um die Bewegung der HAMP bei der Signaltransduktion sichtbar zu machen. Bisher wurden drei Modelle für die intramolekulare Signaltransduktion diskutiert, 1) das "piston"-Modell, 2) das Hebelmodell und 3) eine Rotationsbewegung (Abbildung 6-3).

Diskussion

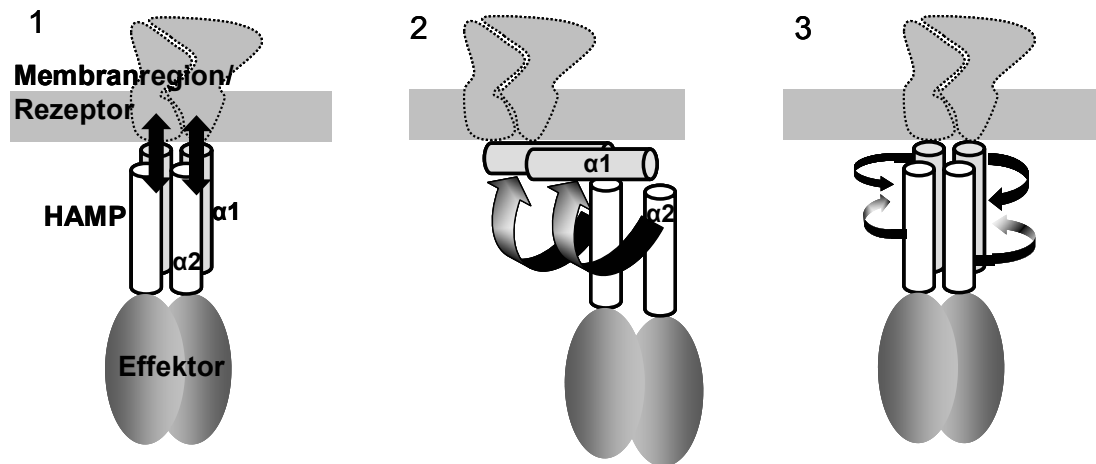


Abbildung 6-3 Drei Modelle zur intramolekularen Signaltransduktion der HAMP-Domäne.

Modell als Dimer dargestellt, bestehend aus Membranregion/Rezeptordomäne (hellgrau), HAMP-Helices (schattiert α -Helix 1 und weiss α -Helix 2) und Effektor-Domäne (dunkelgrau schattiert). Schwarze Pfeile: postulierte Bewegung der HAMP-Helices, Erläuterung 1-3 folgt im Text.

(1) diskutiert wird über einen stanzartigen Mechanismus, bei dem HAMP als Verlängerung der TM-Region angesehen wird und sich um ein kleines Stück wie ein Zylinder in die Zelle hineinschieben und so eine Konformationsänderung der darunter liegenden Elemente verursachen soll (Miller and Falke, 2004; Ottemann et al., 1999).

(2) zeigt die Vorstellung von einem Ausscheren der HAMP-Helix im Sinne einer Türklinke. Die klappende Klinke wäre α -Helix 2, die in Richtung α -Helix 1, welche an der Membran peripher assoziiert ist, ausschert (Seligman and Manoil, 1994; Williams and Stewart, 1999).

(3) Hier wird ein Rotationsmechanismus vorgestellt und wahrscheinlich gemacht: eine Drehung der Helices, genauer, eine konzertierte Rotation der vier HAMP-Helices um 26° (Hulko et al., 2006). Dieser Rotationsmechanismus wird durch folgende Publikationen gestützt: Bordignon et al. zeigten 2005, dass die HAMP-Domäne des lichtempfindlichen Rezeptors NpSRII aus *Natronomonas pharaonis* in einem Gleichgewicht zwischen zwei Konformations-Zuständen existiert (Bordignon et al., 2005); darauf basierend zeigten Engelhard et al. (2006), dass der Rezeptor NpSRII Signale weitergibt, indem sich seine zweite Membranhelix um 15° im Uhrzeigersinn dreht. Dabei verschiebt sich die Helix in der Membran um $0,9\text{\AA}$ zur Seite (Moukhametzianov et al., 2006).

Eine Rotation der HAMP-Domäne ermöglicht cis- und trans-Signale. Dabei übersetzt HAMP als zwischengeschaltetes Modul ein Signal aus dem extrazellulären Bereich und leitet es an einen darunter liegenden Effektor weiter (cis-Signal). Fehlen weitere cytoplasmatische Elemente (wie in *Afl503*), wird das Signal durch die Rotation an andere Domänen weitergegeben (trans-Signal), die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Es ist vorstellbar,

Diskussion

dass sich die HAMP-Domäne wie die innere Unruhe einer Uhr hin und herdreht, um einen reibungslosen Ablauf der Signalweiterleitung zu gewährleisten.

6.7. *Cgl0311 Adenylatcyclase*

6.7.1. HAMP-Domäne und Adenylatcyclase *Cgl0311*

Die Arbeitsgruppe von A. Lupas versucht derzeit, mehr als 7500 HAMP-Domänen aufgrund ihres Vorkommens in Histidinkinasen, ACn, mcps und Phosphatasen in Cluster einzuteilen. Beim Vergleich von AS der HAMP-Domänen mit C-terminaler AC *M. tuberculosis Rv3645* und *C. glutamicum Cgl0311* mit HAMP *Af1503* fällt folgendes auf (Abbildung 6-2):

In coiled-coil-Strukturen werden die *a* und *d*-Positionen bevorzugt mit Leu und Ile besetzt; in *C. glutamicum* sind die *d*-Positionen der α -Helix 1 bevorzugt mit Val besetzt, dies trifft auch auf drei der vier HAMP-Domänen aus *M. tuberculosis* zu. Die *a*-Positionen der N-terminalen Helix sind bei *C. glutamicum* mit Ile besetzt, darunter die für die AC Aktivität essentielle Position A291 der HAMP *Af1503*, entsprechend I261. Auffällig ist in α -Helix 2 die Besetzung von *a* und *d* durch Phe bzw. Met, nicht nur in *C. glutamicum*, sondern auch bei den vier HAMP-Domänen aus *M. tuberculosis* sowie bei *A. platensis*. Ein Phe an *a*-Position 291 der HAMP *Af1503* stellte für die postulierte Drehung der HAMP-Helices ein Hindernis dar (vgl. 5.3.6). Möglicherweise ist Phe an *a*-Position der hier diskutierten HAMP-Domänen ein Grund für die geringeren AC Aktivitäten (Tabelle 6-2).

Nach Austausch gegen *Af1503* HAMP wurde V_{\max} von AC *Rv3645* verdoppelt (vgl. mit HAMP-AC *Rv3645*) und V_{\max} von AC *Cgl0311* verdreifacht (vgl. mit HAMP-AC *Cgl0311*; Tabelle 6-2, grau unterlegt). In beiden Fällen bewirkt die ausgetauschte HAMP *Af1503* eine Erhöhung der Affinität für ATP im Vergleich zum jeweiligen Konstrukt mit endogener HAMP-Domäne.

Betrachtet man die AC Aktivitäten ohne HAMP-Domänen (Tabelle 6-2), so hat HAMP *Cgl0311* einen hemmenden Einfluss auf die AC Aktivität von *Cgl0311*, vergleichbar dem Effekt der HAMP aus *Rv1319c* (Linder et al., 2004). Allerdings wird durch die HAMP *Cgl0311* die Substrataffinität der AC verbessert, im Gegenteil zu HAMP-AC *Rv1319c* und zu HAMP-AC *Rv3645*. Auch verhält sich die AC *Cgl0311* erst durch die endogene HAMP-Domäne deutlich positiv kooperativ. Hier scheint die HAMP-Domäne eine aktivierende Wechselwirkung der katalytischen Zentren zu vermitteln.

Diskussion

Enzym	V_{\max} [nmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹]	K_m/SC_{50} [μM]	Hill-Koeffizient
WT	1296 ± 96	229 ± 60	1,2 ± 0,1
HAMP-AC Rv3645	590 ± 10	2700 ± 100	1,4 ± 0,01
AC Rv3645	8,2 ± 0,6	1200 ± 100	1,0 ± 0,03
HAMP-AC Rv1319c	3,6 ± 0,1	150 ± 3	1,2 ± 0,1
AC Rv1319c	6,6 ± 0,1	57 ± 1	1,0 ± 0,04
HAMP-AC Cgl0311	22 ± 6	515 ± 51	1,8 ± 0,0
AC Cgl0311	32 ± 7	1109 ± 75	1,2 ± 0,0
HAMP _{Af1503} -AC _{Cgl0311}	75 ± 5	143 ± 17	0,9 ± 0,1

Tabelle 6-2 Vergleich der kinetischen Parameter von ACn, HAMP-ACn und HAMP-Chimären aus *M. tuberculosis Rv3645*, *Rv1319c* und *C. glutamicum Cgl0311*. Die Daten zu *Rv1319c* und *Rv3645* sind aus der Literatur entnommen, *Rv1318c* und *Rv1320c* nach dortiger Aussage zu wenig aktiv (Linder et al., 2004). Konstrukte mit HAMP-Domäne sind grau unterlegt.

Die charakteristischen Parameter für AC Cgl0311 konnten bestimmt werden: die Proteinabhängigkeit der AC Cgl0311 war linear, das pH-Optimum liegt bei pH 8,0, Temperaturoptimum bei 37°C.

