

**Funktionelle Untersuchungen zur Wechselwirkung des
archaebakteriellen Photorezeptors NpSR_{II} mit seinem
Transducer NpHtr_{II} durch heterologe
Expression in *E.coli***

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von
Silke Mreyen
aus Mönchengladbach**

Dortmund 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim F. Ernst
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Georg Büldt

Tag der Prüfung: 16. Juli 2003

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare
Physiologie in Dortmund in der Abteilung physikalische Biochemie von Prof. Dr. R. S.
Goody, unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. M. Engelhard angefertigt.

Für Thomas
(*1970 †1999)

**Geheimnisvoll am lichten Tag,
läßt sich Natur des Schleiers nicht berauben,
und was sie deinem Geist nicht offenbaren mag,
das zwingst du ihr nicht ab
mit Hebeln und mit Schrauben**

Goethe, Faust I

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	18
2.1	Chemikalien	18
2.2	Enzyme	19
2.3	Instrumentation	19
2.4	Bakterienstämme und Plasmide	20
2.5	Synthetische Oligonukleotide	23
2.6	Antikörper	24
2.7	Größenstandards	24
2.8	Molekularbiologische Methoden	25
2.8.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	25
2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
2.8.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
2.8.4	DNA-Präparation von PCR-Produkten	26
2.8.5	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	26
2.8.6	Reinigung von DNA-Lösungen mittels Phenol/Chloroform Extraktion	26
2.8.7	Polymerase-Kettenreaktion	26
2.8.8	Fusion von DNA-Fragmenten	27
2.8.9	Restriktion von DNA	28
2.8.10	Modifikation von Plasmid-DNA durch T4-DNA-Polymerase	28
2.8.11	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	28
2.8.12	Ligation von DNA-Fragmenten	29
2.8.13	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen zur Elektroporation	29
2.8.14	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	29
2.8.15	Glycerinkulturen zur Lagerung von Bakterienstämmen	30
2.8.16	DNA-Sequenzierung	30
2.9	Proteinchemische Methoden	31
2.9.1	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	31
2.9.2	Zellaufschluß und Präparation der Proteine	31
2.9.3	Isolierung polarer Lipide aus <i>H. salinarum</i>	32
2.9.4	Durchflussmessungen der induzierten (H ³)-Methanolproduktion	33
2.10	Analytische Methoden	34

2.10.1	Denaturierende Protein-Gelelektrophorese	34
2.10.2	Blaue Native Gelelektrophorese	34
2.10.3	Aminosäureanalyse	35
2.10.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	35
2.10.5	Immunologische Nachweise nach Western Transfer	36
2.10.6	Massenspektrometrie	37
2.11	Biophysikalische Methoden	38
2.11.1	Isotherme-Titrations-Kalorimetrie	38
2.11.2	Mikroskopische Untersuchungen zur Phototaxis	39
2.11.3	Sequenzanalyse und Erstellung von Plasmidkarten	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Untersuchungen zur Expression von NpHtrII-Varianten	42
3.1.1	Experimentelle Grundlagen zur Expression und Reinigung der Proteine	42
3.1.2	Klonierung von verkürzten NpHtrII-Varianten mit C-term. Affinitätstag	44
3.1.3	Expression und Präparation der NpHtrII-Varianten und des NpSRII	45
3.2	BN-PAGE zur Untersuchung des Membrankomplexes <i>in vitro</i>	49
3.2.1	Analyse der NpSRII/NpHtrII- Komplexbildung	49
3.2.2	Einfluss von verschiedenen Salzkonzentrationen	54
3.3	Isotherme-Titrations-Kalorimetrie (ITC)	56
3.3.1	Experimentelle Grundlagen zu ITC	56
3.3.2	Untersuchungen der Bindungsaffinität des NpSRII/NpHtrII-Komplexes	59
3.3.3	Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf die Komplexbildung	62
3.3.4	Einfluss von verschiedenen NaCl-Konzentrationen	63
3.3.5	Einfluss spezifisch eingeführter Mutationen	63
3.4	Modellsystem zur Untersuchung von Phototaxis in <i>E.coli</i>	66
3.4.1	Sequenzanalyse zur Auswahl der Fusionschnittstellen	66
3.4.2	Konstruktion von Fusionsproteinen aus NpHtrII und MCP2	69
3.4.3	Koexpression der Fusionsproteine und des Rezeptors in <i>E. coli</i>	73
3.4.4	Kontrollmessungen zur Phototaxis	77
3.4.5	Phototaxismessungen von <i>E.coli</i> RP437-Chimären	79
3.4.6	Messung der Methanolfreisetzung	86
4	Diskussion	90
4.1	Die Rezeptor-Bindungs-Domäne des archaebakteriellen Transducers	91
4.2	Phototaxis in <i>Escherichia coli</i>	102

5	Zusammenfassung	108
6	Literaturverzeichnis	109
7	Abkürzungen	120
8	Anhang	122

1 Einleitung

Die physiologische Reaktion von Organismen auf einen Umweltreiz setzt die Möglichkeit zur Reizaufnahme, Reizumwandlung und Reizantwort voraus. Die Aufnahme eines Reizes erfolgt meist über Membranrezeptoren, welche durch die Interaktion mit dem Primärsignal in einen aktiven Zustand überführt werden. Daraufhin wird eine Signalkaskade ausgelöst, die als Bindeglied zwischen Rezeptor und Effektor dient. Die Fähigkeit Umweltreize aufzunehmen und zu verarbeiten ist eine generelle Eigenschaft aller Lebewesen und wird auch in einfachen bakteriellen Systemen gefunden. Ein gut untersuchtes Beispiel für bakterielle Signaltransduktion ist die Chemotaxis in *E. coli*. Die Signalweiterleitung erfolgt über ein Signalsystem, das aufgrund der Beteiligung von zwei konservierten Funktionen und Strukturdomänen (Sensor und Regulator) als Zwei-Komponenten-System bezeichnet wurde. Eine ähnlich aufgebaute Signaltransduktion wurde auch in dem Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* für die Phototaxis nachgewiesen. Besondere Aufmerksamkeit soll hier, neben der eubakteriellen Chemotaxis, vor allem der Signalübertragung in der archaeobakteriellen Phototaxis gewidmet werden.

Chemotaxis in *E. coli*

Die Bewegung von Bakterien auf Nahrungsstoffe zu und von Schadstoffen weg beginnt mit der Wahrnehmung der jeweiligen Substanzen durch Chemorezeptoren auf der Zelloberfläche und wird allgemein als Chemotaxis bezeichnet. Nicht nur Eubakterien zeigen chemotaktische Fähigkeiten, auch Archaeobakterien machen sich die Chemotaxis zu Nutze. Die erhaltenen Signale werden an die Flagellenmotoren weitergeleitet, die bestimmen, ob ein Bakterium ruhig in gerader Linie schwimmt oder abrupt seine Richtung ändert. Der erste Schritt der Signalweiterleitung eines äußeren Reizes durch die Membran, der letztlich die Drehrichtung des Flagellenmotors bestimmt, wird von sogenannten MCP's, Methylakzeptor-Chemotaxisproteine, vermittelt (Übersichtsartikel: (Falke und Hazelbauer, 2001)). Am besten untersucht ist die Chemotaxis in dem Eubakterium *E. coli*. Man kennt fünf homologe MCP's; sie werden von den Genen *TRS* (MCP I, Serinrezeptor), *TAR* (MCP II, Aspartat/Maltoserezeptor), *TRG* (MCP III, Ribose/Galaktose-Rezeptor), *TAP* (MCP IV, Dipeptidrezeptor) und *AER* (Sauerstoff/Elektronenrezeptor) codiert (Falke *et al.*, 1997). Neben der chemotaktischen positiven Antwort, die den einzelnen Bezeichnungen zu entnehmen ist, werden auch sekundäre attraktive und abstoßende Reize vermittelt. Die Wechselwirkung mit den Stimulanzen erfolgt entweder direkt mit der periplasmatischen Domäne des Rezeptors oder passiv über sogenannte Bindungsproteine, die ausschließlich im Periplasma lokalisiert sind. Jedes der fünf Mitglieder der MCP-Familie hat eine Masse von etwa 60 kDa und besteht aus vier Domänen (siehe auch

Abb. 2.1-1): Eine sensorische Domäne, die sich an Lock- oder Schreckstoff beziehungsweise einen Lockstoff-Protein-Komplex bindet, ein transmembranes Segment aus zwei α -Helizes, eine zytosolische Region, die reversibel methyliert werden kann und eine signalgebende Domäne, die das Signal an den Flagellenmotor weiterleitet.

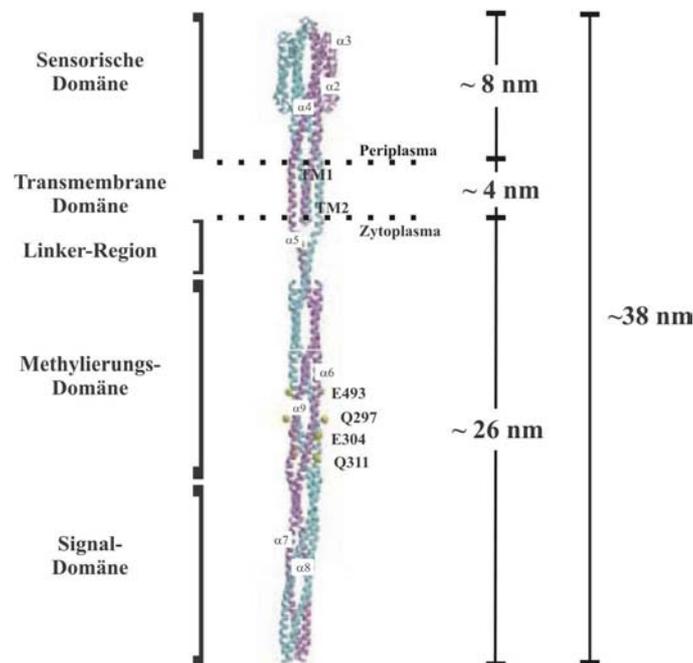


Abb. 2.1-1: Bakterieller Chemorezeptor nach Kim *et al.* (1999, 2002). Es lassen sich fünf Teilbereiche unterscheiden, die entsprechend ihrer Funktion im Periplasma, innerhalb oder in der Nähe der Zellmembran bzw. im Zytoplasma lokalisiert sind. Die gelb markierten Stellen bezeichnen die Methylierungsstellen.

Die sensorische Domäne konnte durch Kristallstrukturanalyse als Dimer von zwei antiparallelen Vier-Helix-Bündeln identifiziert werden, deren erste und vierte Helix sich bis ins Zytoplasma fortsetzt (Milburn *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2002). Für den Aspartatrezeptor konnte gezeigt werden, dass die Reaktion auf die Bindung eines Aspartats durch die Bindung eines weiteren Aspartats nicht beeinflusst wird 1994, was allgemein als negative Kooperativität bezeichnet wird (Yeh *et al.*, 1996). Als Konsequenz wird in den Untersuchungen an der Kristallstruktur nur die Konformationsänderung in einer α_4 -Helix beobachtet, die sich um etwa 1,6 Angström mit einer Kolbenhub-Bewegung in Richtung der Membran verschiebt (Chervitz und Falke, 1996). Ottemann *et al.* (1999) stützen diese These weitestgehend. Über die sich anschließende Linker-Domäne ist bislang wenig bekannt. Vernetzungsstudien von Butler und Falke (1998) konnten zwei amphipatische Helizes nachweisen, die erste als Fortsetzung der TM 2, die andere als Bestandteil der Dimer-Kontaktfläche. Beide sind über eine geordnete Struktur miteinander verknüpft, die sich bezüglich der Proteinfunktion als besonders sensitiv herausgestellt hat (Ames und

Schwimmt die Zelle einem Lockstoffkonzentrationsgefälle entgegen oder entfernt sich von einem Schreckstoff wird das Taumeln unterdrückt und umgekehrt. Somit entfernt sich die Zelle kontinuierlich von schädlichen Reizen und bewegt sich hin zu Lockstoffen.

Phototaxis in Archaeobakterien

Auch Archaeobakterien haben Möglichkeiten entwickelt sich ihren Umweltbedingungen optimal anzupassen. Die natürliche Umgebung von Halobakterien, z.B. *Halobacterium salinarum* oder *Natronobacterium pharaonis* sind konzentrierte Salzlaugen die starker Sonneneinstrahlung ausgesetzt sind, wie z.B. ausgetrocknete Salztümpel in Wüsten, das Tote Meer oder Salinen, in denen durch die natürliche Verdunstung des Meerwassers Meersalz gewonnen wird. Da die Löslichkeit von Sauerstoff in salzgesättigtem Wasser bei Temperaturen von 40 – 50 °C nur sehr gering ist, können die flachen Salzsümpfe in Monaten des zunehmenden Wasserverlustes und des steigenden Wachstums der Zellen leicht anaerob werden. Als Ausweg aus dieser Situation haben Archaeobakterien wie *H. salinarum* die Fähigkeit entwickelt Lichtenergie für den Stoffwechsel nutzbar zu machen. Diese „zweite Art“ der Photosynthese wird durch die lichtgetriebene Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR) vermittelt und arbeitet mit Licht als einziger Energiequelle. BR wurde in den frühen siebziger Jahren durch Oesterhelt und Stockenius in einem bestimmten Bereich der Membran von *H. salinarum*, der Purpurmembran, entdeckt. Das BR bewirkt, dass im Licht ein Protonengradient zwischen Außen- und Innenseite der Membran aufgebaut wird. Die Purpurmembran wirkt also wie eine „lichtgetriebene Protonenpumpe“ und führt zur Erzeugung eines elektrochemischen Membranpotentials. Der Ladungsausgleich kann mit der Regeneration von ATP durch die ATP-Synthase einhergehen. Die im Licht gewonnene Energie ergänzt die Energie die durch aerobe Substratoxidation gewonnen wird. Das Halorhodopsin (HR), Ende der siebziger von Matsubo-Yagi und Mukohata (1980) entdeckt und später sequenziert von Blanck und Oesterhelt (1987), fungiert ebenfalls lichtgetrieben als Ionenpumpe (für Cl⁻-Ionen). An den Photozyklus (später im Text näher erläutert) ist die Translokation eines Chloridions in das Zellinnere gekoppelt. Dies ermöglicht den Zellen die effiziente Nettoaufnahme von Salz, d.h. aktive Aufnahme von Anionen gegen das herrschende Membranpotential während des Wachstums (Bibikov *et al.*, 1991). Oranges Licht wird von BR und HR optimal absorbiert, während blaues und ultraviolettes Licht, das der Zelle schaden würde, nicht absorbiert wird. Um Umgebungsbedingungen mit orangem Licht denen mit schädlichem Licht vorziehen zu können, bedienen sich die Bakterien einer einfachen Form des Farbsehens. Sie schwimmen zu orangem Licht hin und entfliehen schädlichem UV-Licht.

Halobakterien schwimmen wie die *E. coli* Bakterien mit Hilfe eines Flagellenbündels. Der Unterschied besteht in der Anordnung der Flagellen, die bei Halobakterien lediglich an den Enden der stäbchenförmigen Zellen eingebettet sind. Somit bilden die Flagellen unabhängig von der Drehrichtung des Motors eine Art Bündel das sich durch Kooperation links oder rechts drehen kann, wobei es die Zelle schiebt oder zieht (Alam und Oesterhelt, 1984). Der Flagellenmotor wechselt seine Drehrichtung alle 20 bis 30 Sekunden. Das Umschalten zwischen beiden Drehrichtungen erfolgt spontan und bevorzugt statistisch keine der beiden Richtungen. Obwohl die Zellen nur vor- oder rückwärts schwimmen können, ist eine Orientierung im Raum möglich. Durch die Brown'sche Molekularbewegung wird die Schwimmrichtung der Zelle meist minimal verändert und bei jedem Umschalten des Flagellenmotors tritt eine Reorientierung der Zelle auf. Diese Bewegung wird allgemein als „random walk“ bezeichnet (Spudich und Bogomolni, 1988). Ein positiver Stimulus inhibiert wie auch bei *E. coli* das Umschalten des Flagellenmotors und bewirkt somit eine Verlängerung der Schwimmphase. Diese Verlängerung führt zu einer Schwimmbewegung der Zelle in Richtung einer attraktiven Umgebung. Entfällt ein positiver Stimulus oder ein negativer Stimulus tritt auf, passiert das Umgekehrte was zur Reorientierung der Zelle führt. Mit diesem simplen Bewegungsmuster vermag das Halobakterium sich außerordentlich effektiv in seiner Umgebung zu orientieren und optimale Bedingungen aufzusuchen (Spudich und Stoeckenius, 1979; Stoeckenius *et al.*, 1988). Abb. 2.1-3 zeigt den Bewegungsablauf einer Bakterienzelle bei einer Flucht aus Blau-grünem- oder UV-Licht.

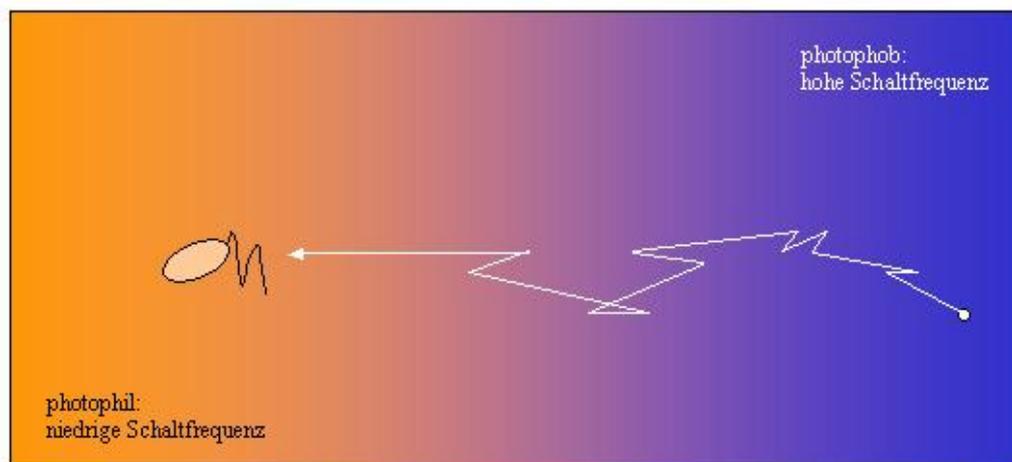


Abb. 2.1-3: Schwimmverhalten einer phototaktischen Bakterienzelle. In Bereichen mit blau-grünem Licht ist die Frequenz der Schlagumkehr des Flagellenmotors kurzzeitig erhöht, während oranges Licht die Schlagumkehr kurzzeitig unterdrückt. Das führt zu einer gerichteten Bewegung der Bakterien hin zu orangem Licht.

Die archaebakteriellen Rhodopsine

Als verantwortlich für die Phototaxis konnten zwei Lichtrezeptoren beschrieben werden, die wie BR und HR zu den bakteriellen Rhodopsinen gehören und sensorische Rhodopsine I und II genannt wurden (Abb. 2.1-4):

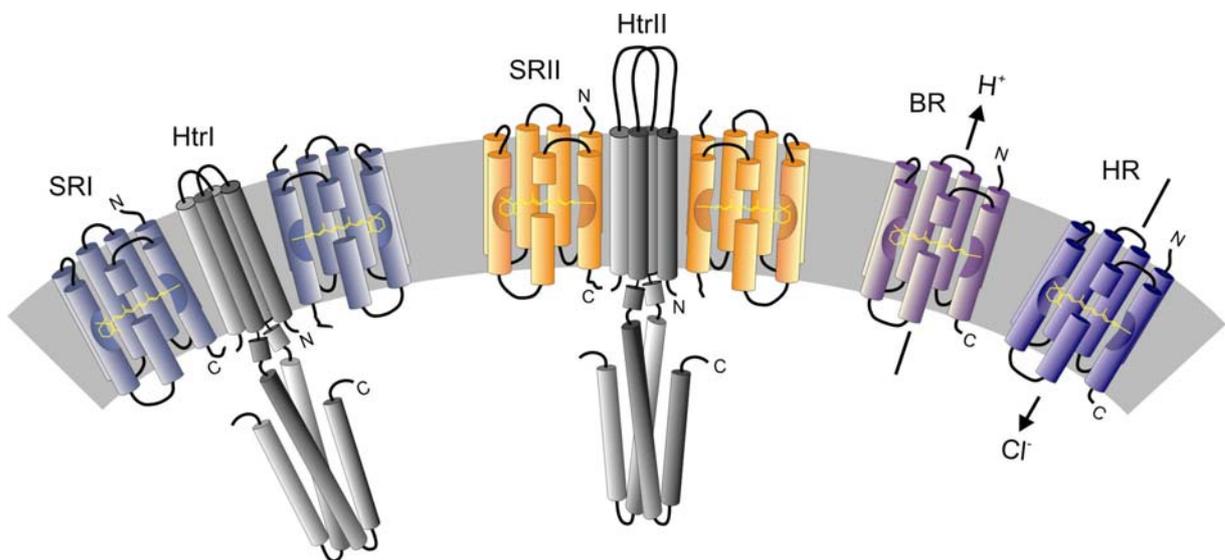


Abb. 2.1-4: Schematische Darstellung der vier archaebakteriellen Rhodopsine nach Klare (2003). Die sensorischen Rhodopsine SRI und SRII wurden nach Veröffentlichungen von Chen und Spudich, 2002 (SRI/HtrI) sowie Wegener et al. (2001) (SRII/HtrII) und Gordeliy *et al.* (2002) jeweils als 2:2 Komplexe zusammen mit ihren Transducern dargestellt. Das Zytoplasma ist in dieser Darstellung oben, der extrazelluläre Raum unten. Retinal als Chromophor der Proteine ist gelb eingezeichnet (siehe dazu Abb. 2.1-6).