6.7.2. Holoenzym

Das Holoenzym Cgl0311 ist mit 68 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ im Gegensatz zum Holoenzym Rv3645 um Faktor 10 weniger aktiv und liegt im AC Aktivitätsbereich des Holoenzym von Rv1319c (39 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, Hammer, 2004). Die AC Aktivität des in-vivo aufgezüchteten Bakteriums (70 – 100 pmol · mg⁻¹ · min⁻¹) war im Einklang mit der AC Aktivität des rekombinanten Proteins. Mit der Frage nach der Funktion der Membranregion im Corynebacterium haben sich V. Anantharaman und L. Aravind beschäftigt, die mittels Profilanalysen verschiedener TM-Sequenzen und "comparative genomics" *TM-Rezeptoren* einteilten (Anantharaman and Aravind, 2003): zwei große 7TM-Rezeptorfamilien; eine mit extrazellulären N-terminalen globulären Domänen ausgestattet, die Liganden wie beispielsweise Kohlenhydrate binden. Die andere Familie ist mit einer α-helicale extrazellulären Domäne ausgestattet und soll Signale über eine intrazelluläre Hydrolase-Domäne weiterleiten. Multi-TM-Domänen, die keine extrazelluläre 'Bindungsstelle' besitzen und an unterschiedliche C-terminale Signaldomänen geknüpft sind:

davon entweder 5TM-Spannen, dieser Rezeptor konnte in *Bacillus subtilis* identifiziert werden und soll einen Sensor für Mureinderivate darstellen.

Oder durchschnittlich 8TM-Spannen, die nach der zuckerabhängigen His-Kinase aus *E. coli* definiert wurden. Unter anderem ordnen die Autoren dieser Gruppe auch die TM-Region aus

Diskussion

bei *Cgl0311* nicht eindeutig, die Autoren sprechen von einer Länge von 290 – 300 AS bei der 8TM-Region (s. dazu im Anhang die Vorhersage der TM von *Cgl0311* nach (Krogh et al., 2001)). In der TM5 und 6 sollen sich gehäuft AS mit kleinen oder gar keinen Seitenkettenresten befinden, bei *Cgl0311* Gly und Ala (Abbildung 6-4). Die Autoren beschreiben einen intrazellulären Abschnitt mit hauptsächlich geladenen AS in der Nähe der letzten Helix (Abbildung 6-4). Hier könnte es zu Wechselwirkungen mit der HAMP-Domäne kommen. Der hohe Anteil an Gly und Pro führt nach Ansicht der Autoren zu Konformationsänderungen, die sich auf die Signalweiterleitung auswirken können. Das in Abbildung 6-4 dargestellte Alignment soll darauf aufmerksam machen, dass sich diese Strukturmerkmale auch auf *M. tuberculosis Rv3645* übertragen lassen.

Die Frage nach der Funktion der 6TM aus *M. tuberculosis* konnte mit dem Ziel, die Membranregion aus *Cgl0311* zu charakterisieren, erwartungsgemäß nicht beantwortet werden. Es würde sich ein knock-out in-vivo anbieten (Mampel et al., 2005), um einen Stimulus für die AC *Cgl0311* zu finden. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten könnte man daraus Rückschlüsse für die membrangebundenen ACn aus *M. tuberculosis* ziehen.

Für die Aufreinigung des rekombinanten Membranproteins *Cgl0311* Holoenzym über eine Nickelsäule wurden Detergenzien getestet (5.5.3), davon eigneten sich DDM und Nonidet. Sie hatten keine Auswirkungen auf die AC Aktivität, da sie mit dem BIORAD-Reagenz reagieren, müsste hier ein MicroBC-Assay (mit Bicinchoninsäure) durchgeführt werden. CHAPS würde sich für die Proteinbestimmung besser eignen, führte aber zu verringerter AC Aktivität.

6.8. Tsr – Rezeptor

Die einzige Möglichkeit, die Funktion der HAMP-Domäne in einem größeren Kontext zu betrachten, bieten die Rezeptorproteine, bei denen die Bindungsstelle für den Liganden bekannt ist und der Signalweg reguliert werden kann. Des Weiteren sind ihre Effektoren bekannt, im Falle von Tsr handelt es sich um Histidinkinasen. Ebenso bekannt sind die Funktion und der Mechanismus von ACn. Auf der Grundlage publizierter Untersuchungen (Baumgartner et al., 1994; Jin and Inouye, 1993; Utsumi and Inoue, 1991) wurden die bekannten Elemente verschaltet, um die Funktionsweise der Signaldomäne, deren Aufklärung in einem größeren Zusammenhang bis heute nicht gelungen ist, hinsichtlich der Rotation zu untersuchen. Die Chimären aus Tsr-Rezeptor/Membranregion *Rv3645*, HAMP *Af1503* (WT und mutiert) und AC *Rv3645* (5.5.4 und 5.7.1) führten zu folgendem Ergebnis:

Diskussion

Membran/Rezeptor	HAMP-Domäne	spezifische Aktivität der AC <i>Rv3645</i>	Regulation
<i>Rv3645</i>	<i>Rv3645</i>	0,639 nmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹	
<i>Rv3645</i>	<i>Af1503</i>	5,6 nmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹	
Tsr	Tsr	17 nmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹	ja (Ser)
Tsr	<i>Af1503</i>	3 nmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹	nein (Ser)
Tsr	<i>Af1503</i> _{mut.KonstruktC}	17 nmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹	nein (Ser)

Tabelle 6-3 Ergebnisse der Chimären und der Triple-Chimären aus 5.5.4 und 5.7.1

Durch die HAMP-Domäne aus *Af1503* wurde die AC Aktivität bei *Rv3645* Holoenzym erhöht (Tabelle 6-3). Beim Tsr-Rezeptor wurde sie erniedrigt, die Signalweiterleitung war unterbrochen. Mit HAMP_{*Af1503*mut.KonstruktC} wurde die AC Aktivität wiederhergestellt, allerdings war auch hier keine Serin-Regulation möglich. Möglicherweise hat die Signalweiterleitung (Ser) nicht nur mit der Anordnung der hydrophoben AS zu tun, sondern auch mit der energetischen Situation der HAMP-Domänen (Abbildung 6-5):

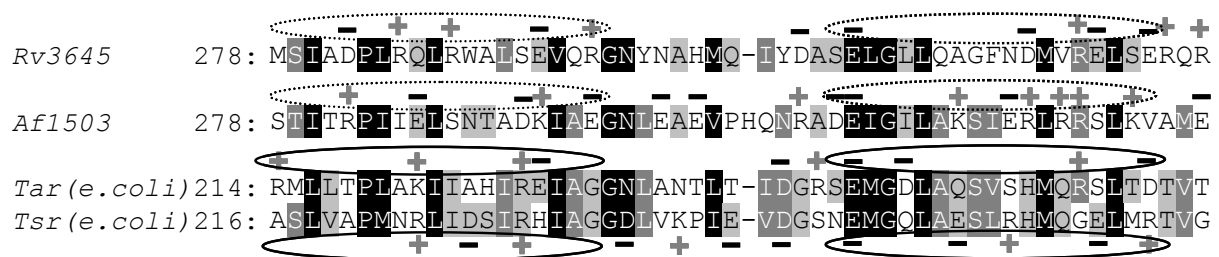


Abbildung 6-5 Alignment der HAMP-Domänen aus *M. tuberculosis Rv3645*, *Af1503*, *E. coli Tar* und *Tsr*, nach Clustal W. Schwarz: identische und ähnliche AS in allen HAMP-Sequenzen. Grau: identische/ähnliche AS in zwei bis drei Sequenzen. Negative und positive Ladungen der AS sind mit dem jeweiligen Symbol gekennzeichnet. Einkreist (gestrichelt und durchgezogen) sind die Ladungen innerhalb der Helices ($\alpha 1$ und $\alpha 2$).

Die Ladungsverhältnisse der einzelnen HAMP-Domänen sind verschieden. *Af1503* hat in $\alpha 2$ sehr viele positiv geladene AS, die α -Helices 1 und 2 von Tsr und Tar dagegen besitzen beinahe ein ausgeglichenes (+/-) Ladungsverhältnis (Abbildung 6-5). Es ist möglich, dass die Signalweiterleitung durch das Rotationsprinzip nur in dieser Zusammensetzung durchführbar ist; durch das Einführen fremder AS wird der Signalweg trotz Erhalt der AC Aktivität unterbrochen. Die Ladungsverteilung sowohl im Tsr- als auch im Tar-Rezeptor könnte der Grund für ein individuelles Verhalten der HAMP-Domänen sein, denn die Feinmotorik der HAMP-Domäne muß mit dem TM-Bereich des Rezeptors übereinstimmen (Rebbapragada et al., 1997).

Ob der Tsr-Rezeptor nur via Serin reguliert ist, ließ sich bei der Testung aller 20 AS in einer Konzentration von 1mM am Rezeptor herausfinden. Es resultierte eine Regulation durch Tyrosin (5.7.2). Ähnliche Versuche wurden von V. Sourjik unternommen, um den Tar-Rezeptor auf seine Sensitivität für Aspartat zu überprüfen (Michalodimitrakis et al., 2005), es

Diskussion

wird darauf hingewiesen, dass durch die Testung an einer Chimäre diese Sensibilisierung beeinträchtigt werden kann.

6.9. Offene Fragen und Ausblick

Das Kristallkonstrukt WT, derzeit bei einer Auflösung von 3Å, sollte einen Einblick in die Rotation der HAMP im Zusammenspiel mit der AC ermöglichen. Die Strukturaufklärung ist von größter Wichtigkeit, denn sie könnte den endgültigen Beweis einer Drehung liefern. Es würde sich auch ein Kristallisationsansatz anbieten, der mit einem potentiellen Inhibitor versehen ist, um die AC oder auch HAMP im inaktiven Zustand zu fixieren und so eine Bewegung nachzuvollziehen. Da bereits bis zu 200µm große Kristalle des WT-Konstruktes im aktiven Zustand vorliegen, wäre es auch möglich, einen Inhibitor direkt zuzugeben ('soaking').

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Frage nach der Funktion der Transmembranspannen in *C. glutamicum* nicht geklärt werden. Da sowohl das Holoenzym als auch das lösliche Protein aktiv waren und sich das Corynebakterium problemlos in vivo anzüchten lässt, kann man im Genom von *C. glutamicum* *Cgl0311* Knock-outs herstellen, um dann in vivo die mögliche Rezeptorfunktion der sechs Transmembranspannen zu untersuchen. Dies ließe sich z.B. mit swarm plate assays oder durch Aufzucht in Nährmedium durchführen, wobei die Platte/das Medium den jeweiligen Signalstoff enthält.

Die HAMP-Domäne des Tsr-Rezeptors bedarf zusätzlicher Untersuchungen hinsichtlich der Signalweiterleitung. Um zu klären, ob die Ladungsniveaus der einzelnen HAMP-Domänen tatsächlich individuell und für die Signaltransduktion im jeweiligen Kontext essentiell sind, sollten die Ladungsniveaus verschiedener HAMP-Domänen aneinander angeglichen werden (wird von nachfolgenden Doktoranden bearbeitet). Oder es sollten möglichst viele HAMP-Domänen auf ihre Funktionstüchtigkeit bezüglich des Tsr-Rezeptors überprüft werden, um einen mainstream innerhalb dieses Moduls erkennen zu können (derzeit an HAMP aus *Arthrospira platensis* *CyaG* untersucht). Zudem müsste man versuchen zu beweisen, dass es sich bei cis- und trans-signaling der HAMP-Domäne um einen gemeinsamen Mechanismus handelt.

Des Weiteren wird von unseren Kooperationspartnern der Versuch unternommen, die HAMP-Domänen mit Hilfe computergestützter Programme zu klassifizieren, um so einen generellen Mechanismus für alle oder für Gruppen von HAMP-Domänen festlegen zu können.

7. Zusammenfassung

Die HAMP-Domäne aus *M. tuberculosis* Rv3645 konnte im löslichen Protein gegen HAMP *Afl503* ausgetauscht werden, deren Struktur (durch NMR) bekannt geworden war. Daher wurden Kristallisationsversuche von HAMP-AC Rv3645 unterlassen. Der Austausch von HAMP ergab eine enzymatisch aktive Chimäre (WT); dadurch konnte der HAMP-Domäne aus *A. fulgidus*, die keinen C-terminalen Effektor hat, eine Funktion nachgewiesen werden. Der Zustand von HAMP *Afl503* wurde als angeschaltet angenommen. Durch die kinetische Charakterisierung der Chimäre konnte dies bestätigt werden. Dadurch konnte die Annahme, HAMP *Afl503* unterliege während der Signalweiterleitung einem Rotationsmoment, wobei sich die vier Helices jeweils um 26° aufeinander zudrehen, näher untersucht werden. Das gelang durch Mutationen an Position A291 der HAMP *Afl503*: AC Rv3645 konnte die durch die Mutationen veränderten Zustandswahrscheinlichkeiten der HAMP-Domäne wiedergeben. Durch direkte Korrelation der V_{\max} (AC) mit dem Seitenkettenvolumen der AS (HAMP) konnte das Drehmoment bestätigt werden. Auch die ATP-Affinitäten der Mutanten ließen einen Drehmechanismus vermuten. Weitere Mutationen belegten zudem, dass V_{\max} und K_m unabhängig voneinander beeinflusst werden. Die in dieser Arbeit hervorgehobene Tatsache, dass sowohl HAMP als auch ACn als Dimere arbeiten, war ein weiterer Beweis für eine konzertierte Rotation der Helices und lieferte gleichzeitig ein 'Ausschlusskriterium' für andere publizierte Mechanismen. Möglicherweise kann der hier postulierte Mechanismus universell angewendet werden; auch Signalweiterleitungsmodule wie z.B. GAF-Domänen erfordern die Ausbildung von Dimeren (Martinez et al., 2005; Martinez et al., 2002). Durch Optimierung der Reinigungsbedingungen konnte das lösliche Konstrukt WT als Dimer kristallisiert werden, dabei wurde die Kristallgröße durch unterschiedliche Pufferzusätze verbessert. Die Auflösung liegt bei 3Å; molecular replacement mit *A. platensis* CyaC AC war möglich.

Die AC aus *C. glutamicum* Cgl0311 erwies sich als aktiv. Dabei stimmten die Ergebnisse des rekombinanten AC Holoenzym mit den in-vivo Daten überein. Die Suche nach einem Stimulus für die TM-Region sowie die Aufreinigung des Holoenzym wurden zugunsten eines geplanten Knock-outs in vivo unterlassen. Die biochemischen Parameter von AC sowie HAMP-AC konnten bestimmt, die Einordnung in Klasse IIIb der ACn bestätigt werden.

Eine 'Individualität' der HAMP-Domäne in Bezug auf ihre Rezeptordomäne konnte mit dem Serinrezeptor gefunden werden. Offenbar funktioniert eine Signalweiterleitung des Tsr-Rezeptors nur mit dessen eigener HAMP-Domäne, durch Austausch gegen HAMP *Afl503* bzw. Rv3645 wurde die Transmitterfunktion unterbrochen. Ob dabei die HAMP an sich oder nur ihr Ladungsniveau eine Rolle spielt, bedarf weiterer Untersuchungen.