Diese Lichtrezeptoren finden sich in allen drei Domänen des Lebens (Eukaryonten, Archaeobakterien und Eubakterien). Archaeobakterielle Rhodopsine zeigen die gleichen Strukturmerkmale die sich auch für eukaryontische Rhodopsine finden. Sieben transmembrane Helizes durchspannen die Membran und bilden eine Bindungstasche für das, kovalent über eine protonierte Schiff'sche Base (SB), an einen konservierten Lysin-Rest gebundene, Retinal-Chromophor. Eine Aktivierung dieser Pigmente erfolgt durch Lichteinstrahlung und führt zu einer zyklischen Reaktion, die Photozyklus genannt wird. Im Gegensatz zu Rhodopsinen aus höheren Organismen, die das G-Protein Transducin binden und darüber die Signalkaskade in Gang setzen, ist das archaebakterielle System etwas einfacher aufgebaut und somit für Untersuchungen viel leichter zugänglich. Aufgrund der Tatsache, dass sie statt auf chemische Substanzen auf experimentell einfach und präzise zu kontrollierendes Licht reagieren, könnten sie als Modell für die gesamte Klasse der transmembranen Sieben-Helix-Rezeptoren dienen, zu deren Mitgliedern

beispielsweise Hormon- und Neurotransmitter (Birnbaumer *et al.*, 1990), Geruchs- und Geschmacks-Sensoren (Buck und Axel, 1991) und nicht zuletzt auch Lichtrezeptoren (Hargrave und McDowell, 1992) gehören.

Yao und Spudich gelang es 1992 die codierende DNA-Sequenz eines Transducer-Proteins (HtrI) (Seidel *et al.*, 1995) zu identifizieren, das zwei transmembrane Helizes und eine umfangreiche zytoplasmatische Domäne aufwies (Abb. 2.1-4 und Abb. 2.1-8, A). Später konnte gezeigt werden, dass die offenen Leseraster (ORF's) von HsSRII (sensorisches Rhodopsin aus *H. salinarum*) und NpSRII (sensorisches Rhodopsin aus *N. pharaonis*) polycistronisch zusammen mit den entsprechenden Transducer-Proteinen in einem Operon vorliegen (Seidel *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996b).

Mittlerweile ist bekannt, dass die Rhodopsine einen 2:2 Komplex mit den entdeckten Transducer-Proteinen eingehen (Chen und Spudich (2002) für SRI/HtrI), was im Fall von NpSRII/NpHtrII 2000 durch ESR-Messungen ermittelt wurde ((Wegener, 2000; Wegener *et al.*, 2001b)) und 2002 durch die Röntgenstruktur des Komplexes bestätigt werden konnte (siehe Abb. 2.1-5) (Gordeliy *et al.*, 2002). Durch die sensorischen Rhodopsine (Yao und Spudich, 1992, Seidel *et al.*, 1995, Zhang *et al.*, 1996a) und den zugehörigen Transducern, sind die Archaeobakterien in der Lage sich in Richtung der Lichtverhältnisse zu bewegen, die für die Funktion der lichtgetriebenen Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) optimal sind (Hildebrand und Dencher, 1975; Marwan und Oesterhelt, 1990).

Das SRI des *H. salinarum* (HsSRI) ist im Komplex mit seinem Transducer (HsHtrI) verantwortlich für eine photophile Reaktion auf oranges Licht, sowie für eine photophobe Reaktion auf blau-grünes bzw. UV-Licht. SRII aus *H. salinarum* (HsSRII) und SRII aus *N. pharaonis* (NpSRII) vermitteln im Komplex mit den jeweiligen Transducern (HsHtrII, bzw. NpHtrII) die photophobe Reaktion auf blau-grünes Licht (Bogomolni und Spudich, 1982; Spudich und Bogomolni, 1984). Bemerkenswert ist die intrinsische Eigenschaft von SRII und SRI wie BR Protonen nach außen zu pumpen, die aber durch die Bindung der jeweiligen Transducer inhibiert wird (siehe dazu auch Abb. 2.1-10) (Schmies, 2000).

Der Photorezeptor aus *N. pharaonis* zeigt trotz der großen Ähnlichkeit gegenüber dem Rezeptor aus *H. salinarum* eine höhere Stabilität in Bezug auf pH-Wert- und Ionenstärke-Variationen. Besonderes Augenmerk wird daher dem Rezeptor und dem Transducer aus *N. pharaonis* gewidmet.

Für das sensorische Rhodopsin II (NpSRII) aus *N. pharaonis* alleine (Luecke *et al.*, 2001; Royant *et al.*, 2001) und im Komplex mit seinem Transducer (NpHtrII von AS 1-114) (Gordeliy *et al.*, 2002) sind Röntgenstrukturdaten vorhanden. Die folgende Abbildung zeigt das sensorische Rhodopsin NpSRII im Komplex mit seinem Transducer NpHtrII:

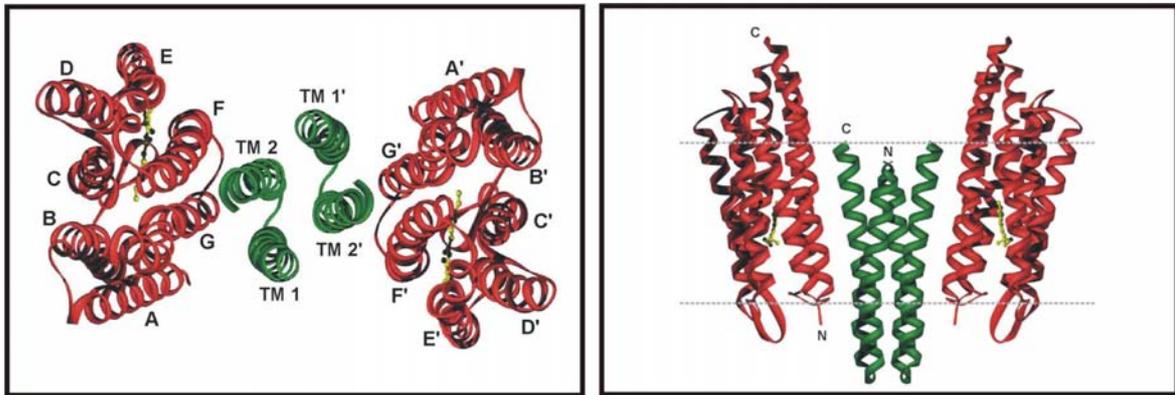
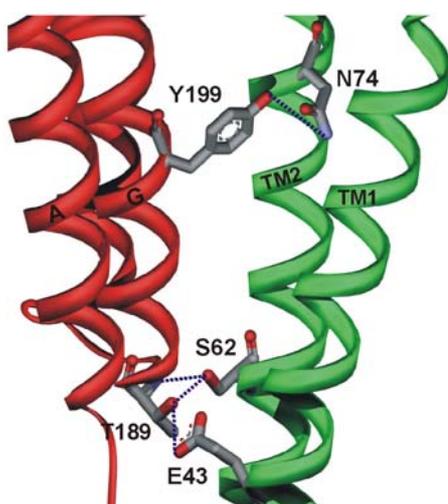


Abb. 2.1-5: Links: Kristallstruktur des 2:2 Komplex aus NpSRII (rot) mit dem Retinal-Chromophor (gelb) und NpHtrII₁₁₄ (grün) (Gordeliy *et al.*, 2002). Die Unterscheidung zwischen den beiden achsensymmetrischen 1:1 Komplexen erfolgt durch Hinzufügen eines Apostrophs (') zu den Bezeichnungen der hier rechts liegenden Einheit. Der Blick ist hier vom Zytoplasma auf den Komplex. Rechts: Seitenansicht der Kristallstruktur des Komplexes. Die zytoplasmatische Seite befindet sich in dieser Darstellung oben. Die grau gestrichelten Linien schließen die vorwiegend hydrophoben Bereiche der Proteine ein und sind nicht notwendigerweise identisch mit den Grenzen der Lipid-Doppelschicht. NpSRII: rot; NpHtrII: grün.

Die Struktur des NpSRII ist identisch mit der NpSRII-Struktur im Komplex, abgesehen von einer auffälligen Ausnahme die unten links gezeigt ist. Der aromatische Ring des Tyrosins in Position 199 der Helix G des Rezeptors verlässt seine ursprünglich Ausrichtung und dreht sich um etwa 90°, die Phenolgruppe geht dann eine



Wasserstoffbrückenbindung mit dem Stickstoff im Asparagin 74 der TM 2 des Transducers ein. Darüber hinaus bestehen nur zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Thr-189 in der F-G-Loop-Region des NpSRII und Glu-43 (TM 1), sowie Ser-62 (TM 2) des Transducers. Ansonsten wird die Kontaktfläche zwischen Rezeptor und Transducer hauptsächlich von van der Waals-Wechselwirkungen bestimmt. Durch diese Wechselwirkungen sind die Helizes G des Rezeptors und TM 2 des Transducers fest aneinander gekoppelt (Gordeliy *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zu den eukaryontischen Rhodopsinen, bei denen der Konformationswechsel des Chromophors von 11-*cis*- zu *all-trans*-Retinal erfolgt (siehe Abb. 2.1-6, rechts), wird beim Retinal archaebakterieller Rhodopsine ein Konformationswechsel von *all-trans*- zu 13-*cis*-Retinal beobachtet (siehe Abb. 2.1-6, links). Ein weiterer wesentlicher Unterschied besteht darin, dass bei den letztgenannten Pigmenten das Retinal nach der Lichtanregung nicht vom Protein dissoziiert. So kann eine zyklische Reaktion mit thermischer Reisomerisierung des Chromophors durchlaufen werden, ohne dass eine aktive Regenerierung des Pigmentes erfolgen muss.

bakterielle Rhodopsine

Rhodopsine

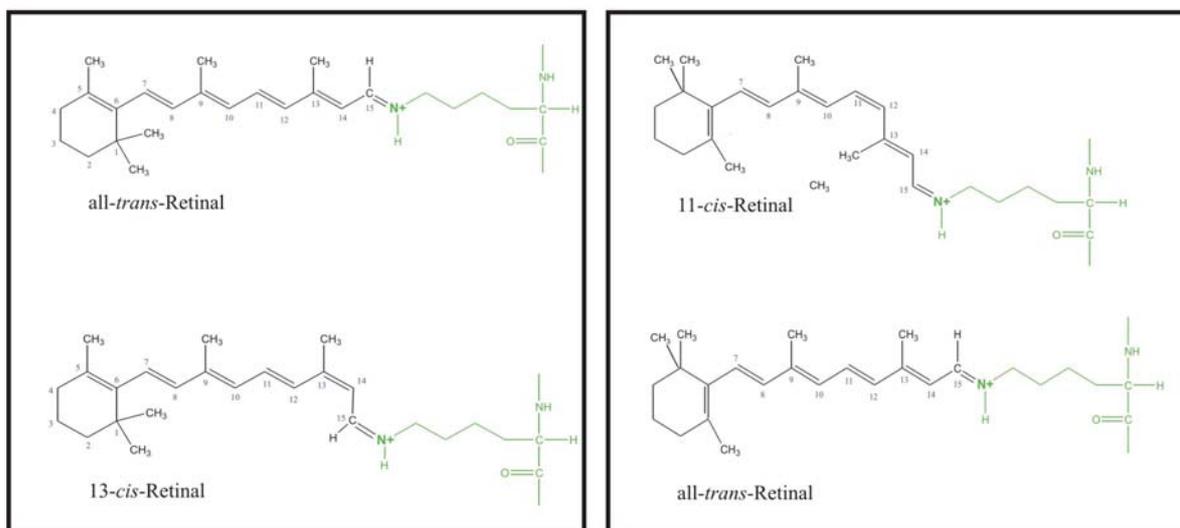


Abb. 2.1-6: Die lichtabsorbierende Gruppe der Rhodopsine ist Retinal, das über eine protonierte Schiff'sche Base mit einem spezifischen Lysinrest (grün) verknüpft ist. Links: Der Konformationswechsel von *all-trans*-Retinal zu 13-*cis*-Retinal in archaebakteriellen Rhodopsinen. Rechts: Der Konformationswechsel von 11-*cis*-Retinal zu *all-trans*-Retinal in eukaryontischen Rhodopsinen.

Diese, als Photozyklus bezeichnete, zyklische Reaktion konnte für den aus *N. pharaonis* isolierten photophoben Rezeptor NpSR II (Abb. 2.1-7), ebenso wie für den Rezeptor SRI (Bogomolni und Spudich, 1987; Spudich und Bogomolni, 1988), sowie für die verwandten Ionenpumpen BR (Chizhov *et al.*, 1996) und HR (Chizhov und Engelhard, 2001) untersucht werden (Chizhov *et al.*, 1998). Einer photochemischen Anregung mit Licht folgen eine Reihe von Photozyklus-Intermediaten, die sich spektroskopisch unterscheiden und daher analysieren lassen. Im Fall des in dieser Arbeit untersuchten NpSR II (in Analogie zum BR) lässt sich dieser Photozyklus nach heutiger Kenntnis wie folgt beschreiben (Abb. 2.1-7).

Die Absorption eines Photons führt zur *all-trans* \rightarrow *13-cis* Isomerisierung des Chromophors (NpSRII \rightarrow K). Auf diesen Prozess folgen innerhalb etwa einer Mikrosekunde Konformationsänderungen des Proteins (K \rightarrow L). Infolge dieser strukturellen Modifikation ändern sich die Protonenaffinitäten einiger Seitenketten und die Schiff'sche Base gibt ihr Proton an Asp-75 im extrazellulären Protonenkanal ab (korrespondierend zu Asp-85 im BR). Parallel dazu wird auf der extrazellulären Seite ein Proton an das Medium abgegeben (L \rightarrow M), woraufhin sich der zytoplasmatische Protonenkanal öffnet und die Schiff'sche Base reprotoniert wird (M \rightarrow N \rightarrow O; korrespondierende Aminosäure im BR ist Asp-96). Schließlich reisomerisiert das Retinal und das Protein relaxiert zurück in den Grundzustand (O \rightarrow NpSRII).

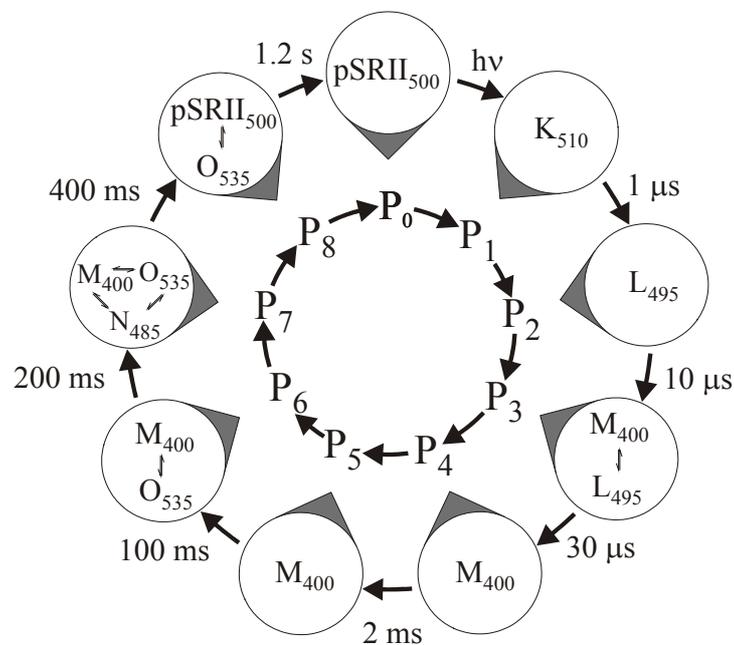


Abb. 2.1-7: Modell des Photozyklus von NpSRII nach Chizhov, 1998.

Die archaebakteriellen Transducer

Sequenzvergleiche der beschriebenen archaebakteriellen Transducer zeigen erhebliche Sequenz-Homologien zu den eubakteriellen Chemorezeptoren (MCP's), wie z.B. dem Aspartatrezeptor (Tar) oder dem Serinrezeptor (Tsr) aus *E. coli* auf (siehe Abb. 3.4-1). Diese lassen darauf schließen, dass diese beiden Klassen von Proteinen auch strukturell verwandt sind. Insbesondere für den zytoplasmatischen Bereich lässt sich eine auffällige Homologie der Htr's zu den MCP's feststellen (siehe Abb. 2.1-8).

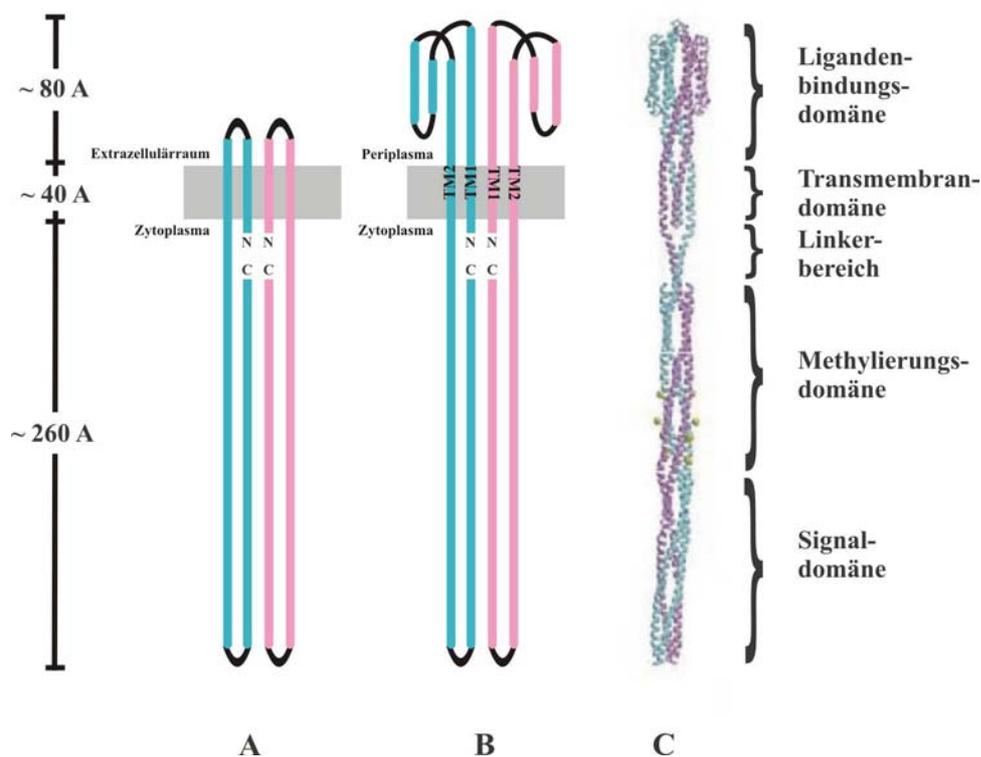


Abb. 2.1-8: Schema des Transducer-Proteins NpHtrII im Vergleich zum Serin-Rezeptor aus *E. coli*. A) NpHtrII-Schema des Dimers. B) Schema des Tsr-Dimers. C) Modell des Tsr-Rezeptor-Dimers nach einer Veröffentlichung von Kim (Kim *et al.*, 1999). Die gelb markierten Stellen stehen für die Methylierungsstellen des Rezeptors. Die einzelnen Bereiche werden entsprechend der Funktionalität unterteilt.

Obwohl über die genaue Signaltransduktionskaskade der Phototaxis wenig bekannt ist, gab die Methanolfreisetzung während einer Adaptation an einen vorhandenen Reiz, den Hinweis, dass die im Komplex mit den Photorezeptoren vorliegenden Transducer-Proteine auch hier analog zu den eubakteriellen Chemotaxisrezeptoren arbeiten (Schimz, 1981; Spudich *et al.*, 1988). Durch immunologische und molekularbiologische Untersuchungen an verschiedenen Proteinen beider Bakteriengruppen konnte diese Annahme mittlerweile bestätigt werden (Oesterhelt und Marwan, 1995). Rudolph und Oesterhelt zeigten durch einen genetischen knock out der für die Chemotaxis notwendigen (Che)-Proteine in

H. salinarum nicht nur einen Verlust der chemotaktischen Fähigkeiten, sondern auch eine fehlende Phototaxis (Rudolph und Oesterhelt, 1995; Rudolph und Oesterhelt, 1996). Diese Untersuchungen zeigen, dass eine dem eubakteriellen System analoge Zwei-Komponenten-Signalkaskade auch die Phototaxis der Archaeobakterien vermittelt.