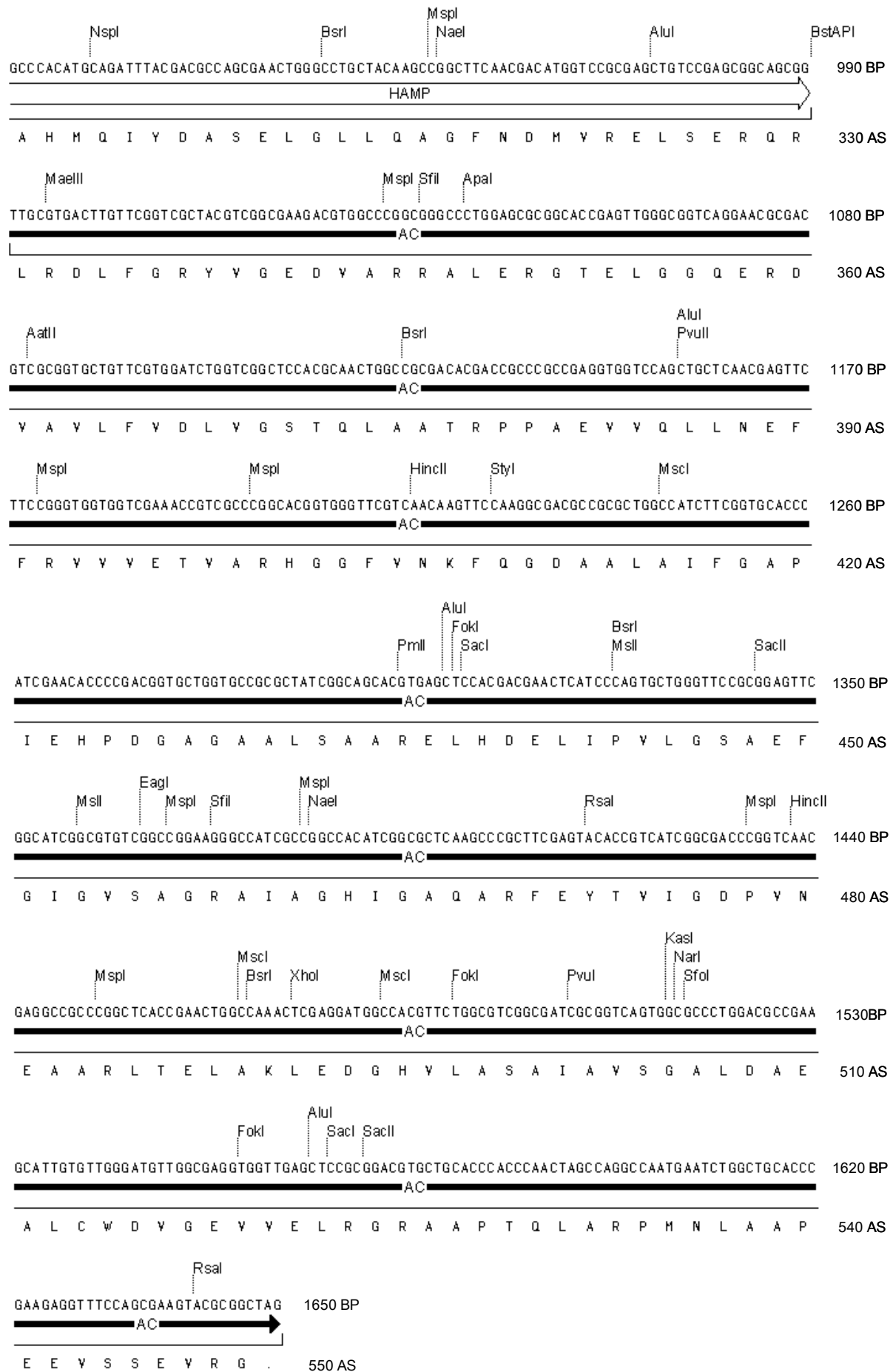
8. Anhang

8.1. Rv3645, DNA- und Proteinsequenz: TM, HAMP, AC

UniProtKB/TrEMBL accession number O06362, gene name: MT3748, Rv3645

FokI	MspI		BamHI
ATGGATGCCGAGGCGTTTCGTCGGTTCCGGCAAGTCCCCGCCGCCGATACGGTGGGCTAATGGCAACCACGGCGCGCTACCCAGACGG			
M D A E A F Y G F R Q Y P A A R Y G G L M A T T A A L P R R			
90 BP			
30 AS			
BfrBI	MspI	DraIII	NspI
BsmI			SphI
			PstI
ATCCATGCATTCGTCGGTGGGTAGTGCACACTCCGTGGCCGCTGTTCTCGTGGAGCATGCTGCAGTCCGACATCATCGGCGCATTGTTC			
I H A F Y R W Y Y R T P W P L F S L S M L Q S D I I G A L F			
180 BP			
60 AS			
		AwaNI	AgeI
		PstI	BstAPI
		MspI	HincII
GTGCTCGGATTCCTGCGCTACGGCTGCCGCCTCAGGACAATATCCAACATGTCAGGATCTGCCACCGGTCAACCTACTGATCTTCGTCAGC			
Y L G F L R Y G L P P Q D N I Q L Q D L P P V N L L I F Y S			
270 BP			
90 AS			
	MspI	AluI	MspI
ACGGTAATCATCTTGTTCCTCGCCGGGCGTGGTGAACCTGAAGCTGCTGATGCCGGTCTTTTCGATGGCAGCGCCGCGACAACCTGCTC			
T Y I I L F L A G A Y Y N L K L L M P Y F R W Q R R D N L L			
360 BP			
120 AS			
BspMI	MspI		NspI
	EagI	AluI	SphI
			RsaI
ACCGAGCCTGATCCGGCCGCCACCAGGCTGGCCCGCAGCCGCGCATTGCGCATGCCGTTGTACCGCACTCTGATCAGCCTGGCGGTCTGG			
T E P D P A A T E L A R S R A L R M P L Y R T L I S L A Y W			
450 BP			
150 AS			
MspI		AluI	NspI
FokI		PvuII	SphI
		XcmI	
		MscI	
			MscI
GCTACCGGCGGCGGGGTTCATCCTCGCCAGCTGGTCGGTGGCCAAAGCATGCGGCCCGCGTGGCGGTGGCCACCGCGCTGGGTGCC			
A T G G G Y F I L A S W S Y A K H A A P Y Y A Y A T A L G A			
540 BP			
180 AS			
		PstI	EagI
	BspMI	MaeIII	MspI
			MspI
ACCGCCACCGCCATCATCGGCTACCTGCAGTCTGAACGGGTGTTACGGCCGGTGGCGCTGCGGCGCTGCAGCAGCGGTGTGCCGAAAAC			
T A T A I I G Y L Q S E R Y L R P V A Y A A L R S G Y P E N			
630 BP			
210 AS			
HincII	MspI		MspI
		RsaI	PvuI
GTC AACGCACCCGGCGTCATACTGCGACTGATGCTGGCGTGGATCCCGTCCACCGGCGTACCCTCTGGCGATCGTGTGGCCGTAGCG			
Y N A P G Y I L R L M L A W I P S T G Y P L L A I Y L A Y A			
720 BP			
240 AS			
		FokI	MspI
		XcmI	BsrI
			BamHI
GCGGACAAGATTGCTTGGCTGCACGCCACACCAGAGGCGCTGTTCAATCCATCCTGATGATGGCACTGGCCGCGCTGGGCATCGGATCC			
A D K I A L L H A T P E A L F N P I L M M A L A A L G I G S			
810 BP			
270 AS			
	MscI	PvuI	MaeIII
		BsrI	BspI
GTCAGCACCTGTGGTGGCCATGTCGATCGCCGACCCGTTACGCCAGTGGCGTGGGCGCTAAGCGAGGTGCAGCGCGCAACTACAAC			
Y S T L L Y A M S I A D P L R Q L R W A L S E Y Q R G N Y N			
900 BP			
300 AS			

Anhang



Anhang

8.2. Af1503, DNA-und Proteinsequenz

Archaeoglobus fulgidus DSM 4304 complete genome, gi|662624|, gb|AE000782.1;

UniProtKB/TrEMBL accession number O28769, gene name: AF_1503

HincII Bpu10I FokI AluI

ATGAAGTTGACGCCCAAATTGTTTTGATAGTGGTTGTGCAAGCCTTGTGCCCTGAGCGTTCCTGGTTATCTTACCATAGCTGGGATG 90 BP
M K L T P Q I Y L I V Y Y A S L V P L S V L G Y L T I A G M 30 AS

FokI MaeIII EcoRII EcoNI StyI MspI AluI

ACATCCTCTGCTGAAGAGGCCAAAGCAGGGCGTTACAACAGTCAGCCAGGAATACCTGACCAGGCCGGTGAGGAAGCTGTCAGGATGAAG 180 BP
T S S A E E A K Q G Y T T V S Q E Y L T K A G E E A Y R H K 60 AS

FokI StyI XhoI

GCACAGGATTTGGCCTTGGCAGTTCAGACCTACATTGAGGCCAAAGATGAAACTCGAGAACAAAACCATGCTCACAACTTTGACTTAATT 270 BP
A Q D L A L A Y Q T Y I E A K M K L E N K T M L T T F D L I 90 AS

RsaI EcoRII MaeIII

CAAGACCCGAAGTTCAGAAGTCTTGGAGCACAAACGCTGGGGTGCAGAGGAGTACACCTGGGTTGGTGGTAAACAAAGTTGCGGGTAGG 360 BP
Q D P K F R S L G A Q R W G A K E Y T W V G A G N K Y A G R 120 AS

FokI FokI MspI RsaI RsaI StyI HincII

GATGTGGCAGTTATCCTAACGCATCCCGCCTTACCCGGACAGTACGAAAAGTACCTTGGTGTGGACGTTGCGATGCTGAGATGGAACGAA 450 BP
D Y A V I L T H P A F T G Q Y E K Y L G V D Y A M L R W N E 150 AS

Bpu10I AluI BspMI AluI MspI MslI BsrI

ACAATGCCTGAGCTTTACAACTGCTCCTCAAAAATAACCGAAAACCTGAAGCTCCAAAAGCCGGTTTGTGGCTATTACCCTGGGATGAC 540 BP
T M P E L Y N L L L K I T E N P E A P K P Y C G Y Y H W D D 180 AS

FokI XmnI StyI AluI PvuII

CCCGAAACACCTGAAAAGGAAGAATTCGAAATATCTCTGCCACTATCCACGACCATAAAGGTCTATGACCCGATTTCCAAGGGTCAG 630 BP
P E T P E K E E I P K Y L C H Y P T T I K Y Y D P I S K G Q 210 AS

Bpu10I MaeIII BsrI RsaI PstI BsrI

CTGTGGGTGTTGTGGGAACCTCAGCCTACATCGACGGTTACTTCCAGTACCTCACCCAGAACCCCGCAATCCTGCAGAGAACATCGCC 720 BP
L W Y Y Y G T S A Y I D G Y F Q Y L T Q N P A N P A E N I A 240 AS

BspMI MfeI

AGTGAGATAAGCAAGAGTGTGAGGGTGCAATTCAGCAGGTTTACTACGCTTTGGGTATGTCAGCGGCAATTGCTATAGTTTTTCGTATC 810 BP
S E I S K S Y E G A I Q Q Y Y Y A L G I A A A I A I Y F Y I 270 AS

BsmAI AluI BlnI

GTTCTGGCGGTGTTCCAAACCTCGACCAATTACGAGACCCATAA TCGAGCTGAGCAACAC TGCCGACAAGATTGCCGAAGGAAACCTTGAG 900 BP
V L A Y F T T S T I T R P I I E L S N T A D K I A E G N L E 300 AS

Bpu10I NcoI StyI

GCTGAGGTTCGCAACCAAGAGGCGTGTGAAATCGGTATTCTTGCAAAGAGTATCGAAAGGCTGAGAAGGAGCCTCAAGGTCGCCATG 990 BP
A E Y P H Q N R A D E I G I L A K S I E R L R R S L K Y A M 330 AS

EcoNI MslI

GAGAGCCTTGAGGAGGCACTGAAATGA 1017 BP
E S L E E A L K . 339 AS

Anhang

8.3. *Corynebacterium glutamicum*, DNA-und Proteinsequenz: TM, HAMP, AC

ATCC 13032 DNA, complete genome, gi|42602314|dbj|BA000036.3, accession BX927147.