Signaltransduktion im Zwei-Komponenten-System

Die Chemotaxis-Signalübertragung von *E. coli*, bzw. die Phototaxis-Signalübertragung der *Halobakterien*, erfolgt über das einleitend erwähnte Zwei-Komponenten-System (Abb. 2.1-9). Im vorliegenden Fall ist der zytoplasmatische Teil des transmembranen Chemo-rezeptors, bzw. Transducers über ein Bindeprotein (CheW, in der Grafik mit W abgekürzt) an eine zytoplasmatische Histidinkinase (CheA) gebunden. Die Bindung eines Schreckstoffes an den Chemotaxisrezeptor von *E. coli* oder die Aktivierung des photophoben Rezeptors in *Halobakterien* führt zu einer Aktivierung der Histidinkinase. Dabei erfolgt die Autophosphorylierung eines konservierten His-Rests unter Verwendung von ATP als Phosphatdonor. Vom Phospho-Histidin der aktivierten Kinase wird das Signal an zwei Regulator-Proteine (CheY und CheB) weitergegeben, indem der Phosphatrest auf einen konservierten Asp-Rest im Regulator übertragen wird.

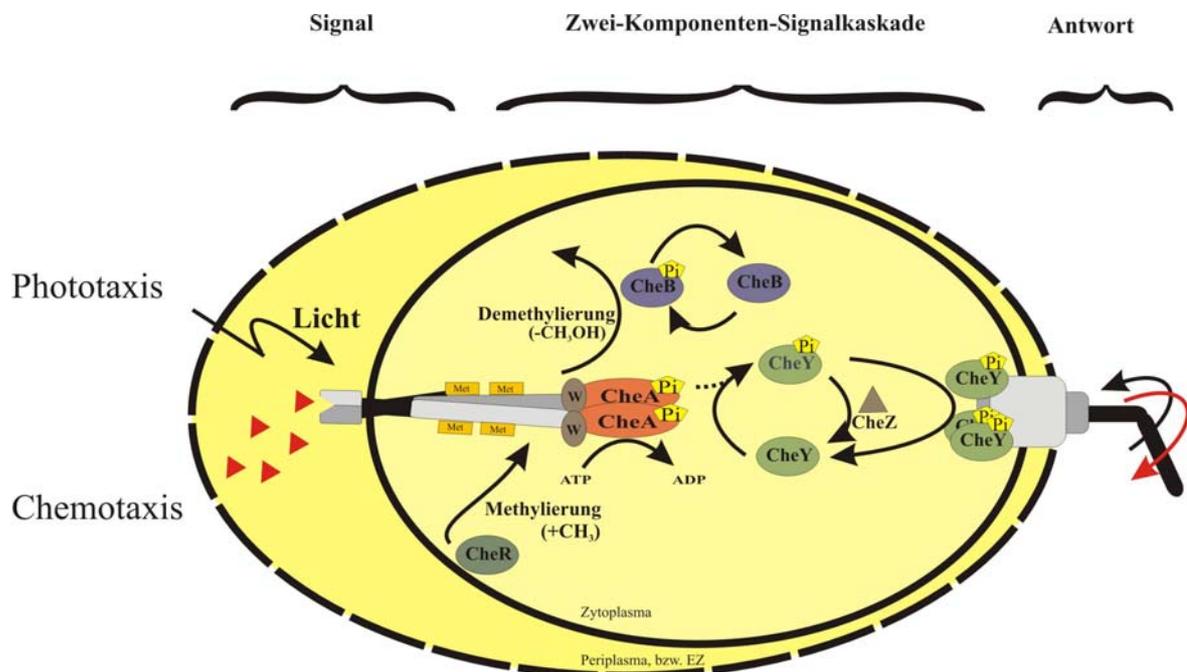


Abb. 2.1-9: Schematische Darstellung des Zwei-Komponenten-Systems der bakteriellen Chemotaxis, bzw. der archaebakteriellen Phototaxis. Die Aktivierung des Rezeptors, bzw. Transducers erfolgt durch Bindung eines Schreckstoffes, bzw. einen photophoben Lichtreiz im Photorezeptor. Die Histidinkinase CheA kann über das Brückenprotein CheW (W) binden, wobei CheA autophosphoryliert wird. CheA überträgt seinen kovalent gebundenen Phosphatrest auf CheY. Das entstandene CheY-Phosphat bindet an den Flagellenmotor und ändert seine Drehrichtung. Met steht für Methylierungsstelle.

Das phosphorylierte CheY-P interagiert daraufhin mit den Komponenten des Flagellenmotors (FliG, FliM, FliN) und induziert somit die Umkehr des Flagellenmotors (Scharf *et al.*, 1998b). Die zusätzlich von CheA-P phosphorylierte Methylesterase CheB ist für die Demethylierung des Rezeptors/Transducers verantwortlich. Die Bindung eines Lockstoffes an den Chemotaxisrezeptor, bzw. die Aktivierung eines photophoben Rezeptors, inhibiert die Autophosphorylierung der Histidinkinase CheA. Somit wird auch die Phosphorylierung von CheY unterdrückt, was eine geringere Besetzung an Bindungsstellen der Flagellenproteine zur Folge hat. Bei Eubakterien führt das zur Drehung des Motors gegen den Uhrzeigersinn, bei Archaeobakterien wird die vorhandene Drehrichtung umgekehrt. Weiterhin wird durch die fehlende Phosphorylierung der Methylesterase CheB die Demethylierung des Rezeptors/Transducers unterdrückt. Die Adaptation wird über eine negative Rückkopplung erreicht, indem die Demethylierung von CheB zu einer Herabsetzung der Autophosphorylierungs-Aktivität von CheA führt, während die Erhöhung des Methylierungsgrades die Autophosphorylierungs-Aktivität verstärkt. Die Methylierung wird konstitutiv von CheR ausgeführt, d.h. der Methylierungsgrad wird allein durch die zu- oder abnehmende Demethylierung bestimmt. Durch die Adaptation ist die Zelle sofort nach einem negativen oder positiven Reiz wieder in der Lage auf weitere Konzentrationsveränderungen zu reagieren.

Die Signaltransduktionskaskade der bakteriellen Chemotaxis ist bisher weit besser untersucht als die der Phototaxis in Archaeobakterien. In der bakteriellen Chemotaxis erfolgt die Adaptation durch die Methylierung und Demethylierung von Glutamatresten am Chemorezeptor. Eine Veränderung des Methylierungslevels des stimulierten Rezeptors hebt den Effekt der Ligandenbindung auf und versetzt den Flagellenmotor in seine Ausgangsposition. Ein positiver Reiz (Zugabe eines positiven Stimulus oder Wegnahme eines negativen Stimulus) verursacht eine Zunahme der Methylierung, während ein negativer Reiz eine Abnahme der Methylierung verursacht. Die Veränderung des Methylierungslevels der Chemorezeptoren von *E. coli* durch eine Stimulation, konnte in SDS-Gelelektrophoresen nachgewiesen werden. Das Migrationsverhalten der Proteine wird durch den Methylierungslevel beeinflusst (Boyd und Simon, 1980; Hazelbauer und Engstrom, 1989). Eine konservierte Sequenz (NWETF) konnte für die Aktivierung der Methylesterase CheB und der Methyltransferase CheR (Wu *et al.*, 1996) auf molekularer Ebene nachgewiesen werden. Mutanten denen dieses Pentapeptid fehlt zeigen eine ineffiziente Deamidierung/Methylierung/Demethylierung (Barnakov *et al.*, 1999). Die Aktivierung der Methyltransferase erfolgt hierbei durch eine hoch affine Bindungsstelle, die die Konzentration von CheR in der Nähe der Methylierungsstellen erhöht und somit eine Zunahme der Methylierung bewirkt (Wu *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu konnte ein völlig anderer Mechanismus für CheB festgestellt werden und zwar der einer allosterischen Verstärkung (Barnakov *et al.*, 1999). Das archaeobakterielle System zeigt viele

Gemeinsamkeiten im Vergleich zum eubakteriellen System. Die im eubakteriellen System gefundene Konsensussequenz der Methylierungsstellen (A/S;X;X;E;E;X;A/T/S;A;A/T/S) wurde auch in den archaebakteriellen Transducern gefunden. Für das sensorische Rhodopsin II aus *Halobacterium salinarum* konnte nach Stimulation mit Licht der Wellenlänge 500 nm (negativer Reiz) eine abnehmende Methylierung nachgewiesen werden, während bei Wegnahme des Lichtes (positiver Reiz) eine zunehmende Methylierung festgestellt wurde. Im Gegensatz dazu zeigte eine Stimulation von SRI kein nachweisbaren Unterschied im Methylierungslevel des Transducers HtrI (Perazzona und Spudich, 1999). Weiterhin stellten die Autoren fest, dass eine Mutation in den Methylierungssequenzen trotzdem zu einer Adaptation in Bezug auf Licht führte. Somit ist eine grundsätzliche Gemeinsamkeit in der Reaktion auf positive und negative Stimulanzen gegeben, der Mechanismus der Adaptation scheint allerdings zu variieren.

Für den Asparaginsäure-Rezeptor aus *E. coli* konnten Chervitz und Falke ein Modell erstellen, bei dem eine Kolbenhub-Bewegung des zytoplasmatischen Teiles für die Aktivierung der Histidinkinase CheA verantwortlich ist (Chervitz und Falke, 1996). Die Bindung von Asparaginsäure bewirkt eine Verschiebung der zweiten Transmembranhelix in Richtung Zytoplasma. Das die Aktivität der Histidinkinase durch strukturelle Änderungen im wechselwirkenden Bereich beeinflusst wird, lässt auch ein von Kim und Mitarbeitern postuliertes Modell am Serinrezeptor TSR vermuten. Hier wird vermutet, dass strukturelle Unterschiede in einem Lockstoff-gebundenen und einem Schreckstoff-gebundenen Rezeptor bestehen. Letzterer ist unflexibel, bzw. fester und vermutlich kann die Histidinkinase hier besser binden. Bindet ein Lockstoff, lockert sich die Struktur des Rezeptor und die Histidinkinase wird entweder inaktiv oder diffundiert ab (Kim *et al.*, 2002).

MCP-Moleküle sind nicht über die gesamte Membran verteilt, sondern in Gruppen (Cluster) angeordnet an den Polen zu finden (Maddock und Shapiro, 1993; Ames *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002). In diesen Clustern sitzen auch CheA und CheW, was vermuten lässt, dass die Rezeptoren in einem zweidimensionalen Gitter angeordnet sind, das über CheA und CheW zusammengehalten wird. Levit und Mitarbeiter konnten am Tsr-Rezeptor zeigen, dass die Proteine in Komplexen von 6 Tsr : 4 CheW : 1 CheA angeordnet sind (Levit *et al.*, 2002). Ohne die Bindung eines funktionellen Rezeptors ist die Autophosphorylierungsaktivität von CheA zu gering um die Schlagumkehr des Flagellenmotors zu bewirken (Ames *et al.*, 2002). Trotz einiger Sequenzanalysen (LeMoual und Koshland, Jr., 1996) und weiteren Strukturstudien (Butler und Falke, 1998) konnte der dem transmembranen Bereich folgende, sogenannte Linker-Bereich funktionell bislang nicht näher beschrieben werden.

Im Fall der archaebakteriellen Phototaxis stellte sich ebenfalls die Frage wie das Signal des Rezeptors über den Transducer in das Zytoplasma weitergeleitet wird. Durch zahlreiche biochemische und biophysikalische Untersuchungen konnten starke Wechselwirkungen der Photorezeptoren mit ihren Transducern nachgewiesen werden. So konnten für das SRI wesentliche Merkmale des Photozyklus durch die Bindung von HtrI beeinflusst werden (Spudich & Spudich, 1993). Weiterhin konnte dem Transducer HsHtrII ein Einfluss auf die Kinetik des Photozyklus des HsSRII zugewiesen werden (Sasaki und Spudich, 1998). Besonders bemerkenswert ist die Inhibierung der rudimentären Protonentranslokation des SRI durch das HtrI (Bogomolni *et al.*, 1994; Spudich, 1994), die auch für das NpSRII nachgewiesen werden konnte (Schmies, 2000; Sudo *et al.*, 2001b). Abb. 2.1-10 zeigt die Protonentranslokation, die durch Voltage-Clamp-Messungen am *Xenopus*-System gemessen wurde:

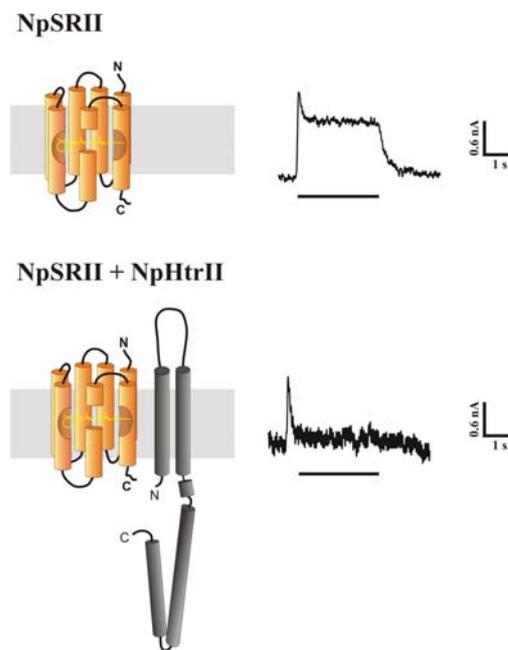


Abb. 2.1-10: Photostrom-Messungen der Rezeptors NpSRII (es handelt sich hier um die Mutante pSRII-F86D, mit der diese Messungen durchgeführt wurden) und des Rezeptor/Transducer-Komplexes (Schmies, 2000). Durch den gebundenen Transducer wird ein für den Rezeptor gemessener transienter Photostrom (siehe oben rechts) inhibiert (siehe unten rechts).

Hier wurde die intrinsische Protonenpumpaktivität des Rezeptors NpSRII durch die Bindung des kompletten Transducers NpHtrII inhibiert. Dabei führten auch verkürzte Fragmente, auf die in der Diskussion näher eingegangen wird, zu einer Inhibierung dieser Aktivität (Schmies, 2000).

Eine Verkürzung des HtrI in der zytoplasmatischen Domäne reicht aus um die photochemischen Eigenschaften des SRI in gleichem Maße wie durch den kompletten Transducer zu verändern (Perazzona *et al.*, 1996). Dieser Sequenzbereich beinhaltet einen hydrophilen Abschnitt von etwa 90 Aminosäuren, der für die Modulation der phototaktischen Reaktion von entscheidender Bedeutung ist (Jung und Spudich, 1996). Durch die photochemische und photophysiologische Untersuchung chimärer Htr-Moleküle im Komplex mit Sensor-Rhodopsinen konnte die Spezifität der Wechselwirkung den transmembranen Bereichen der Transducer zugeordnet werden (Zhang *et al.*, 1999). Gerade im Hinblick auf den transmembranen Signaltransfer der MCP's liegt es nahe zu vermuten, dass die Lichtrezeptoren eine Konformationsänderung in den transmembranen Helices der Phototransducer induzieren. ESR-Daten, die eine Auswärtsbewegung der Helix F des Rezeptors von *N. pharaonis* zeigen, bestätigen das. Weiterhin konnte ein Strukturmodell erstellt werden, das eine wahrscheinliche Anordnung der transmembranen Helices, analog zu den Dimeren bakterieller Chemorezeptoren postuliert (Wegener, 2000). Neuere ESR-Daten zeigen, dass die Ausklapp-Bewegung der Helix F synchron mit einer Schraubenbewegung der TM 2 einhergeht (Klare, 2002), was vermuten lässt, dass die Ausklapp-Bewegung die Schraubenbewegung induziert. Struktur-Daten des NpSRII/NpHtrII-Komplexes zeigen, dass zahlreiche Interkalationen zwischen hydrophoben Seitenketten einer reinen Kolbenhub-Bewegung, wie sie für die Chemorezeptoren postuliert wird, widersprechen (Gordeliy *et al.*, 2002).

In Bezug zur Chemotaxis wurde für die archaebakterielle Phototaxis von Klare eine Hypothese für den Mechanismus der Signalweiterleitung aufgestellt, bei der die durch das Ausklappen der Helix F induzierte Schraubenbewegung der TM 2 in der nachgeschalteten Linker-Domäne amplifiziert und so moduliert wird, dass die Dynamik des nachfolgenden Vier-Helix-Bündels herabgesetzt wird und somit die Phosphorylierungsaktivität von CheA erhöht wird (Klare, 2002). Trotz der vorhandenen Kristallstruktur konnten bisher keine Strukturangaben zum zytoplasmatischen Bereich des archaebakteriellen Transducers gemacht werden. Somit ist weiterhin unklar in welchem Bereich Rezeptor und die zytoplasmatische Domäne des Transducers miteinander wechselwirken und wie die Weiterleitung des Signals ins Zytoplasma erfolgt. Genauere Erkenntnisse auf diesem Gebiet würden nicht nur das Verstehen des phototaktischen Systems, sondern auch Rückschlüsse auf die Chemotaxis in Bakterien, wenn nicht sogar in eukaryontischen Zwei-Komponenten-Systemen, erlauben.

Zielsetzung

Auf Grundlage der Ergebnisse der Photostrom-Messungen von Schmies und aufbauend auf Ergebnissen von Wegener sollte in dieser Arbeit die Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers (RBD-T) bestimmt werden. Dazu sollten neben dem bereits von Wegener konstruierten Transducer NpHtrII₁₅₇ drei weitere verkürzte Transducer-Varianten kloniert und durch heterologe Expression in *E. coli* zugänglich gemacht werden. Anschließend sollte die Stabilität und Stöchiometrie des Rezeptors im Komplex mit den verschiedenen verkürzten Transducer-Proteinen genauer charakterisiert werden. Durch Bindungsstudien der vier verkürzten Transducer-Proteine und dem Rezeptor sollte die Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers bestimmt werden. Mit Hilfe von Blau-Nativer-Gelelektrophorese (BN-PAGE) und Isothermer-Titrations-Kalorimetrie (ITC) sollte nicht nur der Bindungszustand der verkürzten Transducer an den Rezeptor, sondern auch die Einflüsse der Ionenkonzentration und des pH-Wertes auf die Bindung analysiert werden.

Darüber hinaus sollten Fusionsproteine aus dem archaebakteriellen Transducer und dem eubakteriellen Aspartatrezeptor kloniert werden, die in einem Komplex mit dem Photorezeptor NpSRII Phototaxis in *E. coli* vermitteln. Die klonierten Fusionsproteine sollten dazu exprimiert, aufgereinigt und anschließend analysiert werden, um sie danach in einem entsprechenden *E. coli* (RP437) Stamm auf Funktionalität zu untersuchen. Somit stünde ein Modellsystem nicht nur für die bakterielle Chemotaxis, sondern auch für die Phototaxis zur Verfügung, das als Grundlage für zukünftige Mutationsstudien zu sehen wäre.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 40%	Roth
Agarose, niedrig schmelzend	Sigma
Agarose	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin, Kanamycin	Serva
Tetracyclin, Chloramphenicol	Serva
Bromphenolblau	Pharmacia
Chloroform	Baker
Coomassie Brilliant Blue G-250 + R-250	Serva
DEAE Sepharose CL-6B	Amersham Pharmacia
Desoxynukleotide	Boehringer
Didesoxynukleotide	Boehringer
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
EDTA (Tritriplex III)	Gerbu
Essigsäure	Roth
Ethidiumbromid	Serva
Filterpapier	Whatman
Glycerin	Gerbu
Harnstoff	Baker
Hefeextrakt	Difco
Imidazol	Merck
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	ICN
Ni-NTA-Sephadex-Superflow,	Quiagen
Pepton 140, Trypton	Merck
Phenol	Roth
Polyethylenglykol 8000 (PEG)	Sigma
PVDF-Membran	Bio-Rad
Radioaktiv markierte Aminosäuren	ICN
Röntgenfilme	Kodak
Szintillationslösung „ready Protein“	Beckmann
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Trihydroxymethylaminomethan (TRIS)	Gibco-BRL
Trichloressigsäure	Serva

2.2 Enzyme

DNase I	Roche
Kälberdarm-Phosphatase (Calf Intestinal Phosphatase)	New England Biolabs
RNaseA	Boehringer
T4 DNA-Ligase	Gibco-BRL
T4 DNA-Polymerase	New England Biolabs
T7 Polymerase	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, New England Biolabs, Pharmacia, MBI Fermentas

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte ausschließlich mit dem Expand High Fidelity PCR-System von Boehringer (Mannheim).

2.3 Instrumentation

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen wurde durch Elektroporation mittels eines GenePulsers der Firma BioRad (München) in Elektroporationsküvetten (2mm) der Firma Invitrogen (Leek) durchgeführt.

Sedimentationen erfolgten in den Zentrifugen RC28S und RC5B der Firma Sorvall (Bad Homburg) in den Rotoren SS-34, F-28/36 sowie GS3, sowie in der Zentrifuge L8-70 der Firma Beckmann in den Rotoren Ti-70 und Ti-45.

Zellaufschlüsse wurden mit einem Microfluidizer M-110S der Firma Microfluidics Corp. (Newton) durchgeführt.

Polymerase-Kettenreaktionen wurden in den Thermocyclern PCR-Express und PCR-Sprint der Firma Hybaid (Heidelberg) durchgeführt.

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem Sequenzierungsgerät 373 von Applied Biosystems oder von der Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt.

UV/VIS-Spektren wurden mit den Spektrometern Lambda 9 von Perkin-Elmer sowie DU-650 von Beckmann aufgenommen.

Polyacrylamid-Elektrophoresen erfolgten mit den Mini-PROTEAN II-System der Firma Biorad.

Phototaxismessungen wurden mit dem Mikroskop Orthoplan der Firma Leitz durchgeführt.

2.4 Bakterienstämme und Plasmide

Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 α F'	<i>F'</i> , (\emptyset 80 <i>dlacZDM15</i>) <i>D(lacZYA-argF)</i> U169 <i>deoR recA1⁻ endA1⁻ hsdR17 r_k⁻ m_k⁺ supE44 l⁻ gyrA96 thi⁻ relA1⁻</i> (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)
<i>E. coli</i> XL-I Blue	<i>F'</i> :: <i>Tn 10 proA⁺ B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(NaI^r) thi hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1 lac</i> (Bullock <i>et al.</i> , 1987)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F ompT [lon] hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3)</i> (Studier und Moffatt, 1986)
<i>E. coli</i> RP437	Wildtyp für Chemotaxis <i>thr(Am)-1 leuB6 tonA31 lacY1 tsx-78 sup0 eda50 his-4 rfbD1 mgl-51 rpsL136 xyl-5 mtl-1 metF(Am)159 thi-1 ara-14</i> (Scharf <i>et al.</i> , 1998a)
<i>Natronobakterium pharaonis</i> SP1/28	<i>HR⁽⁺⁾, sR-II⁽⁺⁾, Car⁽⁺⁾</i> (Bivin und Stoeckenius, 1986)

Anzucht der Stämme

Die Anzucht der *E. coli* Stämme DH5 α F', XL-I Blue und BL21(DE3) erfolgte in LB-Medium (10 g Pepton (140)-Hydrolysat, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl ad 1000 ml, pH 7,4) oder 2 TY-Medium (16 g Pepton (140)-Hydrolysat, 10 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl ad 1000 ml, pH 7,4) in 5 ml Reagenzgläsern oder 25-5000 ml Erlenmeyer-Kolben mit Schikane (Volumenverhältnis Kultur : Kolben = 1:3 – 1:4) bei 37°C und 150 Upm in einem Schüttler der Firma New Brunswick (Nürtingen). Zur Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren, soweit nicht anders angegeben, das Antibiotikum Kanamycin (Gerbo) mit einer Konzentration von 50 μ g/ml zugesetzt. Die Zellteilung wurde durch Trübungsmessung bei 578 nm (1 OD_{578nm} \approx 2 \times 10⁸ Zellen/ml) verfolgt. Die Anzucht größerer Mengen *E. coli* Zellen erfolgte in den Fermentern Biostat B (10 Liter) bzw. Biostat C (30 Liter) der Firma Braun Biotech GmbH (Melsungen). Für eine NpSR^{II}-Expression wurde dem Medium während der Expression 10 μ M *all-trans*-Retinal aus ethanolischer Stammlösung zugegeben.

Die Anzucht des *E. coli* Stammes RP437 erfolgte in Trypton Medium (10g Trypton, 5g Hefe-Extrakt ad 1000 ml, pH 7,4) in 5 ml Reagenzgläsern oder 25-100 ml Erlenmeyer-Kolben mit oder ohne Schikane (Volumenverhältnis Kultur : Kolben = 1:3 – 1:4) bei 30°C und 130 Upm. Die Antibiotika wurden wie oben beschrieben zugegeben, entweder Ampicillin (100 μ g/ml, Gerbo) und Tetracyclin (25 μ g/ml, Gerbo) oder Ampicillin (100 μ g/ml, Gerbo) und Chloramphenicol (30 μ g/ml, Gerbo). Die Bestimmung der OD erfolgte wie oben beschrieben.

Natronobakterium pharaonis wurde in einem Schüttler der Firma Braun Biotech GmbH in 25-100 ml Erlenmeyer-Kolben ohne Schikane (Volumenverhältnis Kultur : Kolben = 1:3 – 1:4) bei 40°C, 100 Upm und unter orangefarbenem Licht in synthetischem Minimalmedium (siehe Tabelle 2.4-1) herangezogen.

Tabelle 2.4-1: Synthetisches Minimalmedium zur Anzucht von *Natronobakterium pharaonis*

Substanz	Endkonzentration	Substanz	Endkonzentration
NaCl	3,4M	L-Glutaminsäure Na-Salz	24 mM
Na ₂ CO ₃	175mM	L-Alanin	0,4 mM
MgSO ₄ x 7H ₂ O	4 mM	L-Asparaginsäure	0,4 mM
KCL	27 mM	L-Isoleucin	0,4 mM
Trinatriumcitrat	10 mM	L-Prolin	0,4 mM
Natriumacetat	100 mM	L-Serin	0,4 mM
NaH ₂ PO ₄	2 mM	L-Threonin	0,4 mM
Na ₂ HPO ₄	2 mM	L-Tyrosin	0,4 mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	5 µM	L-Valin	0,4 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3 µM	L-Arginin	0,4 mM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	3 µM	Glycin	0,8 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	4 µM	L-Methionin	0,4 mM
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	4 µM	Thiamin	15 µM
L-Cystein	2,9 mM	Folsäure	15 µM
L- Leucin	3,8 mM	Biotin	2 µM

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem entsprechenden Medium 1,5% Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt. Zur Selektion von hoch motilen Bakterien wurden sogenannte Schwarmplatten mit Softagar (0,3% Agar im Medium) angesetzt.

Ausgangsplasmide

pET27b(+)	Novagen
pET27bmod	(Klostermeier <i>et al.</i> , 1998)
pTrc99A	Pharmacia
pACYC184	New England Biolabs
pET27bmod-npsopII-His	Von A. Wegener (MPI-Dortmund) zur Verfügung gestellt
pET27bmod-nphtrII ₁₅₇ -His	Von A. Wegener (MPI-Dortmund) zur Verfügung gestellt
pET27bmod-nphtrII ₁₁₄ -His	Von A. Wegener (MPI-Dortmund) zur Verfügung gestellt
pDV4	(Scharf <i>et al.</i> , 1998b)

Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide**Beschreibung**

pET27bmod-SH-ΔNpSRII-His	pET27bmod-npsopII-His <i>NcoI/EcoRI</i> geschnitten. Das 5347bp Fragment wurde zur Konstruktion der zwei folgenden Plasmide genutzt.
pET27bmod-SH-NpHtrII ₁₀₁ -His	C-terminale Verkürzung des NpHtrII. In einem PCR-Ansatz wurde das 306bp Fragment gewonnen und durch eingeführte Schnittstellen <i>NcoI/EcoRI</i> in den Vektor pET27bmod-SH-ΔnpSRII-His kloniert. Aminosäuresequenz: MALNV_____SRMG ¹⁰¹ NSHHHHHHH
pET27bmod-SH-NpHtrII ₈₂ -His	C-terminale Verkürzung des NpHtrII. In einem PCR-Ansatz wurde das 246bp Fragment gewonnen und durch eingeführte Schnittstellen <i>NcoI/EcoRI</i> in den Vektor pET27bmod-SH-ΔnpSRII-His kloniert. Aminosäuresequenz: MALNV_____AATL ⁸² NSHHHHHHH
pSM_NpSRII	Das 750bp <i>NcoI/HindIII</i> -Fragment des Vektors pET27bmod-npsopII-His wurde in den <i>NcoI/HindIII</i> geschnittenen Vektor pTrc99A kloniert.
pSM_CT_pTrcNpSRII_a	Das 3,3Kb <i>TatI</i> -Fragment des Vektors pSM_NpSRII wurde in den <i>TatI</i> -geschnittenen Vektor pACYC184 kloniert, Orientierung a.
pSM_CT_pTrcNpSRII_b	Das 3,3Kb <i>TatI</i> -Fragment des Vektors pSM_NpSRII wurde in den <i>TatI</i> -geschnittenen Vektor pACYC184 kloniert, Orientierung b.
pET27bmod-SH-Fus_123_254	C-terminale Fusion von NpHtrII-AS1-123 mit MCP2-AS254-553. In zwei parallelen PCR-Ansätzen wurde das 497bp große NpHtrII-Fragment von pET27bmod-nphtrII157-His und das 897bp große MCP2-Fragment von pDV4 gewonnen. Die Fragmente wurden durch eine dritte PCR fusioniert und in den Vektor pET27bmod kloniert.
pET27bmod-SH-Fus_102_233	C-terminale Fusion von NpHtrII-AS1-102 mit MCP2-AS233-553. In zwei parallelen PCR-Ansätzen wurde das 434bp große NpHtrII-Fragment von pET27bmod-nphtrII157-His und das 960bp große MCP2-Fragment von pDV4 gewonnen. Die Fragmente wurden durch eine dritte PCR fusioniert und in den Vektor pET27bmod kloniert.

pET27bmod-SH-Fus_116_247	C-terminale Fusion von NpHtrII-AS1-116 mit MCP2-AS247-553. In zwei parallelen PCR-Ansätzen wurde das 476bp große NpHtrII-Fragment von pET27bmod-nphtrII157-His und das 918bp große MCP2-Fragment von pDV4 gewonnen. Die Fragmente wurden durch eine dritte PCR fusioniert und durch eingeführte Schnittstellen NcoI/HindII in den Vektor pET27bmod kloniert.
pSM_Fus_HtrIIMCP2_102_233	Das 1,4Kb NcoI/HindIII-Fragment des Vektors pET27bmod-Fus_102_233 wurde in den NcoI/HindIII geschnittenen Vektor pTrc99A kloniert.
pSM_Fus_HtrIIMCP2_116_247	Das 1,4Kb NcoI/HindIII-Fragment des Vektors pET27bmod-Fus_116_247 wurde in den NcoI/HindIII geschnittenen Vektor pTrc99A kloniert.
pSM_Fus_HtrIIMCP2_123_254	Das 1,4Kb NcoI/HindIII-Fragment des Vektors pET27bmod-Fus_123_254 wurde in den NcoI/HindIII geschnittenen Vektor pTrc99A kloniert.

2.5 Synthetische Oligonukleotide

Alle im Folgenden aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Göttingen) bezogen.

<u>Oligo</u>	<u>Sequenz (5'→3')</u>	<u>Verwendung</u>
T ₇ -prom primer	TAATACGACTCACTATA GGG	Kontrolle der durch PCR amplifizierten Fragmente durch Sequenzierung
T ₇ -term primer	GCTAGTTATTGCTCAGC GG	Kontrolle der durch PCR amplifizierten Fragmente durch Sequenzierung
PrimAS60NpHtrII	TACAGGAGGCGGCAGT AT	Kontrolle der durch PCR amplifizierten Fusionsfragmente durch Sequenzierung
5-NcHtrII	ACACCCCATGGCGCTGA ACG	Konstruktion aller verkürzten Transducer
tTr101Ec	CGAGGTCGGAATTCCCC ATCCGCG	Konstruktion des verkürzten Transducers NpHtrII ₁₀₂ His
tTr82Ec	CGGTGTCAGAATTCAGC GTGGCAG	Konstruktion des verkürzten Transducers NpHtrII ₈₂ His
HtrtarStopHindIIIr	AGTAAAAGCTTATCAAA ATGTTTCCCA	Zur Amplifikation alle MCP2-Konstrukte und anschließender Fusion mit den jeweiligen NpHtrII-Konstrukten

MCP2-247-f-neu	GCTTGAGACCCGTCGCG AGGACGAAATGGGCGA CCTGGCGCAGAGCGTTT	Zur Amplifikation des MCP2 ₂₄₇ -Fragments und anschließender C-terminaler Fusion von NpHtrII ₁₁₆ mit MCP2 ₂₄₇
HtrII-116-r-neu	AAACGCTCTGCGCCAG GTCGCCCATTTTCGTCCTCG CGACGGGTCTCAAGC	Zur Amplifikation des NpHtrII ₁₁₆ -Fragments und anschließender C-terminaler Fusion von NpHtrII ₁₁₆ mit MCP2 ₂₄₇
SHmcpII233f	CCTCGCGGATGGGCGA CGGTAACCTGGCAATA CC	Zur Amplifikation des MCP2 ₂₃₃ -Fragments und anschließender C-terminaler Fusion von NpHtrII ₁₀₂ mit MCP2 ₂₃₃
SHhtrII102r	GGTATTCGCCAGGTTAC CGTCGCCCATCCGCGAGG	Zur Amplifikation des NpHtrII ₁₀₂ -Fragments und anschließender C-terminaler Fusion von NpHtrII ₁₀₂ mit MCP2 ₂₃₃
SHhtrII123r	GCGTTGCATATGTGAAA CGGCCGCATAGAGGTCC	Zur Amplifikation des NpHtrII ₁₂₃ -Fragments und anschließender C-terminaler Fusion von NpHtrII ₁₂₃ mit MCP2 ₂₅₄
SHmcpII254f	CGACTATGCGGCCGTT TCACATATGCA ACG	Zur Amplifikation des MCP2 ²⁵⁴ -Fragments und anschließender C-terminaler Fusion von NpHtrII ¹²³ mit MCP2 ²⁵⁴

2.6 Antikörper

Anti-NpHtrII	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die Aminosäuren 77-149 des Transducers NpHtrII (Wegener, 2000)
Anti-Kaninchen IgG POD-Konjugat	Sekundär-Antikörper aus Ziege gekoppelt mit Peroxidase gegen Kaninchen (Boehringer)

2.7 Größenstandards

Der verwendete Protein-Molekulargewichtsmarker (Pharmacia) setzte sich aus den Proteinen Phosphorylase b (97 kDa) Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa) Carboanhydrase (30 kDa) Trypsininhibitor (20 kDa) und Lactalbumin (14,4 kDa) zusammen. Wenn nach der Gelelektrophorese ein Western Blot durchgeführt werden sollte, wurde ein Prestained Protein Marker der Firma New England Biolabs verwendet, der sich aus den Proteinen MBP- β -galactosidase (175 kDa), MBP-paramyosin (83kDa), Glutamic dehydrogenase (62kDa), Aldolase (47,5 kDa), Triosephosphatisomerase (32 kDa), β -Lactoglobulin A (25 kDa), Lysozyme (16,5 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) zusammensetzte. Der verwendete 1kb DNA-Standard stammte von der Firma Gibco-BRL.

2.8 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders erwähnt, wurden molekulargenetische Methoden nach Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel (1987) angewendet.

2.8.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente mit einer Größe von 0,2-20 kb wurden in 0,8-1,2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1xTAE-Puffer (40mM Tris, 40mM Essigsäure, 2mM EDTA) oder 1x TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,9 mM EDTA, pH 8,9) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 0,6 µg/ml Ethidiumbromid zu der noch heißen Agarose und durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht.

2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach alkalischer Lyse der *E. coli* Zellen nach Birnboim und Doly (1979). Nach dem Resuspendieren in Lösung I (s.u.) werden die Bakterien mit Hilfe der Lösung II (s.u.) lysiert. Durch den stark alkalischen pH-Wert denaturiert die Bakterien-DNA und nach Neutralisation mit Lösung III (s.u.) kommt es dann selektiv nur zur Renaturierung kleiner DNA-Fragmente, wie z.B. Plasmiden. Die chromosomale DNA fällt in Form eines unlöslichen Aggregats aus und kann zusammen mit den mit SDS beladenen Proteinen, die als Kaliumsalze ausfallen, abzentrifugiert werden. Der aus der Zentrifugation gewonnene Überstand enthält die Plasmid-DNA sowie rRNA und mRNA. Für die Präparation von Plasmid-DNA in kleinerem Maßstab (Mini-Präparation) wurde der gewonnene Überstand nach Methode 2.8.6 mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend in 30-50 µl RNA'se A haltigem TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, 20 µg/ml RNase A) aufgenommen.

Lösung I

25 mM Tris/HCl pH 7,9

10 mM EDTA pH 7,9

50 mM Glucose

Lysozym

Lösung II

200 mM NaOH

1% SDS

Lösung III

5 M KOAc

11,5% HOAc

Die Isolierung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab (100 ml oder 500 ml) erfolgte durch Anwendung von Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen (Qia-Tip-20 und Qia-Tip-100) nach Angaben des Herstellers. Abweichend von diesem Protokoll wird vor

dem Auftrag des Lysates auf die Säulen ein RNase A-Verdau (20 µg/ml, 1 h bei 37°C) mit anschließender Zentrifugation (20 min, 10.000 × g) durchgeführt.

2.8.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366nm) ausgeschnitten und unter Verwendung des „Gel-Extraction-Kit“ der Firma Qiagen entsprechend dem Protokoll des Herstellers extrahiert.

2.8.4 DNA-Präparation von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des „PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.8.5 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bei 260nm in einem Biophotometer der Firma Eppendorf bestimmt. Bei einer gereinigten DNA-Präparation sollte der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} bei ca. 2,1 liegen. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht 50µg DNA pro ml.

2.8.6 Reinigung von DNA-Lösungen mittels Phenol/Chloroform Extraktion

Zur Reinigung von DNA-haltigen Lösungen wurde eine Phenol-/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit einem Volumen Phenol und einem Volumen Chloroform versetzt. Nach Durchmischen der Lösungen und anschließender Zentrifugation für 2 min bei 10000 g wurde die wässrige Phase abgenommen und erneut mit Chloroform extrahiert. Darauf erfolgte die Ethanol-fällung. Dazu wurde die wässrige Phase mit 1/20 Volumen 5 M NaCl und dem zweieinhalbfachen Volumen Ethanol versetzt. Die abzentrifugierte DNA (10 min, 10000 g, 4°C) wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen.

2.8.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit dem „Expand High Fidelity PCR-System“ (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Jeder Ansatz bestand aus 5-20 ng Matrizen-DNA, je 25 nmol der vier dNTP's, je 30 pmol der entsprechenden Oligonukleotide und 5 µl 10x Puffer.

Alle Reaktionen wurden nach der „Hot-start“-Methode durchgeführt bei der den Syntheszyklen eine Denaturierungsphase von 5 min vorgeschaltet war, bevor die Amplifizierung durch Zugabe von 3 U der Polymerase gestartet wurde. Falls keine gesonderten Angaben gemacht werden, wurden danach folgende PCR-Bedingungen gewählt:

Denaturierung:	15s bei 96°C
Hybridisierung:	30s bei $T_m - 5^\circ\text{C}$
Elongation:	75s bei 72°C

Die für den Hybridisierungsschritt maßgebliche Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide berechnete sich nach Wallace *et al.* (1981). $T_{m\text{red}}$ beschreibt dabei die Schmelztemperatur nach Berücksichtigung der Fehlpaarungen:

$$T_m = 4^\circ\text{C} \cdot \sum (n_G + n_C) + 2^\circ\text{C} \cdot \sum (n_A + n_T)$$

$$T_{m\text{red}} = T_m - \left(1,5^\circ\text{C} \cdot \frac{n_{\text{Fehlpaarungen}}}{n_{\text{Gesamt}}} \right)$$

In der Regel wurden 15-25 dieser Zyklen durchlaufen. Abschließend erfolgte ein weiterer Schritt von 2 min bei 72°C um die Elongation aller amplifizierten DNA-Fragmente zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Reaktionsprodukte im Agarosegel überprüft. Bei Bedarf erfolgte eine Präparation der Produkte entweder mittels Isolierung aus dem Agarosegel (in Abschnitt 2.8.3 beschrieben), oder durch direkte Behandlung des Reaktionsansatzes mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma QIAGEN (nach Anleitung des Herstellers).

2.8.8 Fusion von DNA-Fragmenten

Für eine Fusion von Genen oder DNA-Fragmenten wurden zunächst zwei getrennte PCR-Reaktionen durchgeführt. Beide PCR-Produkte enthielten ca. 15 bp lange Überhänge, die zu den jeweiligen Überhängen der Fusionspartner homolog waren. Die PCR-Produkte wurden gereinigt (vgl. Abschnitt 2.8.4) und in einer weiteren PCR-Reaktion als DNA-Vorlage eingesetzt. Die jeweiligen PCR-Bedingungen sind für den Einzelfall im Ergebnisteil angegeben. Im Anschluss wurden die Reaktionsprodukte im Agarosegel überprüft.