UniProtKB/TrEMBL accession number Q8NTJ6, gene name: Cgl0311

```

      MslI      DraIII      MslI
ATGAGTCGATTGCTTAGAGCATTGAAATGGCTGTGGGGCACATCGTGGCCGCTGTATGCTGCGACGGTGCCTGGCACGGAATGTGTTTGGT 90 BP
M S R L L R A L K W L W G T S W P L Y A A T V L G T N Y F G 30 AS

      BglII      AluI
      PvuII
GCGCTCGCAGTAATGCTGTTTGTGCGCTTCCTCATTCCGCGAGCCAGATGCTTCAAATTTCAACGCTGAGATCTCGTATCTGCCAGCTGTT 180 BP
A L A Y M L F Y R F L I P Q P D A S N F N A E I S Y L P A Y 60 AS

      NspI
      MslI
      MaeIII      MspI
GGTTTCGCATACCTGGCGTTCGCCATTGTGCGGGGCATGCTGGTGACATTTTTGATGTTCCGCCCGGTGCTTGATTGGCAGCGAAGCCCT 270 BP
G F A Y L A F A I Y A G M L V T F L M F R P Y L D W Q R S P 90 AS

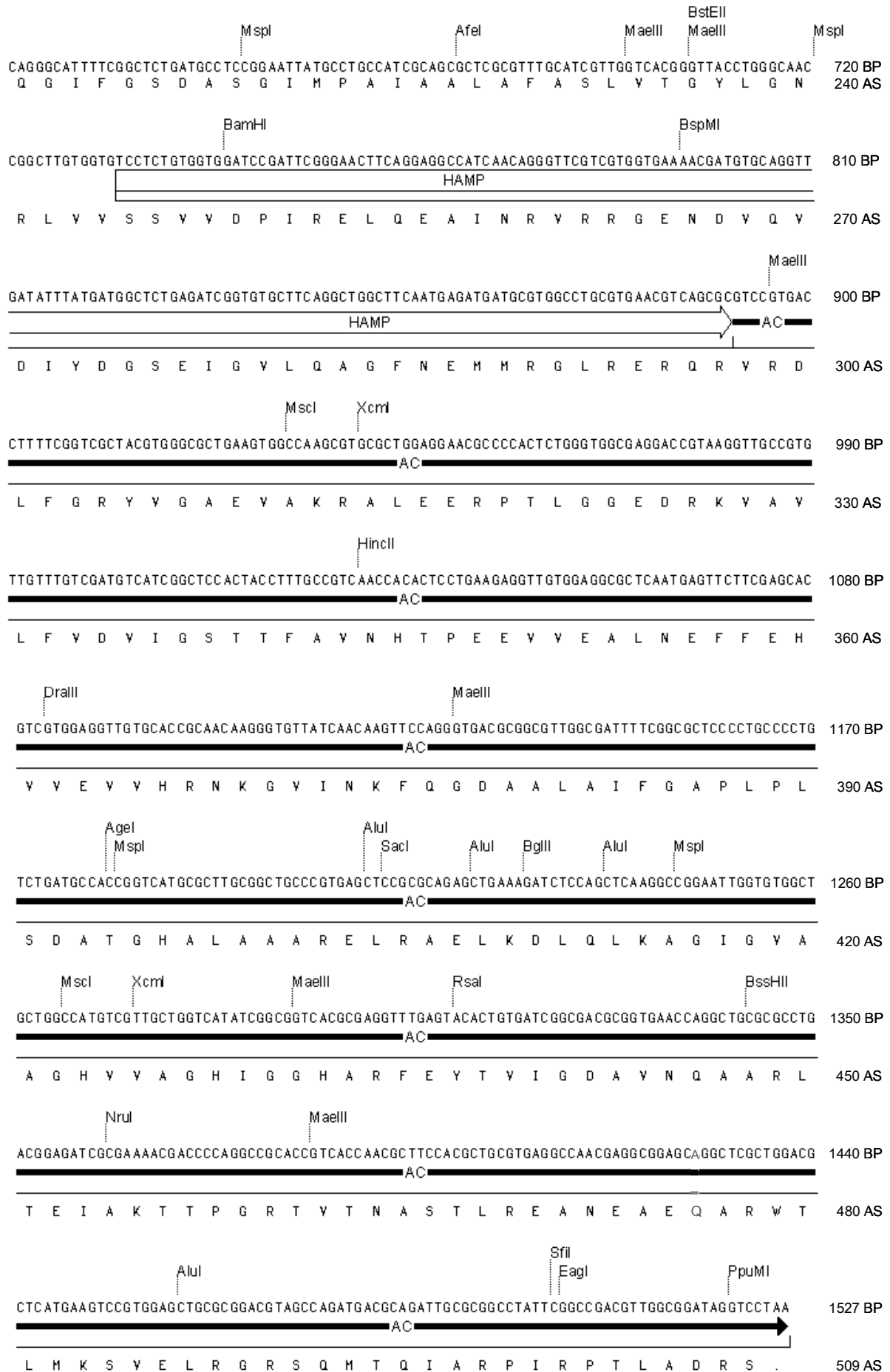
      FokI
GAAGATCATGACC GAAATATGGTGC GCAACTTGGTTATGCGCATCCCCATCTACCAGGCAATTCTGTGCGCAGTGGTGTGGTTAATCGGC 360 BP
E D H D R N M Y R N L Y M R I P I Y Q A I L C A Y Y W L I G 120 AS

      MfeI      BsrI      AccI      BsrI      XcmI      MslI
ATTGCAATTGCAACGTTGATTTGCGCCAGTGTGTCTACCAAGTTTGGCGCTGGTCTGGCGTTTTTCCACGTTGATGGCTGCCGCAATCGTC 450 BP
I A I A T L I S A S V S T S L A L V Y A F S T L M A A A I Y 150 AS

      BlnI      MspI
GTGCTGCTCACCTACCTTGAGGCTGAGCGTTTGGTGCCTCCGGTTGCTGCGTCTGCCCTGGCGCGTCGATTTGAGGATTCCACGCTGGAA 540 BP
Y L L T Y L E A E R L Y R P Y A A S A L A R R F E D S T L E 180 AS

      AfeI      BsmI      BsrI      MslI      EcoRI
CCACCTGTGAGCCAGCGCTTGCCTATGACGTGGTTGCTGACGTTGGGCATTCCAGTGATGGGAATCTGCTGCTTATTTGGGGCTACTCG 630 BP
P P V S Q R L R M T W L L T L G I P Y M G I L L L I W G Y S 210 AS
```