2.8.9 Restriktion von DNA

Sequenzspezifische Spaltungen der DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen mit 2-5 U Enzym pro μg Plasmid-DNA durchgeführt.

2.8.10 Modifikation von Plasmid-DNA durch T4-DNA-Polymerase

Um DNA-Fragmente miteinander ligieren zu können, die keine komplementären Enden besaßen, wurden diese mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase zu stumpfen Enden modifiziert. Die 5'→3' DNA-Polymeraseaktivität der T4 DNA-Polymerase füllt in Anwesenheit von Mg^{2+} überhängende 5'-Enden zu glatten Enden auf. Mit Hilfe der 3'→5' Exonukleaseaktivität können überhängende 3'-Enden abgebaut werden.

Die Reaktion erfolgte direkt im Restriktionsansatz in Anwesenheit von 400 nM dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und 1 Einheit T4 DNA-Polymerase pro pmol 3'- bzw. 5'- Enden, für 30 min bei 37°C. Zur Entfernung der dNTP's wurde der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA extrahiert (2.8.3).

2.8.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Wurde für die Klonierung geschnittene Vektor-DNA eingesetzt, die kompatible Enden enthielt, die bei der Ligation rezirkularisieren könnten, wurde zur Entfernung der 5'-Phosphatgruppe die DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm behandelt. Die Reaktion erfolgte direkt im Restriktionsansatz unter Zugabe von 1/10 Volumen 10 x Puffer und einer Einheit Phosphatase pro pmol 5'-Enden. Die Reaktion wurde nach einstündiger Inkubation bei 37 °C durch Zugabe von 1/10 Volumen 100 mM EDTA, und Inkubation bei 65 °C für 5 min gestoppt. Zur Reinigung schloss sich eine Phenol-/Chloroform-Extraktion mit Ethanol fällung an.

10 x alkalischer-Phosphatase-Puffer:	100 mM Tris-HCl pH 9,0
	100 mM NaCl
	50 mM MgCl_2

2.8.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Ansatz aus Vektor-DNA, 3 fachem molaren Überschuss Fragment-DNA und 5U T4-Ligase bei einem Gesamtvolumen von 20µl in Ligasepuffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5 % (w/v) PEG 8000, pH 7,6) . Der Ligationsansatz wurde für 16 h bei 16°C (überstehende Enden) oder bei Raumtemperatur (glatte Enden) inkubiert.

2.8.13 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen zur Elektroporation

1 l LB-Medium wurde mit 10ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,8 bei 37°C geschüttelt. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C mit vorgekühlten Gefäßen und Lösungen durchgeführt, um eine maximale Transformationsrate zu erreichen. Zur Sedimentation der Zellen wurde die gesamte Kultur zentrifugiert (GS3-Rotor, 7000 upm, 15 min, 4°C), und in 1L 5%iger Glycerinlösung (v/v) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 500 ml 5%iger Glycerinlösung resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 20 ml 5%iger Glycerinlösung aufgenommen. Nach Abschluss des letzten Zentrifugationsschrittes (Labofuge 800 g, 15 min) wurden die Zellen in 2 ml 10%igem (v/v) Glycerin resuspendiert, portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so gewonnenen Portionen konnten bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert werden. Die Transformationsrate wurde durch Transformation von 0,1 ng ungeschnittener Plasmid-DNA bestimmt und sollte größer als 10⁸ Zellen/µg DNA sein.

2.8.14 Transformation von *E.coli* durch Elektroporation

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte mittels Elektroporation mit Plasmid-DNA nach der Methode von Shigekawa und Dower (1988). Dazu wurden 10 ng Plasmid-DNA beziehungsweise 10 µl eines Ligationsansatzes (s.2.8.12) mit 10 µl H₂O verdünnt, mit 70 µl einer 10 %igen Glycerinsuspension kompetenter Zellen (OD₅₇₈ ≈ 100) vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die Transformation erfolgte mittels eines GenePulsers (BioRad, München) durch einen Puls von 1,5 kV, 800 Ω, 25 µF und einer Zeitkonstanten von 10 ± 2 s. Die transformierten Zellen werden in 1 ml 2TY-Medium aufgenommen, 1 h bei 37°C und 150 Upm geschüttelt und anschließend auf Antibiotikahaltigen 2TY- oder LB-Agar-Platten ausplattiert.

2.8.15 Glycerinkulturen zur Lagerung von Bakterienstämmen

Zur Lagerung von Bakterienstämmen wurde eine 2ml Bakterienkultur angeimpft und bis zu einer OD_{578nm} von 0,6 – 0,8 inkubiert. 700µl Bakterienkultur wurden dann zusammen mit 300µl 80%igem, sterilem Glycerin in ein Dauerkulturgefaß gegeben, gemischt und bei $-80^{\circ}C$ gelagert.

2.8.16 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde zunächst ein Cycle-Sequencing mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Dazu wurden in 20 µL Reaktionsvolumen 6 µL Big-Dye-Terminatormix (Applied Biosystems, ABI), 0,5 µg Plasmid-DNA, 10pmol Primer-Oligonukleotid sowie 2µL DMSO gemischt. Für die PCR-Reaktion wird der folgende Zyklus 25 mal durchlaufen:

$96^{\circ}C$ (10 s) \rightarrow $55^{\circ}C$ (5 s) \rightarrow $60^{\circ}C$ (4 min)

Die Reaktionsprodukte wurden anschließend nach Verdünnung ad 100 µL mit 500 mM Kaliumacetat pH = 4,6 durch Zugabe vom 2,5-fachen Volumen Ethanol gefällt und nach einem Waschschrift (70 %iger Ethanol) an der Luft getrocknet. Durch die Kopräzipitation von Dextran-Blau wurde die Probenbehandlung vereinfacht. Die elektrophoretische Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte an einem DNA-Sequencer Model 373 (ABI) oder wurde von der Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt. Die Analyse der Sequenzierungsergebnisse wird mit Programmen des GCG Sequence Analysis Software Package Version 9.0 durchgeführt.

2.9 Proteinchemische Methoden

2.9.1 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Für Expressionsversuche wurden, falls nicht anders angegeben, Transformanten des Stammes BL21(DE3) verwendet, da alle Expressionsplasmide unter der Kontrolle eines T₇-Promotors standen. Im allgemeinen wurde das Medium mit einer stationären Kultur inokuliert, so dass sich eine Zelldichte äquivalent zu OD₅₇₈ = 0,06 ergab. Nach Steigerung der Zelldichte auf entsprechend OD₅₇₈ = 0,6-1,0 wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Im Falle der NpSR_{II}-Expression und seiner Mutanten wurden zeitgleich ad 10 µM all-trans-Retinal aus ethanolischer Stammlösung (×1000) zugegeben. Die Zellernte erfolgte 2,5 h nach Induktion durch 15 minütige Zentrifugation bei 5000×g und 4°C.

Die Zellsedimente (2-3 g/L Kultur) wurden mit 1/50 Kulturvolumen Zellwaschpuffer (150 mM NaCl, 25 mM Natriumphosphat pH = 8, 2 mM EDTA) gewaschen. Die Zellpellets konnten in dieser Form bei -80°C gelagert, oder in 1/100 Kulturvolumen resuspendiert und direkt weiterverarbeitet werden.

2.9.2 Zellaufschluß und Präparation der Proteine

Die in Waschpuffer resuspendierten *E. coli* Zellen wurden mit Hilfe eines Microfluidizers (Microfluidics, Newton, Ma., USA) mechanisch aufgeschlossen. Das Zellysate wurde anschließend bei 100.000×g zentrifugiert (Ultrazentrifuge der Firma Beckmann, TI70-Rotor, 45.000Upm). Der Überstand enthielt alle zytoplasmatischen und periplasmatischen Komponenten, im Sediment wurden die Membrankomponenten angereichert. Um die erhaltenen Membranen zu solubilisieren, wurde das Sediment in 1/100 Kulturvolumen Puffer A_{mem} (s.u.) homogenisiert und über Nacht bei 4°C langsam gerührt (NpSR_{II} / Mutanten unter Lichtausschluss). Die ungelösten Bestandteile wurden durch erneute Zentrifugation bei 100.000×g abgetrennt. Der Überstand enthielt die solubilisierten Membranproteine.

Daraufhin wurde das Solubilisat im Gravitationsfluss auf eine zuvor in Puffer B_{mem} (s.u.) äquilibrierte Säule aus Nickel-NTA-Agarose (Typ Superflow, Qiagen) aufgetragen. Für eine vollständige Bindung des solubilisierten NpSR_{II}-His waren dabei 1-2 mL der Chromatographie-Matrix je Liter Kulturvolumen ausreichend. Die Abtrennung von unspezifisch an die Nickel-Affinitätsmatrix gebundenen Verunreinigungen erfolgte durch einen Waschschriff mit 5-10 Säulenvolumina Puffer C_{mem} (s.u.) woran sich die Elution mittels Puffer D_{mem} (s.u.) anschloss.

Zur Abtrennung des Imidazols wurde daraufhin eine DEAE-Chromatographie durchgeführt, bei der durch Verdünnen mit Puffer E_{mem} die Salzkonzentration unter 30 mM gesenkt und das verdünnte Eluat auf eine mit etwa 3 Säulenvolumina Puffer E_{mem} äquilibrierte DEAE-Sepharose-Säule aufgetragen wurde. Anschließend wird mit 5 – 7 Säulenvolumina Puffer F_{mem} NpSRII bzw. F_{mem} NpHtrII gewaschen und schließlich das Protein mit Puffer G_{mem} eluiert. Durch diese Vorgehensweise konnten die Proteine in relativ hoher Konzentration von bis zu 3mg/ml bei niedrigem DDM-Gehalt von 0,1% erhalten werden.

Puffer:

A_{mem}	300 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat pH = 8, 2% DDM
B_{mem}	wie A_{mem} , aber 0,05% DDM
C_{mem}	wie B_{mem} + 40 mM Imidazol
D_{mem}	wie B_{mem} + 200 mM Imidazol
E_{mem}	10 mM Tris pH = 8, 0,05% DDM
F_{mem} NpSRII	100 mM NaCl, 10 mM Tris pH = 8, 0,1% DDM
F_{mem} NpHtrII	30 mM NaCl, 10 mM Tris pH = 8, 0,1% DDM
G_{mem}	500 mM NaCl, 10 mM Tris pH = 8, 0,1% DDM

2.9.3 Isolierung polarer Lipide aus *H. salinarum*

Das angewendete Protokoll orientiert sich an einer Vorschrift von Kates *et al.* (1982). Dabei wurde statt ganzer Zellen nur die aufgereinigte Purpurmembran verwendet. Die Purpurmembranen (Bakteriorhodopsingehalt = 300-350 mg) wurden in 200 ml 4 M NaCl resuspendiert. Nach Zugabe von 500 ml Methanol und 250 ml Chloroform wurde über Nacht unter Stickstoffatmosphäre und unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Die Suspension wurde 15 min bei $3.800 \times g$ in Metallröhrchen zentrifugiert. Die gelben Überstände wurden gesammelt (unter Stickstoffatmosphäre und unter Lichtausschluss). Die Pellets wurden nochmals mit o.g. Methode extrahiert und die Suspension erneut zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden über ein 2 h in Methanol/Chloroform = 1:1 eingeweichtes Filterpapier (Whatman No. 1) abfiltriert. Es wurden 500 ml H_2O und 500 ml Chloroform zugegeben und geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte im Dunkeln über Nacht. Die Chloroformphase wurde abgetrennt und unter Lichtausschluss am Rotationsverdampfer bei 30°C bis zur Trockne eingedampft. Danach wurde der Rückstand in 12 ml Chloroform aufgenommen und diese Lösung 30 min bei $24.000 \times g$ bei 0°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft und der erhaltene Rückstand wurde in 45 ml Aceton bei 0°C im Ultraschallbad resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml einer methanolischen Lösung von 10 % $MgCl_2$ wurde bei $1000 \times g$ (0°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das

Sediment mehrfach mit 10 ml Aceton extrahiert, bis der Überstand farblos blieb. Der im Ölpumpenvakuum getrocknete Rückstand wurde dann gewogen und in einer Konzentration von etwa 40 mg/ml Methanol/Chloroform = 1:1 gelöst. Diese Lösung wurde durch eine feine Kanüle in einen 20-fachen Volumenüberschuss wässriger Lösung von 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0, unter Argon und Lichtausschluss eingespritzt. Die Suspension wurde im Ultraschallbad homogenisiert und im Anschluss lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit dem ursprünglichen Volumen Wasser versetzt, worauf sich spontan eine stabile Suspension ausbildete, die aliquotiert bei -80°C gelagert werden konnte.

2.9.4 Durchflussmessungen der induzierten (H^3)-Methanolproduktion

Die (H^3)-Methanolproduktion wurde in einem Durchflusseexperiment nach Kehry *et al.* (1984) mit einigen Änderungen bestimmt. Dazu wurden *E.coli* RP437-Zellen bei 30 °C und 130 upm bis zu einer $OD_{578nm} = 0,6-0,7$ inkubiert. 10 ml Zellsuspension wurde zentrifugiert und in Puffer A gewaschen. Das Pellet wurde in 1,5 ml Puffer B resuspendiert und nach Zugabe von 120 μ Ci (H^3)-Methionin 40 Minuten bei 30°C im Wasserbad geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und in 1 ml Puffer C (enthält nicht markiertes Met) aufgenommen. Die so behandelten Zellen wurden über eine Pumpe auf einen, mit Puffer A gespülten, Filter (0,2 μ m, Firma Gelman) aufgetragen. Die Flussrate wurde auf 0,5 ml pro Minute festgelegt. Nach achtminütigem Waschen des Filters mit Puffer C wurden 0,5 ml Fraktionen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Fraktionssammler der Firma BioRad gesammelt. Nach 12, 28 und 42 Minuten wurde der Puffer C jeweils für 8 Minuten durch Puffer D ersetzt (für die Kontrollen) oder statt Puffer D wurde zusätzlich mit Licht der Wellenlänge 500 nm bestrahlt (für die Chimären und *N. pharaonis*). Die einzelnen Reaktionsgefäße wurden in ein Scintillationsgefäß mit 4 ml Scintillationsflüssigkeit gestellt und über Nacht bei 35°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Radioaktivität gemessen und graphisch gegen die Zeit dargestellt.

Puffer A: 10mM Tris/HCl pH 7,4

Puffer B: 10mM Tris/HCl pH 7,4, 50mM Na-Succinat

Puffer C : 10mM Tris/HCl pH 7,4, 50mM Na-Succinat, 100 μ M Met.

Puffer D : 10mM Tris/HCl pH 7,4, 50mM Na-Succinat, 100 μ M Met., 20 μ M Ser.

2.10 Analytische Methoden

2.10.1 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese

Proteine wurden durch eine diskontinuierliche Gelelektrophorese in SDS-Polyacrylamid-Gelen nach der Methode von Schägger und von Jagow (1987) analysiert. Hierbei findet nach Anlegen einer Spannung eine Fokussierung der Proteine im Sammelgel statt, die eigentliche Trennung der Proteine entsprechend ihrem apparenten Molekulargewicht erfolgt innerhalb des Trenngels. Die Elektrophorese erfolgte in Minigelkammern der Firma BioRad (Mini-PROTEAN II Cell). Zur Darstellung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 20 kDa bis 100 kDa wurden 4%ige Sammelgele und 12 %ige Trenngele verwendet. Zur Größenabschätzung der Proteinbanden wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsstandard mit auf das Gel aufgetragen. Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, auf ein Aufkochen wurde speziell bei Membranproteinen verzichtet, um unspezifische Aggregationen zu vermeiden. Im Falle der Expressionskontrollen behandelte man die Mischungen aus Zellsuspension mit Probenpuffer vor dem Auftrag mit Ultraschall, um die genomische DNA zu scheren. Nach Auftrennung der Proteine wurde das Gel im Anschluß mit Coomassie-Blue angefärbt und anschließend entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

<u>2 x SDS-Probenpuffer</u>	<u>Coomassie-Färbelösung</u>	<u>Entfärbelösung</u>
120 mM Tris/HCl pH 8,0	10% Essigsäure	10% Essigsäure
8,5% SDS	50% Methanol	5% Methanol
35% Glycerin	0,1% Coomassie R250	
410 mM Monothioglycerol		
0,05% Bromphenolblau		

2.10.2 Blaue Native Gelelektrophorese

Die Blaue-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) wurde nach Vorschrift von Schägger und von Jagow (1991) durchgeführt. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein diskontinuierliches System mit 4% Acrylamid im Sammelgel und einem 10%-20%igem Gradientengel verwendet. Vor dem Beladen des Gels wurde der solubilisierte Rezeptor NpSR_{II} und sein Transducer NpHtr_{II} für 1 Stunde in einem 500 µl Ansatz bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 60 µl entnommen, mit 3fach Probenpuffer (4,5ml Glycerin 99%, 0,31g BisTris pH7 ad 10ml H₂O) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Elektrophoreseapparatur wurde das Hoefer SE-400 System der Firma

Pharmacia verwendet. Die eingestellten Elektrophoresebedingungen lagen im Sammelgel bei 150V, 25mA und max. 20W. Nach ca. 2 Stunden und 15 Minuten war die Farbfront in das Trenngel eingewandert und die Bedingungen konnten auf 500V, 15mA und 20W gestellt werden. Der Lauf im Trenngel dauerte Erfahrungsgemäß etwa 6-7 Stunden. Ausgewählte Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, kleingeschnitten, für 15 Minuten bei 40°C in SDS-Puffer inkubiert und in einer anschließenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe 2.10.1) weiter analysiert.

<u>Kathodenpuffer</u>	<u>Anodenpuffer</u>	<u>Gelpuffer</u>
50 mM Tricin	50 mM Bis-Tris / HCl	150 mM Bis-Tris / HCl
15 mM Bis-Tris	pH 7,0	1,5 M e-Aminocaprinsäure
pH 7,0		pH 7,0
0,02% Serva Blue G		

2.10.3 Aminosäureanalyse

Zur genaueren Bestimmung der Proteinkonzentration der NpHtrII-Proteine und zur Überprüfung der in Abschnitt 2.10.4 beschriebenen Methode wurden Aminosäureanalysen durchgeführt. Dazu wurden vier Proben in Doppelbestimmung mit nach Methode 2.10.4 berechneten Proteinkonzentrationen vorbereitet und in entsprechenden Röhrchen eingeengt. Die Proben wurden in der AG Prof. Dr. H. E. Meyer, Ruhr-Universität Bochum gemessen und ausgewertet.

2.10.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationen wurden aufgrund der jeweiligen Proteineigenschaften nach unterschiedlichen Methoden ermittelt. Im Falle des NpSRII diente dazu die maximale Absorption des Retinal-Chromophors bei 498 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 40000 \text{ cm}\cdot\text{L}/\text{mol}$. Die Proteinkonzentration wurde dabei mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes ermittelt:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

nach Einrechnung der molaren Masse ergibt sich folgende Gleichung:

$$E / \epsilon \cdot d \cdot M = c_{\text{NpSRII}} (\text{mg/ml})$$

E	= gemessene Extinktion
ϵ	= Extinktionskoeffizient in L/mol · cm
d	= Dicke der Küvette
M	= molare Masse des Proteins

Der Vergleich zur Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm erlaubte eine Beurteilung der Reinheit, da bei einem empirischen Wert von $A_{280}/A_{498} = 1,3$ von einem Gehalt $> 95\%$ ausgegangen werden konnte.

Aufgrund des geringen Vorkommens aromatischer Aminosäuren in NpHtrII ($\epsilon_{280}^{ber} = 3000$ cm·L/mol) und des störenden Einflusses des Detergenz auf Farbausays (Bradford) wurde hier die Konzentration spektroskopisch über die Absorption der Peptidbindung bei 205 nm (Scopes, 1974) ermittelt. Dabei entspricht eine Absorption von OD = 31 einer Proteinkonzentration von 1 mg/mL.

Als weitere Möglichkeit konnte die Bestimmung der Protein-Konzentration auch nach der Methode von Ehresmann *et al.* (1973) über die Absorption bei 228,5 nm und 234,5 nm nach folgender Formel bestimmt werden:

$$c_{NpHtrII} (mg / ml) = \frac{A_{228,5} - A_{234,5}}{3,14}.$$

2.10.5 Immunologische Nachweise nach Western Transfer

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach dem Semi-dry Verfahren mit dem Puffersystem von Schägger und von Jagow (1987) auf Nitrocellulose-Membran elektrotransferiert. Der Blot wurde anschließend in einer 5%igen Lösung von Trockenmilch in TBS-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0 (HCl)) ü.N. bei 4°C gelagert, um freie Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Die Reaktion mit dem primären Antikörper (NpHtrII-Antikörper aus Kaninchen) erfolgte durch Inkubation des Blots in 5 ml der Antikörperverdünnung 1 : 5000 in TBS unter leichtem Schwenken in einem Plastikbeutel bei RT für 1 h. Nach zwei Waschschritten à 30 min in 100 ml TBS-Puffer + Tween (TBS + 0,05% Tween (TBS-T)) wurde der sekundäre Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper IgG [H+L] konjugiert mit Peroxidase; Johnson Immunochemicals) in einer Verdünnung von 1 : 2000 zugegeben. Nach 1 h folgten wieder zwei Waschschrritte in TBS-T. Die Detektion erfolgte nach Beträufeln des Blots mit 1,5 - 3 ml Chemoluminiszenz-Substrat (Boehringer), je nach Größe des Blots, durch Auflegen von Röntgenfilmen. Die Expositionsdauer wurde abgeschätzt, so dass am Ort des größten Signals eine vollständige Schwärzung erreicht wurde.

2.10.6 Massenspektrometrie

electrospray ionisation (ESI)

Die ESI-Massenspektren wurden an einem LCQ Elektrospray Massenspektrometer der Firma Finnigan MAT (Bremen) aufgenommen, das mit einer selbstgebauten (H. Prinz, MPI-Dortmund) nano-Spray Vorrichtung ausgerüstet ist. Für Membranproteine wurde die Probenvorbereitung analog zu Hufnagel *et al.* (1996) durchgeführt. Als Abwandlung löst man das präzipitierte Polypeptid in einer Mischung aus CHCl_3 :MeOH: TFE:H₂O:HCOOH 100:75:50:35:4 (v/v). Die Proteine wurden durch Gelfiltration über Sephadex G25 (Pharmacia) von störenden Salzen befreit. Die Messbereiche lagen in Abhängigkeit von der Probenart zwischen 300 und 2000 amu. Die Messungen erfolgten mit einer Genauigkeit von 100 ppm entsprechend 3 amu bei einem Protein mit 30 kDa. Aus den im Spektrum detektierten Signalen für mehrfach geladene Molekülspezies berechneten sich unter Verwendung der Finnigan Dekonvolutions Software die mittleren molaren Massen der vorhandenen Proteine.

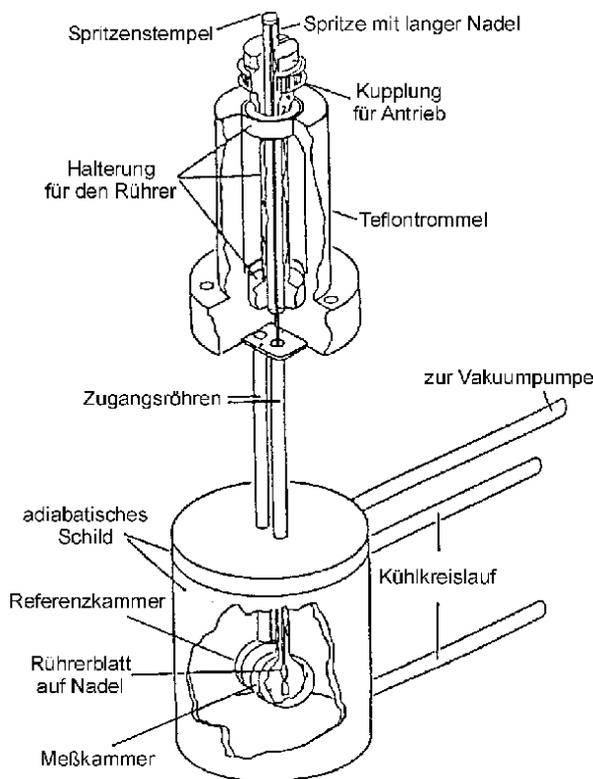
matrix-assisted-laser-desorption-ionization (MALDI)

Die MALDI-Massenspektren wurden mit einem MALDI Massenspektrometer Voyager System 6141 von Applied Biosystems gemessen. Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu der für die ESI-Massenspektren beschriebenen Methode. Anschließend wurden die Proben wie in Cadene und Chait (2000) beschrieben weiterbehandelt und gemessen.

2.11 Biophysikalische Methoden

2.11.1 Isotherme-Titrations-Kalorimetrie

Die Isotherme-Titrations-Kalorimetrie (ITC) wurde an einem OMEGA Titrations Kalorimeter der Firma MicroCal (USA) durchgeführt. Dieses ist aus einer Thermostat-, einer Steuerungs- und einer Injektionseinheit aufgebaut. Wie in der abgebildeten Zeichnung von Wiseman *et al.* (1989) skizziert ist, besteht ein ITC Gerät aus zwei identischen Kammern, einer Messkammer und einer Referenzkammer. Die Kammern sind durch ein stark wärmeleitendes Material (Hasteloy oder Gold) miteinander verbunden und durch einen adiabatischen Mantel, der durch ein zirkulierendes Wasserbad gekühlt wird,



vor Wärmeaustausch geschützt. Durch einen thermosensitiven Stromkreis werden Temperaturdifferenzen zwischen den beiden Kammern und zwischen Kammern und Mantel detektiert. Heizelemente, die sich an beiden Kammern und dem umschließenden Mantel befinden gewährleisten identische Temperaturen im gesamten System. Mess- und Referenzkammer lassen sich über lange und enge Zugangsröhren mit Langnadel-Spritzen vollständig befüllen. Während eines ITC-Experimentes wird auf die Referenzkammer, die gewöhnlich mit Puffer oder Wasser gefüllt ist, eine konstante Heizleistung von etwa einem Milliwatt übertragen. Die dadurch entstehende

Temperaturdifferenz zur Messkammer wird durch einen Feedback-Heizstrom kompensiert. Dieser Heizstrom repräsentiert die Basislinie. Die Titration erfolgt schrittweise durch Injektion einer konzentrierten Proteinlösung A über eine 250 μ l Langnadel-Spritze in die Messkammer, die mit 1,4ml Proteinlösung B vollständig befüllt ist. Der Spritzenstempel wird dazu durch einen hochpräzisen Schrittmotor herabbewegt. Die Anzahl und Größe der einzelnen Zugaben legt man zuvor als Parameter fest. In den durchgeführten Messungen wurde ein Injektionsvolumen von 10 μ l verwendet, so dass 25 Injektionen möglich waren. Die Zugabe erfolgte innerhalb von je 10 Sekunden in Intervallen von 300 Sekunden. Das Reaktionsvolumen wurde durch Rotation des gesamten Spritzeneinsatzes über Rührblätter, die an der Nadelspitze angebracht sind, gemischt. Aufgrund der gleichmäßigen Rührgeschwindigkeit wird die Basislinie der Heizleistung nicht beeinträchtigt. Direktes

Messsignal ist somit die zeitabhängige Heizleistung, die nötig ist um die Messkammer wieder auf die gleiche Temperatur wie die Referenzkammer zu bringen. Endotherme Reaktionen werden somit als Zunahme, exotherme als Abnahme des Messsignals aufgezeichnet. Die hier verwendeten Proteinlösungen des NpSR_{II} und NpHtr_{II} wurden als Konzentrate in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß über Nacht gegen einen entgasten Puffer mit 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH = 8 0,05% DDM (v/v = 1/2000) dialysiert. Die Spritze und die Messkammer wurden vor dem Befüllen mit Dialysepuffer gespült. Das Befüllen musste möglichst frei von Luftblasen erfolgen und die Proben durften keine Staubpartikel enthalten, da diese gegen die Kammerwände schlagen und die Basislinie beeinträchtigen. Die Titration ist nach dem thermischen Äquilibrieren vollständig automatisiert. Die erhaltenen Daten wurden über die mitgelieferte Software Origin-ITC ausgewertet.

2.11.2 Mikroskopische Untersuchungen zur Phototaxis

Die Untersuchungen zur Phototaxis wurden mit der in Stoeckenius *et al.* (1988) beschriebenen Apparatur durchgeführt, eine selbst entwickelte mikroskopische Methode im Dunkelfeld, bei der die unterschiedliche Zelldichte in einem Spot der mit photochemisch aktivem Licht bestrahlt wird gemessen wird. Der Kondensator ist ein Spezialkondensator, dessen Appertur so groß ist, dass die direkt aus ihm kommenden Lichtstrahlen am Objektiv vorbeigehen. Nur wenn ein Präparat in den Strahlengang gebracht wird, gelangt das von ihm gebeugte Licht in das Objektiv und trägt zur Abbildung bei. Die Strukturen erscheinen leuchtend vor dunklem Hintergrund. Ein angeschlossener Photomultiplier verstärkt das Lichtsignal, d.h. er nimmt das Licht, das durch die Bakterien abgestrahlt wird, auf und verstärkt es zu einem messbaren Signal (in mV). Die Daten wurden über einen angeschlossenen Schreiber in einen PC geleitet und mit einer institutseigenen Software Lab32 aufgenommen und anschließend mit der Software Origin 6.0 ausgewertet. Dabei entsprechen die erhaltenen Werte in mV prozentual der Zellzahl, die mit 0-1 konstant gehalten wurde, um die einzelnen Messungen vergleichbar zu machen. Dabei steht 1 für den Anteil der Zellen, die sich zu Beginn der Messung im Spot befinden und 0 würde bedeuten, dass sich keine Zelle mehr darin befindet. Als positive Kontrolle wurden Kulturen von *Natronobakterium pharaonis* verwendet, die bis zum Ende der logarithmischen Phase inkubiert wurden. Als negative Kontrolle wurden Kulturen von RP437-Wildtyp verwendet, die innerhalb ihrer logarithmischen Phase durch IPTG induziert wurden. Für eine Messung wurde ein Objektträger mit doppelseitigem Klebeband im Abstand von 1,5 cm bestückt. Darauf wurde ein Deckglas platziert und in den entstehenden Freiraum 20 µl Bakterienkultur pipettiert. Um die Sauerstoffzufuhr während der Messung zu gewährleisten, wurde zwischen Objektträger und Deckglas immer eine kleine Luftblase gelassen. Im Mikroskop wurden die Zellen, wenn nicht anders angegeben, für 5 Minuten mit Licht > 750 nm bestrahlt, um eine gleichbleibende Basislinie zu

erhalten. Daraufhin wurden sie zusätzlich mit blau-grünem Licht der Wellenlänge 500 nm bestrahlt, das nach weiteren 5 Minuten wieder ausgestellt wurde.

In Abb. 2.11-1 ist das Schema und der Lichtweg der Phototaxis-Apparatur nach Stoeckenius *et al.* (1988) abgebildet. Als photochemisch wirksame Lichtquelle wird eine 150 W XBO-Lampe genutzt, die durch einen Monochromator geregelt wird. Das Licht wird von dem Monochromator über einen Lichtleiter in das Mikroskop geleitet und ersetzt dort die Standardlichtquelle. Die Blende wird so eingestellt, dass ein Bereich von 170 μm im Durchmesser in der Mitte des zu beobachtenden Objektes gleichmäßig mit Licht der XBO-Lampe bestrahlt werden kann. Dieser Spot kann nun gleichzeitig von oben mit photochemisch wirksamen Licht und von unten durch den Dunkelfeldkondensator durch die Lichtquelle L_2 bestrahlt werden. Auf die Lichtquelle L_2 wird ein Schott RG 780 Filter platziert, der nur Licht der Wellenlänge > 750 nm durchlässt. Das Mikroskop wurde so eingestellt, dass nur das gemessene Licht im Spot zum Photomultiplier gelangt, nicht aber das Umgebungslicht. Die Intensität des gemessenen Lichtes ist proportional zur Anzahl der Zellen im Spot. Der Photomultiplierstrom ist daher in der Lage, wechselnde Anzahlen an Zellen im Spot zu delektieren.

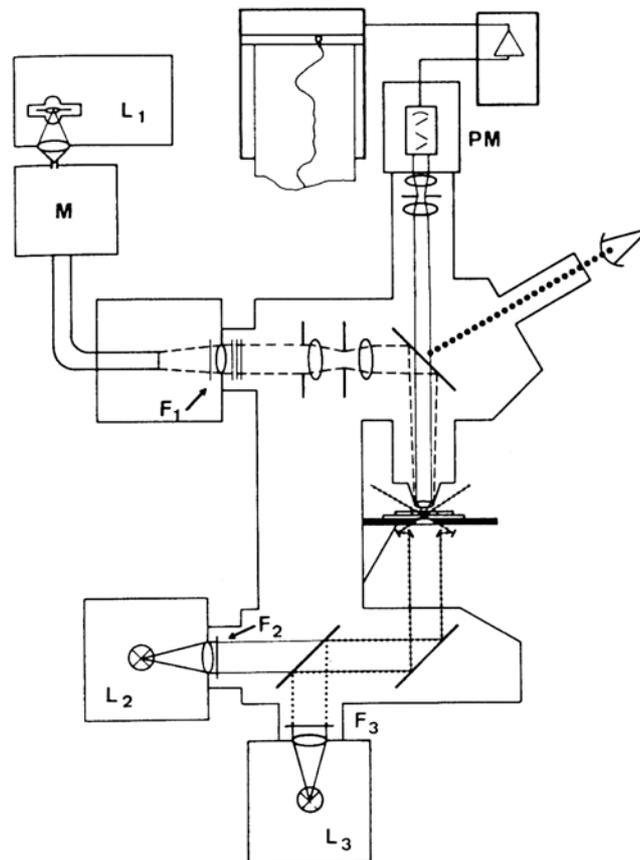


Abb. 2.11-1: Schema der Phototaxis-Apparatur nach Stoeckenius *et al.* (1988), L_1 : photochemisch wirksame Lichtquelle (150W XBO-Lampe), M: Monochromator. L_2 : gemessene Lichtquelle, L_3 : Hintergrundlicht, F_1 : UV-Filter, F_2 : Infrarot-Filter, F_3 : Interferenz-Filter für Hintergrundlicht, PM: Photomultiplier.

2.11.3 Sequenzanalyse und Erstellung von Plasmidkarten

Die Analyse der Primärstruktur des NpHtrII erfolgte mit über das Internet frei zugänglichen Algorithmen (<http://pbil.ibcp.fr/>), dabei wurden insbesondere für die Auswahl der NpHtrII/MCP2-Fusionen die Sequenzanalysen von Wegener (2000) zu Grunde gelegt.

Die Erstellung von Plasmidkarten erfolgte mit dem Programm CloneManager 6.0, Sequenzierungen wurden mit Hilfe des Chromas-Programm geöffnet und in das GCG-Format umgewandelt. Die Analyse von Sequenzierungsergebnissen, die Primerauswahl und Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen des GCG Sequence Analysis Software Package Version 9.0 durchgeführt.

3 Ergebnisse

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Bindung des Transducerproteins NpHtrII (kurz: Transducer) an den photophoben Rezeptor NpSRII (kurz: Rezeptor) des Archaeobakteriums *N. pharaonis* untersucht werden. Zur genaueren Charakterisierung der Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers sollten neben dem bereits vorhandenen Transducer NpHtrII₁₅₇ drei weitere verkürzte Transducer-Varianten hergestellt werden, die den Aminosäuren 1-114, 1-101 und 1-82 des Transducers entsprechen. Diese vier Varianten und der Rezeptor sollten heterolog in *E. coli* exprimiert werden und durch chromatographische Methoden aufgereinigt werden. Anhand von BN-Plage-Experimenten und ITC-Messungen sollte die Bindung der Membranproteine in Detergenz sowohl proteinchemisch als auch auf thermodynamischer Ebene charakterisiert werden.

Aufbauend auf den gewonnenen Erkenntnissen sollte im zweiten Teil der Arbeit ein phototaktisch sensibler *E. coli* Stamm entwickelt werden. Dazu sollten *E. coli* Zellen konstruiert werden, die funktionell ein Fusionsprotein aus dem archaeobakteriellen Transducer und dem eubakteriellen Chemotaxisrezeptor MCP2 überexprimiert. Mit diesem Stamm soll ein eubakterielles Modellsystem für die transmembrane Signaltransduktion der archaeobakteriellen Phototaxis zur Verfügung stehen.

3.1 Untersuchungen zur Expression von NpHtrII-Varianten

3.1.1 Experimentelle Grundlagen zur Expression und Reinigung der Proteine

Um die Synthese eines Proteins in größeren Mengen zu gewährleisten gibt es verschiedene kommerziell erhältliche Expressionsvektoren. Jeder Vektor ist den besonderen experimentellen Bedürfnissen angepasst. Zur Expression der im folgenden beschriebenen Proteine wurde das von Studier und Moffatt (1986) entwickelte pET-System genutzt (siehe Abb. 3.1-1). Der Expressionsvektor besitzt die üblichen Vektorelemente: *ori* als Replikationsursprung, eine Ribosomen-Bindestelle und eine Antibiotikaresistenz, in diesem Fall gegen Kanamycin. Zusätzlich enthält er noch ein *lacI*-Gen, sowie einen T₇-Promotor unter der Kontrolle des *lac*-Operators. Daran schließt sich ein kurzes offenes Leseraster mit einer multiplen Klonierungsstelle für den Einbau der interessierenden DNA in das richtige Leseraster an. In der vorliegenden Arbeit wurden die DNA-Sequenzen mit *NcoI* und *HindIII* oder *NcoI* und *EcoRI*-Schnittstellen versehen und *NcoI/HindIII* oder *NcoI/EcoRI* geschnitten in den entsprechend gleich geschnittenen pET27b-mod-Vektor kloniert. In Bakterien ist dieser Expressionsvektor inaktiv, solange der *lac*-Repressor die Transkription der eingebauten DNA verhindert. Damit eine Transkription erreicht wird,

müssen spezielle *E.coli* Stämme verwendet werden, da der T₇-Promotor nur durch die T₇-RNA-Polymerase, nicht aber durch die *E.coli*-Polymerasen erkannt wird.

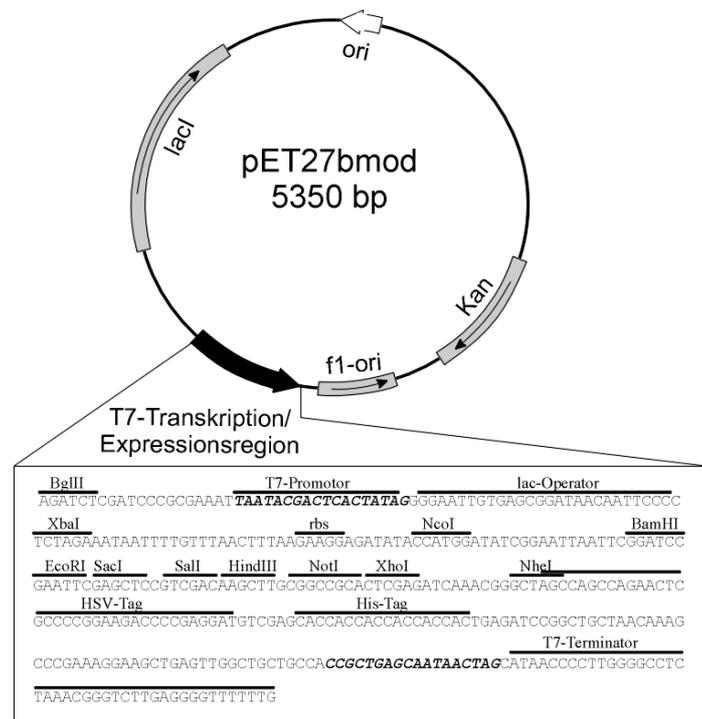


Abb. 3.1-1: Physikalische Karte des Vektors pET27-bmod (Klostermeier *et al.*, 1998). Die Komponenten der Transkriptions/Expressionsregion sind in der Sequenz durch Überstrich gekennzeichnet. An den fett hervorgehobenen Sequenzbereichen können die T₇-Promotor bzw. T₇-Terminator Primer hybridisieren.

Der in dieser Arbeit verwendete *E.coli* Stamm BL21(DE3) trägt eine chromosomale Kopie des T₇-RNA-Polymerase-Gens aus dem Bakteriophagen λDE3 unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors, der ebenfalls durch den lac-Operator reguliert wird. Durch Zusatz des Induktors IPTG, der den lac-Repressor vom Operator titriert, kann die Transkription auf einfache Weise freigegeben werden.

Durch den Einbau von terminalen Fusionspeptiden, sogenannten „tags“, kann eine nach der Expression anschließende Proteinaufreinigung vereinfacht werden. In dieser Arbeit wurde den Proteinen C-terminal ein Oligopeptid aus sieben Histidin-Resten (His-Tags) angehängt. Proteine mit His-Tags binden Nickel-Salze und können durch Affinitätsäulen mit nickelspezifischen Chelatbildnern, wie z.B. Nitrilotriessigsäure (NTA), von den restlichen Proteinen des Bakterienextraktes getrennt werden. Die Bindung von Proteinen mit His-Tags an die Ni-NTA-Matrix ist mit einem K_D -Wert von ca. 10^{-14} sehr stark. Neben den Histidin-verknüpften Proteinen binden unspezifisch auch andere Proteine, beispielsweise solche die eine Folge von Histidinen in ihrer Primärsequenz tragen. Diese können jedoch durch geringere Imidazolkonzentrationen von 30-40 mM verdrängt werden. Eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf etwa 200 mM führt schließlich zur Ablösung der Proteine mit His-Tag. Eine Lagerung der Proteine in Imidazolpuffer führte

nach kurzer Zeit zur Proteinaggregation. Daher wurde nach der Affinitätschromatographie eine Ionenaustausch-Chromatographie mit DEAE Sepharose angeschlossen. In einem ersten Schritt bindet das Molekül an die fixierten Ladungen der stationären Phase (Diethylaminoethyl-Reste), und im zweiten Schritt erfolgt die Verdrängung und Elution des Proteins durch eine steigende Salzkonzentration (NaCl) in dem Elutionspuffer. Das Protein-Eluat konnte nun bei -80°C gelagert werden.