Anhang

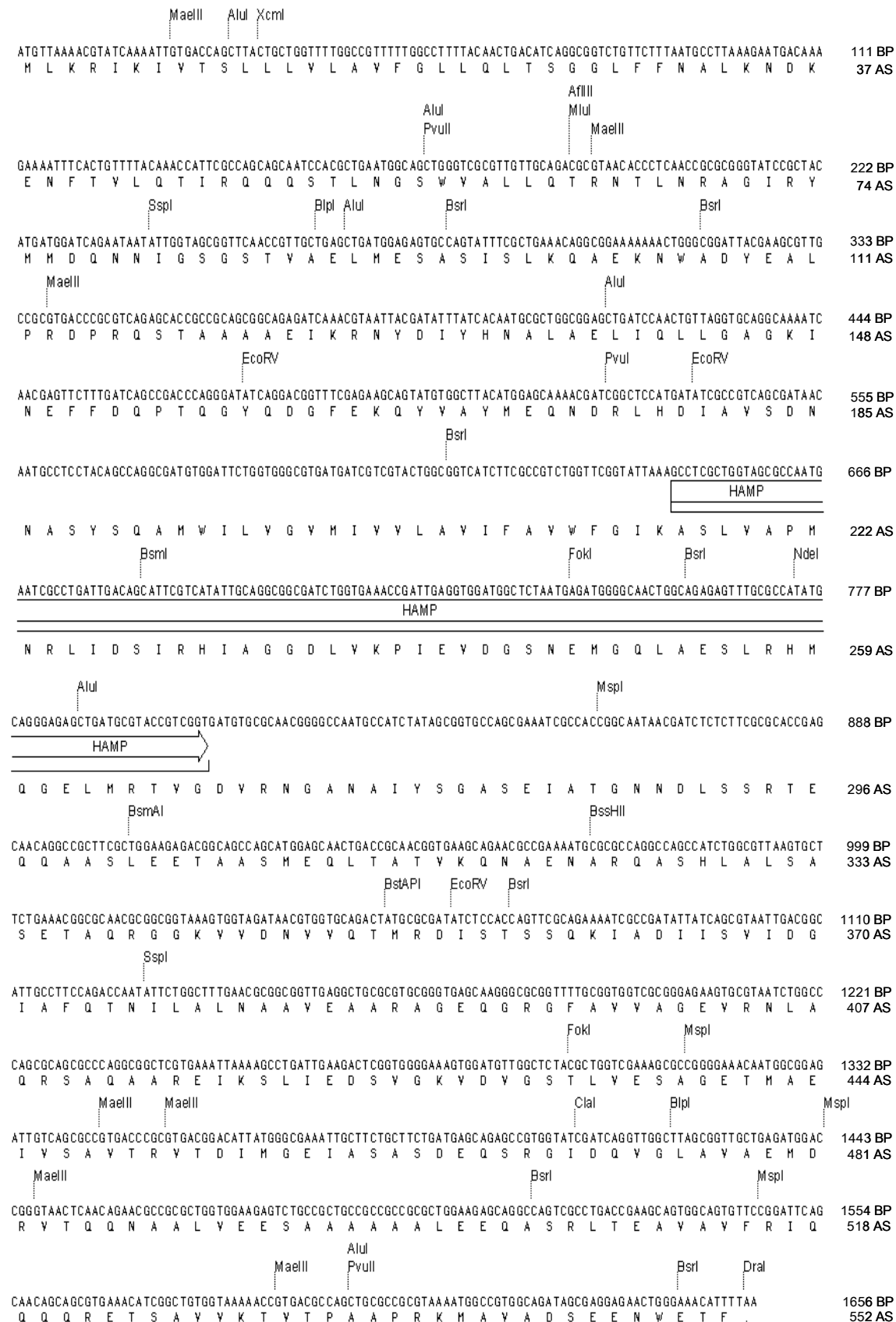


Anhang

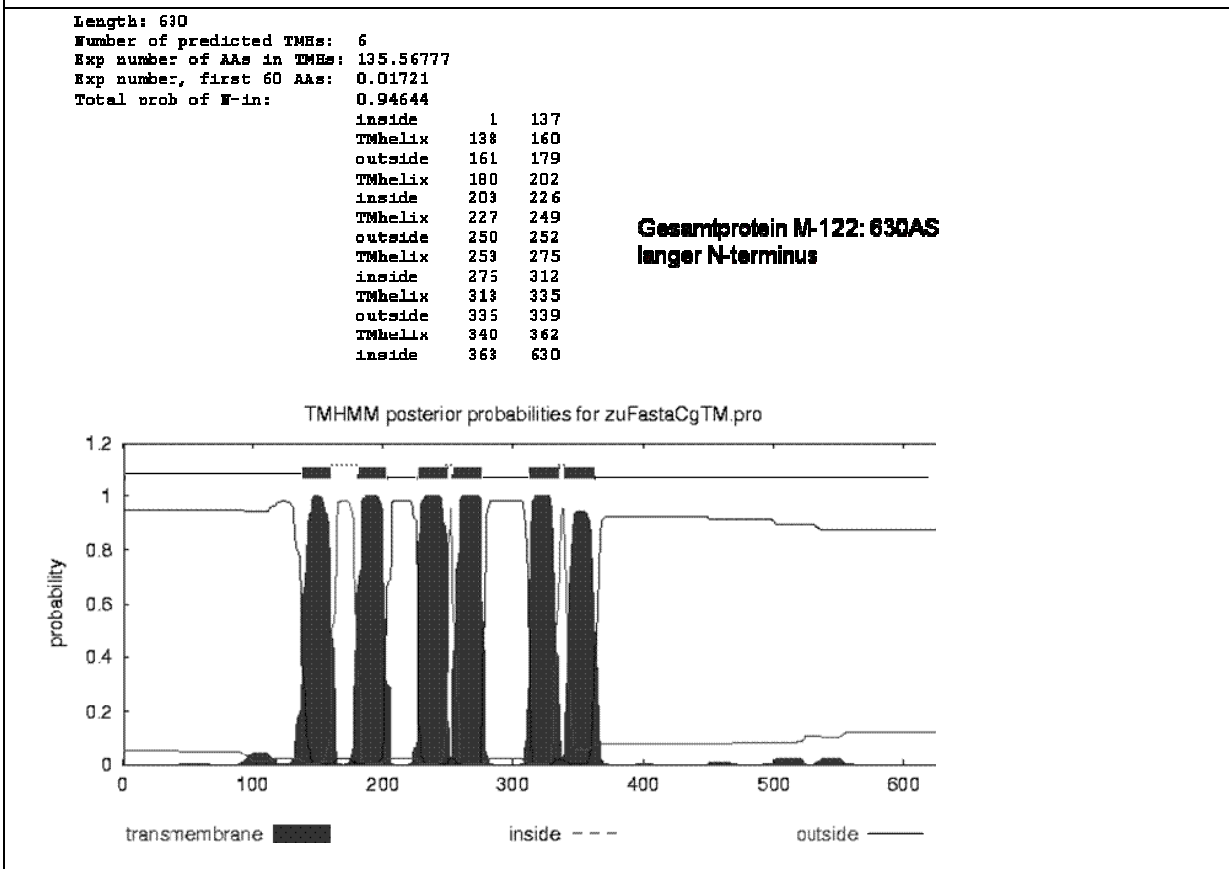
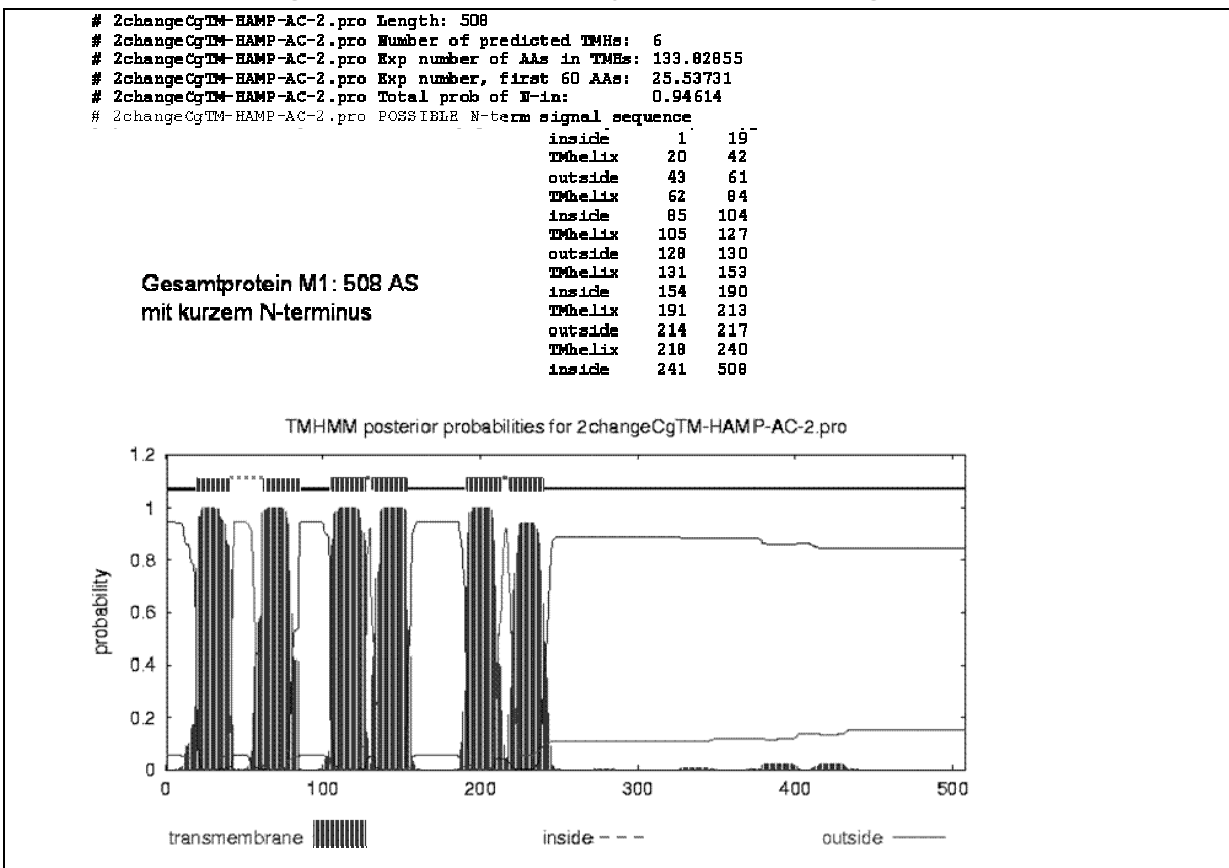
8.4. Tsr, DNA-und Proteinsequenz: Rezeptor, HAMP, Kinase

Escherichia coli K12 MG1655, complete genome gi|48994873| gb|U00096|

UniProtKB/TrEMBL accession number P02942, gene name: tsr



8.5. Vorhersage der TM aus *Corynebacterium glutamicum*



9. Literatur

- Abdel Motaal, A., Tews, I., Schultz, J.E. and Linder, J.U. (2006) Fatty acid regulation of adenylyl cyclase Rv2212 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Febs J*, **273**, 4219-4228.
- Alberti, S., Oehler, S., von Wilcken-Bergmann, B. and Muller-Hill, B. (1993) Genetic analysis of the leucine heptad repeats of Lac repressor: evidence for a 4-helical bundle. *Embo J*, **12**, 3227-3236.
- Ames, P. and Parkinson, J.S. (1988) Transmembrane signaling by bacterial chemoreceptors: *E. coli* transducers with locked signal output. *Cell*, **55**, 817-826.
- Ames, P., Studdert, C.A., Reiser, R.H. and Parkinson, J.S. (2002) Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7060-7065.
- Anantharaman, V. and Aravind, L. (2003) Application of comparative genomics in the identification and analysis of novel families of membrane-associated receptors in bacteria. *BMC Genomics*, **4**, 34.
- Appleman, J.A. and Stewart, V. (2003) Mutational analysis of a conserved signal-transducing element: the HAMP linker of the *Escherichia coli* nitrate sensor NarX. *J Bacteriol*, **185**, 89-97.
- Aravind, L. and Ponting, C.P. (1999) The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol Lett*, **176**, 111-116.
- Barzu, O. and Danchin, A. (1994) Adenylyl cyclases: a heterogeneous class of ATP-utilizing enzymes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **49**, 241-283.
- Baumgartner, J.W., Kim, C., Brissette, R.E., Inouye, M., Park, C. and Hazelbauer, G.L. (1994) Transmembrane signalling by a hybrid protein: communication from the domain of chemoreceptor Trg that recognizes sugar-binding proteins to the kinase/phosphatase domain of osmosensor EnvZ. *J Bacteriol*, **176**, 1157-1163.
- Bibikov, S.I., Miller, A.C., Gosink, K.K. and Parkinson, J.S. (2004) Methylation-independent aerotaxis mediated by the *Escherichia coli* Aer protein. *J Bacteriol*, **186**, 3730-3737.
- Bordignon, E., Klare, J.P., Doebber, M., Wegener, A.A., Martell, S., Engelhard, M. and Steinhoff, H.J. (2005) Structural analysis of a HAMP domain: the linker region of the phototransducer in complex with sensory rhodopsin II. *J Biol Chem*, **280**, 38767-38775.
- Buron-Barral, M.C., Gosink, K.K. and Parkinson, J.S. (2006) Loss- and gain-of-function mutations in the F1-HAMP region of the *Escherichia coli* aerotaxis transducer Aer. *J Bacteriol*, **188**, 3477-3486.

Literatur

- Butler, S.L. and Falke, J.J. (1998) Cysteine and disulfide scanning reveals two amphiphilic helices in the linker region of the aspartate chemoreceptor. *Biochemistry*, **37**, 10746-10756.
- Castro, L.I., Hermsen, C., Schultz, J.E. and Linder, J.U. (2005) Adenylyl cyclase Rv0386 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv uses a novel mode for substrate selection. *FEBS J*, **272**, 3085-3092.
- Chi, Y.I., Yokota, H. and Kim, S.H. (1997) Apo structure of the ligand-binding domain of aspartate receptor from *Escherichia coli* and its comparison with ligand-bound or pseudoligand-bound structures. *FEBS Lett*, **414**, 327-332.
- Cole, S.T. (1994) The genome of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, **62**, 122-125.
- Cole, S.T. (1998) The *Mycobacterium leprae* genome project. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, **66**, 589-591.
- Cole, S.T. and Barrell, B.G. (1998) Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Found Symp*, **217**, 160-172; discussion 172-167.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S. and Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**, 537-544.
- Collins, L.A., Egan, S.M. and Stewart, V. (1992) Mutational analysis reveals functional similarity between NARX, a nitrate sensor in *Escherichia coli* K-12, and the methyl-accepting chemotaxis proteins. *J Bacteriol*, **174**, 3667-3675.
- Cotta, M.A., Whitehead, T.R. and Wheeler, M.B. (1998) Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, *Prevotella ruminicola* D31d. *FEMS Microbiol Lett*, **164**, 257-260.
- Crick, F.H.C. (1953) The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallographica*, **6**, 689-697.
- Deng, Y., Liu, J., Zheng, Q., Eliezer, D., Kallenbach, N.R. and Lu, M. (2006) Antiparallel four-stranded coiled coil specified by a 3-3-1 hydrophobic heptad repeat. *Structure*, **14**, 247-255.
- Dessauer, C.W. and Gilman, A.G. (1997) The catalytic mechanism of mammalian adenylyl cyclase. Equilibrium binding and kinetic analysis of P-site inhibition. *J Biol Chem*, **272**, 27787-27795.
- Dessauer, C.W., Tesmer, J.J., Sprang, S.R. and Gilman, A.G. (1999) The interactions of adenylate cyclases with P-site inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 205-210.

Literatur

- Falke, J.J., Bass, R.B., Butler, S.L., Chervitz, S.A. and Danielson, M.A. (1997) The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 457-512.
- Findeisen, F., Linder, J.U., Schultz, A., Schultz, J.E., Brugger, B., Wieland, F., Sinning, I. and Tews, I. (2007) The structure of the regulatory domain of the adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* with bound oleic acid. *J Mol Biol*, **369**, 1282-1295.
- Gallagher, D.T., Smith, N.N., Kim, S.K., Heroux, A., Robinson, H. and Reddy, P.T. (2006) Structure of the class IV adenylyl cyclase reveals a novel fold. *J Mol Biol*, **362**, 114-122.
- Gernert, K.M., Surles, M.C., Labean, T.H., Richardson, J.S. and Richardson, D.C. (1995) The Alacoil: a very tight, antiparallel coiled-coil of helices. *Protein Sci*, **4**, 2252-2260.
- Gruber, M. and Lupas, A.N. (2003) Historical review: another 50th anniversary--new periodicities in coiled coils. *Trends Biochem Sci*, **28**, 679-685.
- Guo, Y.L., Seebacher, T., Kurz, U., Linder, J.U. and Schultz, J.E. (2001) Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases. *Embo J*, **20**, 3667-3675.
- Hammer, A. (2004) Klonierung und Charakterisierung von fünf Adenylatcyclasen aus *Stigmatella aurantiaca* und *Mycobacterium tuberculosis*. *Dissertation Eberhard-Karls-Universität Tübingen*.
- Harlocker, S.L., Rampersaud, A., Yang, W.P. and Inouye, M. (1993) Phenotypic revertant mutations of a new OmpR2 mutant (V203Q) of *Escherichia coli* lie in the envZ gene, which encodes the OmpR kinase. *J Bacteriol*, **175**, 1956-1960.
- Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J.U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J.E., Lupas, A.N. and Coles, M. (2006) The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell*, **126**, 929-940.
- Jin, T. and Inouye, M. (1993) Ligand binding to the receptor domain regulates the ratio of kinase to phosphatase activities of the signaling domain of the hybrid *Escherichia coli* transmembrane receptor, Taz1. *J Mol Biol*, **232**, 484-492.
- Jin, T. and Inouye, M. (1994) Transmembrane signaling. Mutational analysis of the cytoplasmic linker region of Taz1-1, a Tar-EnvZ chimeric receptor in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **244**, 477-481.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Puhler, A., Rey, D.A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahn, H., Wendisch, V.F., Wiegrabe, I. and Tauch, A. (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol*, **104**, 5-25.

Literatur

- Kalman, L.V. and Gunsalus, R.P. (1990) Nitrate- and molybdenum-independent signal transduction mutations in narX that alter regulation of anaerobic respiratory genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **172**, 7049-7056.
- Kim, H.J., Kim, T.H., Kim, Y. and Lee, H.S. (2004) Identification and characterization of glxR, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, **186**, 3453-3460.
- Kim, K.K., Yokota, H. and Kim, S.H. (1999) Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature*, **400**, 787-792.
- Kishii, R., Falzon, L., Yoshida, T., Kobayashi, H. and Inouye, M. (2007) Structural and functional studies of the HAMP domain of EnvZ, an osmosensing transmembrane histidine kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **282**, 26401-26408.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, **305**, 567-580.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leppla, S.H. (1982) Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 3162-3166.
- Letek, M., Valbuena, N., Ramos, A., Ordonez, E., Gil, J.A. and Mateos, L.M. (2006) Characterization and use of catabolite-repressed promoters from gluconate genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, **188**, 409-423.
- Linder, J.U. (2005) Substrate selection by class III adenylyl cyclases and guanylyl cyclases. *IUBMB Life*, **57**, 797-803.
- Linder, J.U. (2006) Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 1736-1751.
- Linder, J.U., Hammer, A. and Schultz, J.E. (2004) The effect of HAMP domains on class IIIb adenylyl cyclases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Biochem*, **271**, 2446-2451.
- Linder, J.U. and Schultz, J.E. (2003) The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell Signal*, **15**, 1081-1089.
- Lupas, A., Van Dyke, M. and Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, **252**, 1162-1164.
- Lupas, A.N. and Gruber, M. (2005) The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv Protein Chem*, **70**, 37-78.
- Maddock, J.R. and Shapiro, L. (1993) Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science*, **259**, 1717-1723.

Literatur

- Mampel, J., Schroder, H., Haefner, S. and Sauer, U. (2005) Single-gene knockout of a novel regulatory element confers ethionine resistance and elevates methionine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **68**, 228-236.
- Martinez, S.E., Bruder, S., Schultz, A., Zheng, N., Schultz, J.E., Beavo, J.A. and Linder, J.U. (2005) Crystal structure of the tandem GAF domains from a cyanobacterial adenylyl cyclase: modes of ligand binding and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3082-3087.
- Martinez, S.E., Wu, A.Y., Glavas, N.A., Tang, X.B., Turley, S., Hol, W.G. and Beavo, J.A. (2002) The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13260-13265.
- McCue, L.A., McDonough, K.A. and Lawrence, C.E. (2000) Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res*, **10**, 204-219.
- Michalodimitrakis, K.M., Sourjik, V. and Serrano, L. (2005) Plasticity in amino acid sensing of the chimeric receptor Taz. *Mol Microbiol*, **58**, 257-266.
- Miller, A.S. and Falke, J.J. (2004) Side chains at the membrane-water interface modulate the signaling state of a transmembrane receptor. *Biochemistry*, **43**, 1763-1770.
- Mou, T.C., Gille, A., Suryanarayana, S., Richter, M., Seifert, R. and Sprang, S.R. (2006) Broad specificity of mammalian adenylyl cyclase for interaction with 2',3'-substituted purine- and pyrimidine nucleotide inhibitors. *Mol Pharmacol*, **70**, 878-886.
- Moukhametzianov, R., Klare, J.P., Efremov, R., Baeken, C., Goppner, A., Labahn, J., Engelhard, M., Buldt, G. and Gordeliy, V.I. (2006) Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer. *Nature*, **440**, 115-119.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst*, **8**, 581-599.
- Ottemann, K.M., Xiao, W., Shin, Y.K. and Koshland, D.E., Jr. (1999) A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science*, **285**, 1751-1754.
- Park, H. and Inouye, M. (1997) Mutational analysis of the linker region of EnvZ, an osmosensor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **179**, 4382-4390.
- Parkinson, J.S., Ames, P. and Studdert, C.A. (2005) Collaborative signaling by bacterial chemoreceptors. *Curr Opin Microbiol*, **8**, 116-121.
- Pauling, L., Corey, R.B. and Branson, H.R. (1951) The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **37**, 205-211.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. and Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598-599.