3.1.2 Klonierung von verkürzten NpHtrII-Varianten mit C-term. Affinitätstag

Die heterologe Expression archaebakterieller Pigmente wie NpSRII, pHR, BR oder SRI (Hohenfeld *et al.*, 1999; Schmies *et al.*, 2000), ist bereits erfolgreich mit dem T₇-Promotor kontrollierten pET-System in *E.coli* durchgeführt worden. Für die Transducer-Variante NpHtrII₁₅₇ wurde das System bereits von Wegener (2000) angewendet. Um den genauen Bereich im Transducer (NpHtrII) zu bestimmen, der für die Bindung an den Rezeptor (NpSRII) verantwortlich ist, sollte der Transducer auf 114, 101 und 82 Aminosäuren verkürzt werden und mit diesen Fragmenten und dem Rezeptor jeweils Bindungsstudien durchgeführt werden. Neben dem bereits vorhandenen Transducer NpHtrII₁₅₇ (Wegener, 2000) sollte das beschriebene pET-System auch für die verkürzten Transducer NpHtrII₁₁₄, NpHtrII₁₀₁, NpHtrII₈₂ genutzt werden. Dazu wurden DNA-Sequenzen codierend für die Varianten NpHtrII₁₁₄, NpHtrII₁₀₁ und NpHtrII₈₂ durch Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Als Matrize diente in allen Fällen der Vektor pET27bmod-nphtrII₁₅₇-His (Wegener, 2000). Als Vorwärtsprimer wurde der T₇-prom Primer, der dem Promotor-Bereich im Vektor entspricht, verwendet. Durch die ausgewählten Rückwärtsprimer, tTr82Ec für pET27bmod-nphtrII₈₂-His, tTr114Ec für pET27bmod-nphtrII₁₁₄-His und tTr101Ec für pET27bmod-nphtrII₁₀₁-His, wurde eine *EcoRI* Schnittstelle eingefügt. Eine *NcoI* Schnittstelle war bereits durch die vorherigen Klonierungen von Wegener vorhanden. Somit konnte nach der Restriktion der PCR-Fragmente mit *NcoI* und *EcoRI* und anschließender Aufreinigung eine Ligation mit dem *NcoI/EcoRI* geschnittenen Vektor pET27bmod-SH-ΔnpsopII-His durchgeführt werden. Die Ligation erzeugte eine C-terminale Fusion mit einem His-Tag, so dass eine spätere Affinitätsaufreinigung durchgeführt werden konnte. Durch diese Klonierungsstrategie wurde die Aminosäure Serin an Position 2 in der *N. pharaonis*-Proteinsequenz in ein Alanin umgewandelt, so dass sich für die in dieser Arbeit verwendeten Transducerproteine die folgenden Sequenzen ergeben:

```

NpHtrII157:  MALNV_____EINT157NSHHHHHHHH
NpHtrII114:  MALNV_____TRRE114NSHHHHHHHH
NpHtrII101:  MALNV_____SRMG101NSHHHHHHHH
NpHtrII82:   MALNV_____AATL82NSHHHHHHHH

```

Die konstruierten Plasmide wurden nach der Ligation mit einer Transformationseffizienz von 2×10^9 Zellen pro μg DNA in *E. coli* XLI Zellen transformiert und diese auf kanamycinhaltigen Agar-Platten ausgestrichen. Positive Klone wurden durch DNA-Mini-Präparation mit anschließender Restriktion ausgewählt und nach der unter 2.8.2 beschriebenen Methode isoliert. Um eventuell aufgetretene Fehler bei der PCR-Amplifikation auszuschließen, wurden alle ausgewählten Fragmente sequenziert. Die Abbildung Abb. 3.1-2 zeigt am Beispiel von pET27bmod-SH-npHtrII₁₀₁-His und pET27bmod-SH-npHtrII₈₂-His die Plasmidkarten der vier konstruierten Transducer-Varianten.

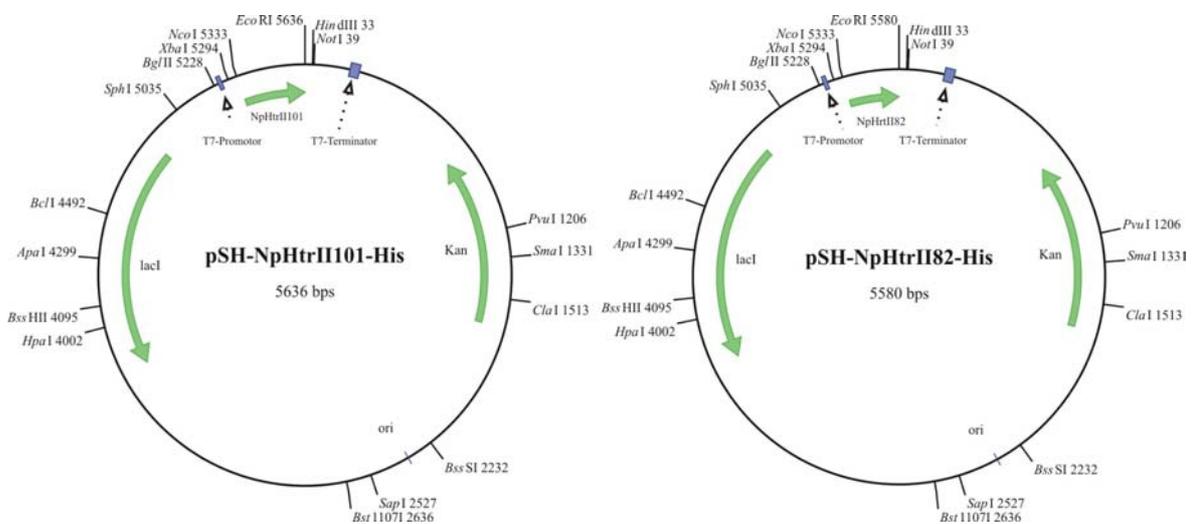


Abb. 3.1-2: Plasmidkarten der Vektoren pET27bmod-SH-npHtrII₁₀₁-His und pET27bmod-SH-npHtrII₈₂-His. Auf den Zusatz pET27bmod im Namen wurde zur besseren Übersicht verzichtet.

3.1.3 Expression und Präparation der NpHtrII-Varianten und des NpSRII

Zur Expression wurden die erhaltenen Plasmide und pET27bmod-npsopII-His (codierend für den Rezeptor NpSRII ohne Retinal (Opsin)) in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert und analog den unter 2.9.1 und 2.9.2 beschriebenen Bedingungen weiterverarbeitet. Der Chromophor des Rezeptors, das Retinal, wurde gesondert zum Medium zugegeben. Während der Expression wird das Opsin zusammen mit dem Retinal als Rhodopsin in die Membran eingebaut. Als Expressions-Kontrollen wurden vor und nach der Induktion mit IPTG 1 ml-Proben entnommen und in SDS-Probenpuffer lysiert. Ein Beispiel für eine Auftrennung über eine SDS-PAGE ist in Abb. 3.1-3 in den Bahnen 1 und 2 (NpsRII) sowie 10 und 11 (NpHtrII₁₁₄) dargestellt. Im Gesamtproteinlysat der Zellen, die den Rezeptor NpSRII exprimieren, tritt nach Induktion der Zellen eine

zusätzliche Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 25-26 kDa auf (Bahn 2). Im Fall des Transducers NpHtrII₁₁₄ erscheint eine zusätzliche Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 14-15 kDa (Bahn 11). Die Bahnen 3 und 4 zeigen jeweils das Eluat der Nickel-Säule, während die Bahnen 6-8 den Durchbruch der einzelnen Waschfraktionen der NpSR_{II}-Aufreinigung zeigen. Die Expressionskontrollen der kleineren Transducerfragmente (NpHtrII₁₀₁ und NpHtrII₈₂) zeigen vor und nach der Induktion keine Veränderung.

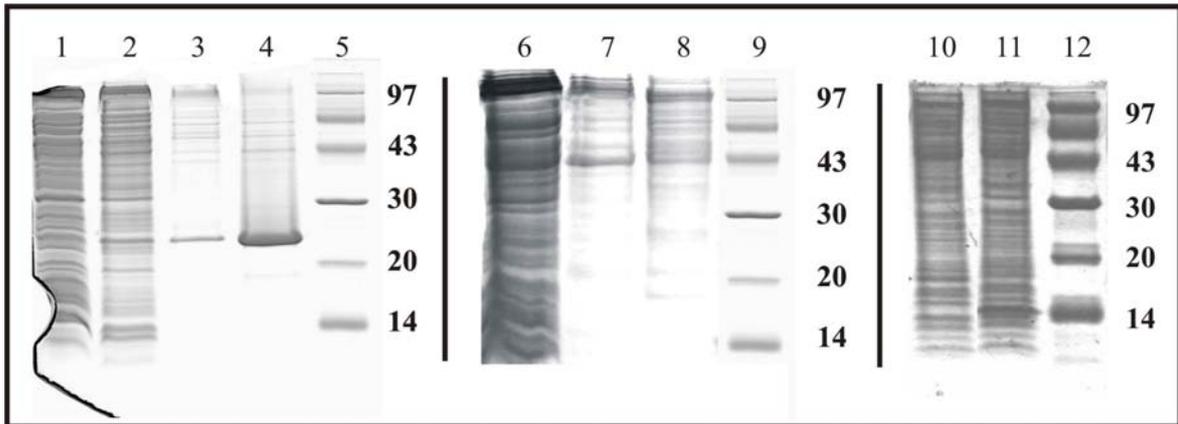


Abb. 3.1-3: SDS-PAGE in Coomassie-Färbung von Expressionsansätzen des Rezeptors und des Transducers NpHtrII₁₁₄.

1: Expressionskontr. NpSR_{II} vor der Induktion; **2:** Expressionskontr. NpSR_{II} nach der Induktion
3: NpSR_{II}-Aufreinigung: Voreluat der Ni-Säule; **4:** NpSR_{II}-Aufreinigung: Eluat der DEAE-Säule
5: LMW-Marker (Pharmacia); **6:** NpSR_{II}-Aufreinigung: Durchbruchfraktion der Ni-Säule
7: NpSR_{II}-Aufreinigung: Waschfraktion 1 der Ni-Säule; **8:** NpSR_{II}-Aufreinigung: Waschfrakt. 2
9: LMW-Marker (Pharmacia); **10:** Expressionkontrolle NpHtrII₁₁₄ vor der Induktion
11: Expressionkontrolle NpHtrII₁₁₄ nach der Induktion

In Abb. 3.1-4 sind die erhaltenen Banden der Protein-Eluate zusammengefasst und werden im Folgenden näher erläutert. Die Proteine konnten durch die beschriebene Präparation in sehr hoher Reinheit und mit einer Ausbeute von 0,5–1 mg pro Liter Expressionskultur für den Rezeptor, 2-3 mg pro Liter Expressionskultur für die Transducer NpHtrII₁₁₄ und NpHtrII₁₅₇ und 0,5 mg pro Liter Expressionskultur für die Transducer NpHtrII₈₂ und NpHtrII₁₀₁ eluiert werden.

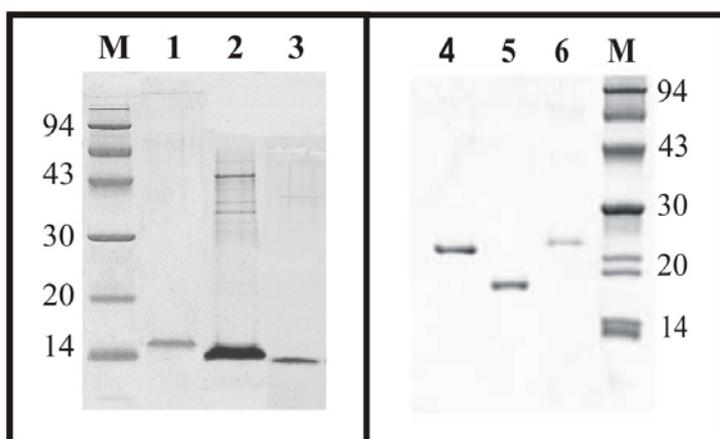
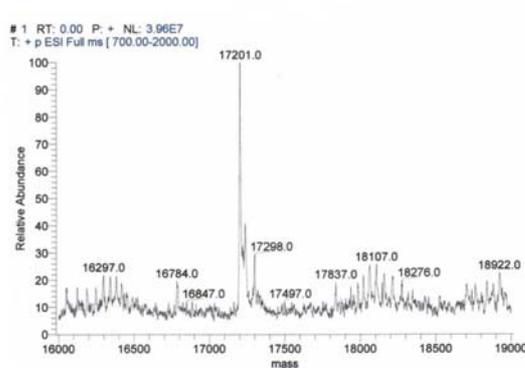


Abb. 3.1-4:

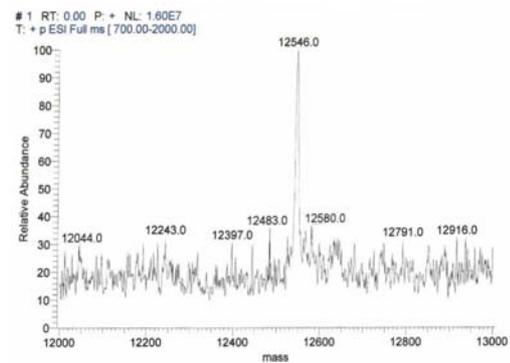
SDS-Gel in Coomassie-Färbung von den Eluaten der gereinigten Proteine nach der DEAE-Chromatographie

M LMW-Marker (Pharmacia)
1 10 µl Eluat von NpHtrII₁₁₄
2 10 µl Eluat von NpHtrII₁₀₁
3 10 µl Eluat von NpHtrII₈₂
4 10 µl Eluat von NpSR_{II}
5 10 µl Eluat von NpHtrII₁₅₇
6 10 µl Eluat von NpSR_{II}
M LMW-Marker (Pharmacia)

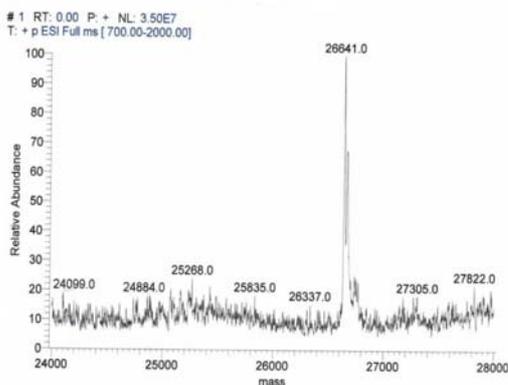
Das durch die distinkte Bande im Gel der Abb.3.1-4 (Bahn 4 und 6) angezeigte Molekulargewicht des Rezeptors stimmt mit dem berechneten Wert von 26,6 kDa überein. Die scheinbaren Molekulargewichte der Transducer, die jeweils angezeigt sind durch die gefärbten Banden in den Bahnen 1, 2, 3 und 5 in Abb. 3.1-4, von 15 kDa (Bahn 1) für NpHtrII₁₁₄, 14 kDa (Bahn 2) für NpHtrII₁₀₁, 12-13 kDa (Bahn 3) für NpHtrII₈₂ und 18 kDa (Bahn 5) für NpHtrII₁₅₇ liegen etwas höher als die berechneten Werte von 12,5 kDa, 11,1 kDa, 9,4 kDa und 17,2 kDa. Dieses Phänomen ist allerdings für archaebakterielle Transducerproteine bereits bekannt (Alam und Hazelbauer, 1991) und vermutlich ist der Zusammenschluss aus Detergenz, Protein und SDS dafür verantwortlich. Ein solch anomales Migrationsverhalten wurde auch von Wegener (2000) für N-terminal verkürzte Transducer-Varianten festgestellt. Die genaue Analyse der Proteinmasse erfolgte durch MALDI- und ESI-Massenspektrometrie, wobei eine genaue Massenbestimmung der kürzeren Transducerproteine nicht möglich war. Die Probenvorbereitung führte zu einer langsamen Aggregation der Proteine, was nach einiger Zeit durch die Eintrübung der Lösung festgestellt werden konnte. Für den Rezeptor und die beiden längeren Transducer-Varianten sind die Massenspektren in der folgenden Abbildung gezeigt:



NpHtrII-157



NpHtrII-114



NpSRII

Die Vorbereitung zur massenspektrometrischen Analyse erfolgte nach Hufnagel *et al.* (1996), wobei die Proben zuvor durch eine Extraktion und Fällung mit organischen Lösungsmitteln über eine kurze Sephadex-G25-Säule entsalzt wurden. Als optimaler Probenpuffer wurde eine Mischung aus CHCl_3 : MeOH : TFE : H_2O : HCOOH mit 100 : 75 : 50 : 35 : 4 (v/v) bei einer Konzentration von etwa 20 μM Protein verwendet. Die berechnete Masse von 17202 Da für den Transducer NpHtrII₁₅₇ stimmt sehr genau mit dem Ergebnis der ESI-Messung überein. Für den kürzeren Transducer NpHtrII₁₁₄ weicht der gemessene Wert von dem erwarteten Wert von 12532 Da ab, zeigt aber in jeder Messung den exakten Wert von 12546 Da. Verantwortlich dafür könnte die Anlagerung einer Methylgruppe sein, wodurch der Unterschied von 14 Da erklärt werden könnte. Allerdings gibt es dafür keine genaue biochemische Erklärung. Der massenspektrometrisch bestimmte Wert des Rezeptors von 26641 Da stimmt im Rahmen der Fehlergrenze mit dem berechneten Wert von 26646 Da überein.

Protein	Experimentelle Masse (Da)	Theoretische Masse (Da)	Ausbeute (mg/L Kultur)
NpSRII	26641	26646	0,5-1
NpHtrII ₁₅₇	17201	17202	2-3
NpHtrII ₁₁₄	12546	12532	2-3
NpHtrII ₁₀₁	-----	11004	0,5
NpHtrII ₈₂	-----	9257	0,5

Tabelle 3.1-1: Übersicht über die berechneten und ermittelten molekularen Massen der Proteine und deren erhaltene Ausbeuten in einer Proteinaufreinigung.

Die erhaltenen Proteine, der Rezeptor NpSRII und die verkürzten Transducer-Varianten NpHtrII₁₅₇, NpHtrII₁₁₄, NpHtrII₁₀₁ und NpHtrII₈₂, konnten nach der beschriebenen Präparation für mehrere Wochen bei -80°C gelagert und für die im Folgenden beschriebenen Experimente herangezogen werden.

3.2 BN-PAGE zur Untersuchung des Membrankomplexes *in vitro*

Proteingemische werden routinemäßig mit SDS-PAGE analysiert. Hierbei werden jedoch die Proteine denaturiert und dadurch die Proteinkomplexe in ihre Bestandteile zerlegt. Für die Auftrennung von Proteinen unter nativen Bedingungen, d. h. ohne die Proteinkomplexe zu zerstören, gibt es verschiedene Methoden. Die in dieser Arbeit verwendete BN-PAGE liefert zum einen die höchste Auflösung und zum anderen ist sie für (fast) alle Proteine, auch Membranproteine, anwendbar. In der BN-PAGE wird das denaturierende Detergenz SDS durch Coomassie Blau ersetzt. Coomassie Blau ist wie SDS negativ geladen und bindet an Proteine, die dann bei physiologischem pH-Wert unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt zur Anode wandern. Die Proteine/Proteinkomplexe behalten ihre native Struktur, weil Coomassie Blau nicht als Detergenz wirkt, und bilden auch keine Aggregate, weil sie sich durch das negativ geladene Coomassie Blau gegenseitig abstoßen.