Literatur

- Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Harding, G.P., Zuccarelli, A.J., Fletcher, H.M., Zhulin, I.B. and Taylor, B.L. (1997) The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10541-10546.
- Reddy, S.K., Kamireddi, M., Dhanireddy, K., Young, L., Davis, A. and Reddy, P.T. (2001) Eukaryotic-like adenylyl cyclases in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning and characterization. *J Biol Chem*, **276**, 35141-35149.
- Salomon, Y., Londos, C. and Rodbell, M. (1974) A highly sensitive adenylyl cyclase assay. *Anal Biochem*, **58**, 541-548.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Seligman, L. and Manoil, C. (1994) An amphipathic sequence determinant of membrane protein topology. *J Biol Chem*, **269**, 19888-19896.
- Shenoy, A.R., Sreenath, N.P., Mahalingam, M. and Visweswariah, S.S. (2005) Characterization of phylogenetically distant members of the adenylyl cyclase family from mycobacteria: Rv1647 from *Mycobacterium tuberculosis* and its orthologue ML1399 from *M. leprae*. *Biochem J*, **387**, 541-551.
- Shenoy, A.R., Srinivasan, N., Subramaniam, M. and Visweswariah, S.S. (2003) Mutational analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Rv1625c adenylyl cyclase: residues that confer nucleotide specificity contribute to dimerization. *FEBS Lett*, **545**, 253-259.
- Sinha, S.C., Wetterer, M., Sprang, S.R., Schultz, J.E. and Linder, J.U. (2005) Origin of asymmetry in adenylyl cyclases: structures of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1900c. *Embo J*, **24**, 663-673.
- Sismeiro, O., Trotot, P., Biville, F., Vivares, C. and Danchin, A. (1998) *Aeromonas hydrophila* adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria. *J Bacteriol*, **180**, 3339-3344.
- Solan, A., Ratia, K. and Fairman, R. (2002) Exploring the role of alanine in the structure of the Lac repressor tetramerization domain, a ferritin-like Alacoil. *J Mol Biol*, **317**, 601-612.
- Sourjik, V. and Berg, H.C. (2004) Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis. *Nature*, **428**, 437-441.
- Spreadbury, C.L., Pallen, M.J., Overton, T., Behr, M.A., Mostowy, S., Spiro, S., Busby, S.J. and Cole, J.A. (2005) Point mutations in the DNA- and cNMP-binding domains of the homologue of the cAMP receptor protein (CRP) in *Mycobacterium bovis* BCG: implications for the inactivation of a global regulator and strain attenuation. *Microbiology*, **151**, 547-556.
- Steegborn, C., Litvin, T.N., Hess, K.C., Capper, A.B., Taussig, R., Buck, J., Levin, L.R. and Wu, H. (2005a) A novel mechanism for adenylyl cyclase inhibition from the crystal structure of its complex with catechol estrogen. *J Biol Chem*, **280**, 31754-31759.

Literatur

- Steegborn, C., Litvin, T.N., Levin, L.R., Buck, J. and Wu, H. (2005b) Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 32-37.
- Studdert, C.A. and Parkinson, J.S. (2005) Insights into the organization and dynamics of bacterial chemoreceptor clusters through in vivo crosslinking studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15623-15628.
- Tang, W.J. and Hurley, J.H. (1998) Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Mol Pharmacol*, **54**, 231-240.
- Tellez-Sosa, J., Soberon, N., Vega-Segura, A., Torres-Marquez, M.E. and Cevallos, M.A. (2002) The *Rhizobium etli* cyaC product: characterization of a novel adenylate cyclase class. *J Bacteriol*, **184**, 3560-3568.
- Tesmer, J.J. and Sprang, S.R. (1998) The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr Opin Struct Biol*, **8**, 713-719.
- Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science*, **278**, 1907-1916.
- Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Johnson, R.A., Gosselin, G., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1999) Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science*, **285**, 756-760.
- Tews, I., Findeisen, F., Sinning, I., Schultz, A., Schultz, J.E. and Linder, J.U. (2005) The structure of a pH-sensing mycobacterial adenylyl cyclase holoenzyme. *Science*, **308**, 1020-1023.
- Tokishita, S., Kojima, A. and Mizuno, T. (1992) Transmembrane signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*: functional importance of the transmembrane regions of membrane-located protein kinase, EnvZ. *J Biochem (Tokyo)*, **111**, 707-713.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Utsumi, R. and Inoue, M. (1991) [Signal transduction via chimeric receptor (Tar-EnvZ, Taz)]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **36**, 160-164.
- Watts, K.J., Ma, Q., Johnson, M.S. and Taylor, B.L. (2004) Interactions between the PAS and HAMP domains of the *Escherichia coli* aerotaxis receptor Aer. *J Bacteriol*, **186**, 7440-7449.
- Wetterer, M. (2004) Rv1900c: Eine unorthodoxe Klasse IIIc Adenylatcyclase aus *Mycobacterium tuberculosis*. *Dissertation Eberhard-Karls-Universität, Tübingen*.
- Williams, S.B. and Stewart, V. (1999) Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction. *Mol Microbiol*, **33**, 1093-1102.
- Yadav, M.K., Leman, L.J., Price, D.J., Brooks, C.L., 3rd, Stout, C.D. and Ghadiri, M.R. (2006) Coiled coils at the edge of configurational heterogeneity. Structural analyses of

Literatur

- parallel and antiparallel homotetrameric coiled coils reveal configurational sensitivity to a single solvent-exposed amino acid substitution. *Biochemistry*, **45**, 4463-4473.
- Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T. and Frank, D.W. (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13899-13904.
- Yan, S.Z., Beeler, J.A., Chen, Y., Shelton, R.K. and Tang, W.J. (2001) The regulation of type 7 adenyl cyclase by its C1b region and *Escherichia coli* peptidylprolyl isomerase, SlyD. *J Biol Chem*, **276**, 8500-8506.
- Yan, S.Z., Huang, Z.H., Shaw, R.S. and Tang, W.J. (1997) The conserved asparagine and arginine are essential for catalysis of mammalian adenyl cyclase. *J Biol Chem*, **272**, 12342-12349.
- Yoshida, T., Phadtare, S. and Inouye, M. (2007) Functional and Structural Characterization of EnvZ, an Osmosensing Histidine Kinase of *E. coli*. *Methods Enzymol*, **423C**, 184-202.
- Zhang, G., Liu, Y., Ruoho, A.E. and Hurley, J.H. (1997) Structure of the adenyl cyclase catalytic core. *Nature*, **386**, 247-253.
- Zhu, Y. and Inouye, M. (2004) The HAMP linker in histidine kinase dimeric receptors is critical for symmetric transmembrane signal transduction. *J Biol Chem*, **279**, 48152-48158.

Meine akademischen Lehrer der Universitäten Halle/Saale und Tübingen waren die Damen und Herren Professoren und Doktoren

Beyer, C.	Pharmazeutische Chemie
Drews, G.	Pharmakologie und Toxikologie
Gauglitz, G.	Physikalische Chemie
Heide, L.	Pharmazeutische Biologie
Hilgeroth, A.	Pharmazeutische Chemie
Karl, I.	Pharmazeutische Terminologie
Kovar, K.-A.	Pharmazeutische Chemie
Laufer, S.	Pharmazeutische Chemie
Nakel, W.	Physik für Pharmazeuten
Neubert, R.	Pharmazeutische Technologie
Pommer, H.	Mathematik für Pharmazeuten
Richter, H.	Pharmazeutische Chemie
Ruth, P.	Pharmakologie und Toxikologie
Schmidt, P. C.	Pharmazeutische Technologie
Schultz, J. E.	Pharmazeutische Chemie
Wahl, M. A.	Biopharmazie
Zessin, G.	Pharmazeutische Technologie
Zimmermann, W.	Pharmazeutische Chemie

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Eva Franziska Berndt
Geburtstag, -ort: 11.08.1976 in Ruit

Schulbildung

1983-1987 Grund-und Hauptschule Sulzgriess
1987-1996 Georgii-Gymnasium Esslingen
20.06.1996 Abitur

Lehre

01/1997-08/1999 Ausbildung zur Buchhändlerin, Osiandersche Buchhandlung Tübingen
20.01.2000 Abschlussprüfung Buchhändlerin, IHK Reutlingen

Studium und praktische Ausbildung

09/1997-03/2002 Studium der Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Eberhard-Karls-Universität Tübingen
08/2000-10/2000 Praktikum an der University of Wisconsin, Madison, USA, laboratory of molecular biology, Prof. Dr. Ching Kung
25.08.2000 1. Staatsexamen
25.03.2002 2. Staatsexamen
05/2002-10/2002 Pharmaziepraktikum in der Rathausapotheke am Marienplatz, München
11/2002-04/2003 Pharmaziepraktikum am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, Tübingen
02.06.2003 3. Staatsexamen
25.06.2003 Approbation als Apothekerin

Berufserfahrung

08/2003-06/2004 Pharmacie Internationale Zermatt, Schweiz
07/2004-08/2004 Schwan Apotheke, Esslingen

Promotion

11/2004-05/2007 Durchführung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit „Funktion einer HAMP-Domäne in der Signaltransduktion am Beispiel der mykobakteriellen Adenylatcyclase *Rv3645*“ am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. J. E. Schultz