3.2.1 Analyse der NpSR_{II}/NpHtr_{II}-Komplexbildung

Zur Untersuchung der Komplexbildung wurden der Rezeptor und der Transducer in den molaren Verhältnissen NpSR_{II}/NpHtr_{II} von 1:10, 1:5, 1:2, 1:1, 2:1, 5:1 und 10:1 gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine wurden dabei entweder so gemischt, dass die Gesamtproteinkonzentration des Komplexes mit 50 µmol/l konstant gehalten wurde (d.h. im Verhältnis 1:1 beispielsweise wurden 25 µM NpSR_{II} + 25 µM NpHtr_{II} gemischt und inkubiert), oder dass die Proteinkonzentration des Rezeptors NpSR_{II} mit 10 µM konstant blieb und der Transducer NpHtr_{II} entsprechend zugegeben wurde (im Verhältnis 1:1 heißt das 10 µM NpSR_{II} + 10 µM NpHtr_{II}). Beide Varianten führten zu den gleichen Ergebnissen. Ein Nachteil der letzteren Variante lag allerdings, besonders im Fall von NpHtr_{II101} und NpHtr_{II82}, in der geringen Affinität von Coomassie Blau zu den Transducerproteinen. Bei einer konstanten Proteinkonzentration des Rezeptors von 10 µM waren die zugegebenen Proteinmengen, besonders in den Verhältnissen NpSR_{II}/NpHtr_{II101} 10:1 und 5:1, von NpHtr_{II101} zu gering um sie durch Coomassie anzufärben. Eine Erhöhung der konstanten Proteinkonzentration des Rezeptors, bei der die Banden der Transducer auch noch im Verhältnis NpSR_{II}/NpHtr_{II101} 10:1 und 5:1 im Gel gut erkennbar wären, wurde durch die starke Anfärbung des Rezeptors behindert, durch die alle anderen Banden überlagert wurden.

In dem ersten Experiment wurden die Bindungseigenschaften des Transducer NpHtr_{II157} an den Rezeptor analysiert. Dazu wurden der Rezeptor und der Transducer in den oben beschriebenen Verhältnissen gemischt und für eine Stunde inkubiert. In diesem Fall wurde die Gesamtproteinkonzentration mit 50 µM konstant gehalten. Nach der Inkubation

wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophoresebedingungen wurden wie in Methode 2.10.2 beschrieben eingestellt. Abb. 3.2-1 zeigt das BN-Gel zur Analyse der Komplexbildung von NpSR_{II} mit NpHtr_{II157}. Als Kontrollen sind in den Bahnen 1 und 2 jeweils 24 µg und 60 µg des Transducers aufgetragen und in den Bahnen 9 und 10 jeweils 5 µg und 10 µg des Rezeptors. Beim Vergleich von Bahn 1 und 2 mit Bahn 9 und 10 wird deutlich, dass die Anfärbung durch Coomassie Blau nicht bei beiden Proteinen gleich stark ist. Der Rezeptor wird schon in niedrigen Konzentrationen von 5 µg sehr gut gefärbt, während der Transducer trotz hoher Konzentration von 60 µg nur schwach angefärbt wird. Dies ist auf die Eigenschaft von Coomassie zurückzuführen, bevorzugt an transmembrane Bereiche von Proteinen zu binden (Schamel und Schamel, 2001), von denen NpSR_{II} sieben und NpHtr_{II157} nur zwei hat. Das Migrationsverhalten des NpSR_{II} und des NpHtr_{II157} unterscheidet sich in der BN-PAGE deutlich von dem in der denaturierenden SDS-PAGE (siehe z.B.: Abb. 3.2-1, B, Bahn 8 und 9). Während dort für beide Proteine nur eine distinkte Bande korrespondierend zum jeweiligen Molekulargewicht beobachtet wird, liegt im nativen Fall ein beträchtlicher Anteil vermutlich als Dimer bzw. Multimer vor. Für das Monomere NpSR_{II} wird ein apparentes Molekulargewicht von ca. 25-30 kDa beobachtet (Abb. 3.2-1 A; Box 5), das potentielle Dimer erscheint um 55 kDa (Abb. 3.2-1 A; Box 7) und die Bande einer vermutlich trimeren Form ist bei > 85 kDa zu beobachten. Im Falle des verkürzten Transducers NpHtr_{II157} können ebenfalls alle Banden einer monomeren (~17 kDa), dimeren (~34 kDa) oder trimeren (~51 kDa) Form zugeordnet werden, da alle apparenten Molekulargewichte einem Vielfachen der Masse des Monomers entsprechen. Die Auftrennung der oligomeren Formen des BN-PAGE in einer denaturierenden SDS-Gelelektrophorese in die 2. Dimension zeigt beispielsweise für die vermutlich trimere Form von NpHtr_{II157} eine distinkte Bande mit dem apparenten Molekulargewicht von 18 kDa (Abb. 3.2-1 B; Box 1). Für die monomere und die dimere Form des NpSR_{II} wird eine distinkte Bande bei 26 kDa (Abb. 3.2-1 B; Box 4, 5 und 7) beobachtet. Somit handelt es sich definitiv um oligomere Formen, die in einer SDS-PAGE in ihre Einzelkomponenten zerfallen. Eine Oligomerisierung der solubilisierten Membranproteine NpHtr_{II157} und NpSR_{II} konnte auch durch Gelfiltration (Wegener, 2000) und Dynamic Light Scattering (Tudor Savopol, pers. Mitteilung) nachgewiesen werden.

In den Mischungen aus NpSR_{II} und NpHtr_{II157} (Abb. 3.2-1, A, Bahn 3-8) tritt eine neue Bande auf, die sich deutlich von den Banden der Einzelkomponenten abhebt und die in den stöchiometrischen Verhältnissen von 1:2 (Bahn 4) und 1:1 (Bahn 5) als einzelne, dicke Bande hervorsticht. Diese Bande, deren apparentes Molekulargewicht von ca. 42-45 kDa der berechneten Masse (43 kDa) des NpSR_{II}/NpHtr_{II157} Komplexes sehr nahe kommt, wird in einem denaturierenden SDS-Gel deutlich in die Massen der zwei Komponenten NpSR_{II} und NpHtr_{II157} aufgetrennt (siehe Abb. 3.2-1 B, Box 2 und 3). Sie kann somit dem

entstehenden Komplex aus NpSRII und NpHtrII zugeordnet werden. Durch den Vergleich von Bahn 4 mit den Bahnen 2 und 10 wird klar, dass eine stärkere Bindung des Komplexes NpSRII/NpHtrII₁₅₇ im Vergleich zur Bindung der Proteine untereinander vorliegt. Die beobachteten oligomeren Formen der Proteine werden durch die Bildung des Komplexes fast vollständig verdrängt, so dass in Bahn 4 nur noch eine, nämlich die Komplexbande, erkennbar ist. Die Präsenz der Komplexbande wird stärker von Bahn 8 (Verhältnis NpSRII/NpHtrII₁₅₇ 10:1) zu Bahn 5 (Verhältnis NpSRII/NpHtrII₁₅₇ 1:1) und fällt dann wieder langsam ab (Bahn 3, Verhältnis NpSRII/NpHtrII₁₅₇ 1:5), was einer Titrationskurve mit dem Umschlagbereich bei 1:1 entsprechen würde.

BN-PAGE

SDS-PAGE

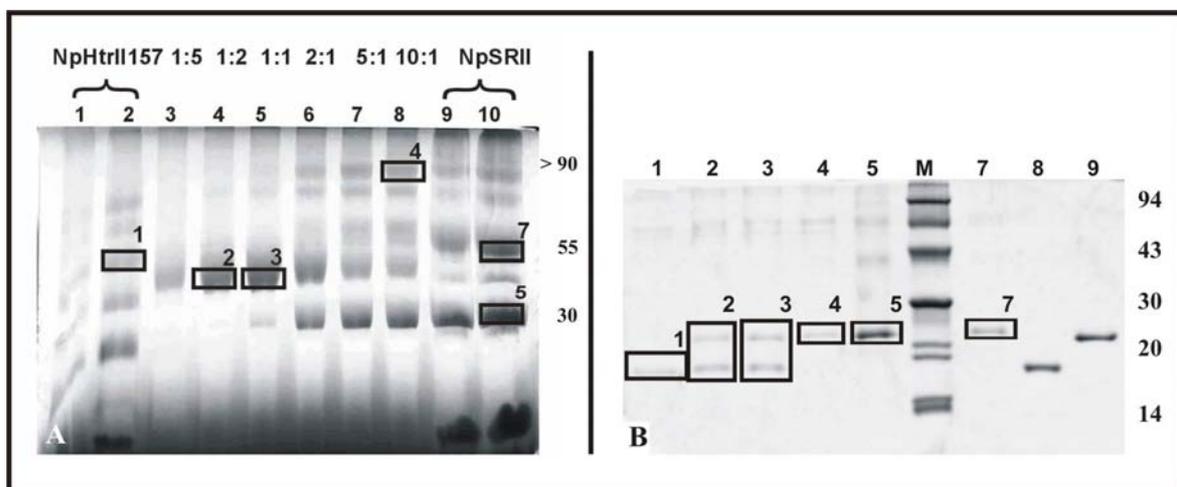


Abb. 3.2-1: BN-PAGE und anschließendes SDS-Gel zur Untersuchung der Komplexbildung von NpSRII und NpHtrII₁₅₇. **A**) Der Transducer NpHtrII₁₅₇ und der Rezeptor NpSRII wurden als Referenz jeweils in Bahn 1, 2 (24µg und 60µg) und 9, 10 (5µg und 10µg) aufgetragen. Die solubilisierten Proteine NpSRII und NpHtrII₁₅₇ wurden in den molaren Verhältnissen 1:5, 1:2, 1:1, 2:1, 5:1 und 10:1 gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgetragen wurden jeweils 3 nmol Gesamtprotein. Die eingerahmten Banden wurden in einer zweiten Dimension durch eine SDS-PAGE analysiert. **B**) Ausgewählte Banden des BN-Gels wurden ausgeschnitten, zerkleinert und bei 40°C für 15 Minuten in SDS-Puffer inkubiert. Die eingerahmten Banden und deren Nummern entsprechen denen des BN-Gels. Als Referenz wurden in Bahn 8 und 9 jeweils NpHtrII₁₅₇ und NpSRII (120ng und 260 ng) aufgetragen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse, wurden für alle verkürzten Transducer BN-PAGE Experimente durchgeführt.

Für NpHtrII₁₁₄ können vergleichbare Aussagen wie für NpHtrII₁₅₇ getroffen werden. Die Proteine NpSR_{II} und NpHtrII₁₁₄ wurden ebenfalls in den angegebenen stöchiometrischen Verhältnissen gemischt und für eine Stunde inkubiert. Auch hier wurde die Gesamtprotein-Konzentration konstant auf 50 µM gehalten. Nach der Inkubation wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese nach Methode 2.10.2 gestartet.

BN-PAGE

SDS-PAGE

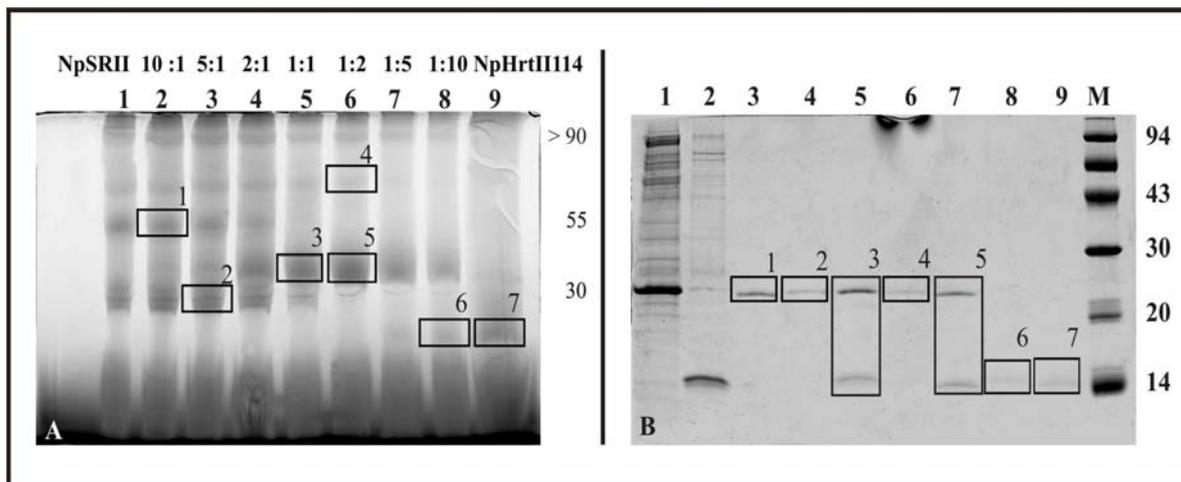


Abb. 3.2-2: A.) und B.) BN-Experiment und anschließende SDS-PAGE von NpSR_{II} mit den verkürzten Transducer NpHtrII₁₁₄. NpSR_{II} und NpHtrII₁₁₄ wurden als Referenz in Bahn 1 (5µg) und 9 (120µg) aufgetragen. Die Vorgehensweise ist analog zu der in Abb. 3.2-1 beschriebenen, zusätzlich wurde hier auch das molare Verhältnis 10:1 aufgetragen. Die Nummern der eingerahmten Banden in dem BN-Gel entsprechen denen im SDS-Gel.

Abb. 3.2-2 zeigt das BN-Gel und die nachträglich durchgeführte Auftrennung in die zweite Dimension durch eine SDS-PAGE. Dem NpSR_{II} können, wie bereits für das beschriebene BN-Experiment, die monomeren, dimeren und trimeren Formen mit den apparenten Molekulargewichten von 25-30 kDa, 55 kDa und > 85 kDa zugeordnet werden (A, Bahn 1). Dem NpHtrII₁₁₄ kann eine potentielle monomere Form zugeordnet werden, die der angefärbten Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 12-15 kDa entspricht (A, Kasten 7) und in einer zweiten Dimension ebenfalls ein apparentes Molekulargewicht von ~ 12-15 kDa zeigt (B, Kasten 7). Auch in diesem Fall tritt in den Mischungen aus NpSR_{II} und NpHtrII₁₁₄ eine zusätzliche Bande auf, die sich von den Einzelkomponenten der Proteine abhebt und im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 am deutlichsten hervorsteht (A, Bahn 5). Das apparente Molekulargewicht dieser Bande liegt bei ca. 40 kDa und kann der erwarteten Komplexbande mit dem errechneten Gewicht von 39 kDa zugeordnet werden. Die Komplexbande ist in diesem Fall in den Bahnen 4 – 8 präsent, überwiegt

jedoch im molaren Verhältnis von 1:1. Sie nimmt von Bahn 2 – 5 langsam zu und von Bahn 5 – 8 wieder langsam ab. In einer Titrationskurve dargestellt entspricht die Stöchiometrie von 1:1 dem Umschlagpunkt. Die Bindung von NpSR_{II} an NpHtr_{II114} scheint auch hier stärker zu sein als die Bindung der Proteine untereinander, so dass die Banden der oligomeren Formen durch die Bande des Komplexes fast vollständig verdrängt werden. Die Zuordnung der Proteinbanden kann durch eine zweite Dimension im SDS-Gel bestätigt werden. Die BN-Banden mit den Markierungen 3 und 5 zerfallen in die Einzelkomponenten korrespondierend zu den Molekulargewichten von NpSR_{II} und NpHtr_{II114}. Die Bande im markierten Kasten 1 des BN-Gels kann der dimeren Form des NpSR_{II} zugeordnet werden, sie zerfällt im SDS-Gel in die monomeren Bestandteile mit einem apparenten Molekulargewicht von 26 kDa. Die mit 2 und 4 markierten BN-Banden entsprechen der monomeren und der trimeren Form des Rezeptors NpSR_{II}, sie zerfallen ebenfalls in die monomeren NpSR_{II}-Bestandteile. Die mit 6 markierte Bande entspricht eindeutig dem Transducer NpHtr_{II114}, was sich durch das apparente Molekulargewicht von 12-15 kDa in einer SDS-PAGE zeigt.

Verkürzt man den Transducer jeweils um weitere 13 (siehe Abb. 3.2-3) oder 32 Aminosäuren, so kann in einem BN-Gel unter den beschriebenen Bedingungen keine Komplexbildung mehr nachgewiesen werden. Abb. 3.2-3 zeigt das BN-Gel von NpSR_{II} mit dem verkürzten Transducer NpHtr_{II101}. In diesem Fall wurde NpSR_{II} mit 25 µM konstant gehalten. Wie bereits für die längeren Transducer beschrieben unterscheidet sich das Migrationsverhalten des Rezeptors NpSR_{II} in der BN-PAGE deutlich von dem in der denaturierenden SDS-PAGE (siehe z.B.: Abb. 3.1-3, Bahn 2). Auch hier können dem NpSR_{II} verschiedene oligomere Formen zugeordnet werden (Bahn 2), die bereits für die längeren Transducer beschrieben wurden. Das Bandenmuster des NpHtr_{II101} zeigt zwei Banden, die sehr nah untereinander laufen (Bahn 1).

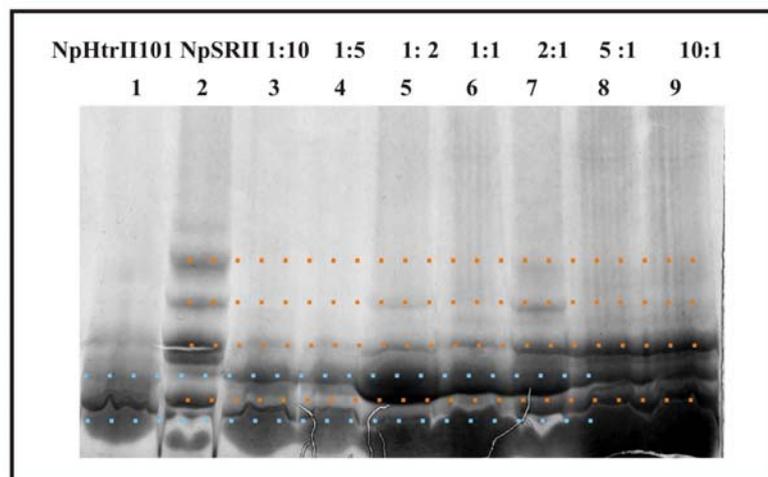


Abb. 3.2-3: BN-PAGE mit dem verkürzten Transducer NpHtr_{II101}. Der Transducer NpHtr_{II101} und der Rezeptor NpSR_{II} wurden als Referenz jeweils in Bahn 1 (240µg) und 2 (10µg) aufgetragen. Die solubilisierten Proteine NpSR_{II} und NpHtr_{II101} wurden in den molaren Verhältnissen 1:10, 1:5,

1:2, 1:1, 2:1, 5:1 und 10:1 gemischt, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und wie beschrieben aufgetragen.

Die untere Bande entspricht mit dem apparenten Molekulargewicht von ungefähr 22 kDa vermutlich einer dimeren Form, während die obere Bande mit dem Molekulargewicht von ca. 45 kDa einem Komplex aus vier NpHtrII₁₀₁-Molekülen entspricht. Die monomere Form des NpHtrII₁₀₁ scheint sich in der Lauffront zu verbergen. Die farbigen Linien deuten die Banden an, die von den einzelnen Komponenten erzeugt werden (orange: NpSRII; blau: NpHtrII₁₀₁). Durch die hohe Proteinkonzentration die nötig war um eine Anfärbung des Transducers zu gewährleisten, sind die Banden des Rezeptors sehr stark angefärbt. Im Gegensatz zu den bereits besprochenen BN-PAGE-Analysen der längeren Transducer-Varianten NpHtrII₁₅₇ und NpHtrII₁₁₄ ist das Erscheinen einer zusätzlichen Bande nicht zu beobachten. Im Falle des NpHtrII₈₂ war eine Anfärbung der Banden nur schwach zu sehen. Obwohl dieser Transducer noch beide transmembranen Helizes enthält, die Coomassie Blue bevorzugt bindet, scheint eine sehr starke Abnahme der Bindungsaffinität von Coomassie Blau an den Transducer NpHtrII₈₂ vorzuliegen. Somit erschien es sinnvoll, zusätzliche Methoden zur Untersuchung der Bindungseigenschaften anzuwenden.

3.2.2 Einfluss von verschiedenen Salzkonzentrationen

Um eine Auswirkung von eventuell vorhandenen polaren Interaktionen auf die Bildung des NpSRII/NpHtrII-Komplexes zu analysieren, wurde ein weiteres BN-Experiment durchgeführt. Hierbei wurden der Rezeptor NpSRII und der Transducer NpHtrII₁₁₄ jeweils über Nacht gegen Puffer (10 mM Tris pH 8, 0,05% DDM) mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen dialysiert. Nach der Dialyse wurden der Rezeptor und der Transducer im Verhältnis 1:1 gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mit 50 mM konstant gehalten. Für den Gel-Auftrag wurden die Proben nach der Inkubation mit Probenpuffer gemischt und aufgetragen. Abb. 3.2-4 zeigt das BN-Gel und das Ergebnis der im Anschluss durchgeführten SDS-PAGE. In Bahn A des BN-Geles (links) ist der Rezeptor NpSRII aufgetragen. Die drei Banden entsprechen jeweils der monomeren Form mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 30 kDa, der dimeren Form mit dem apparenten Gewicht von 55 kDa und einer trimeren Form die im Bereich > 75 kDa beobachtet wird. In Bahn B ist der Transducer NpHtrII₁₁₄ aufgetragen, dessen dimere Bande sich unterhalb der 30 kDa-Markierung befindet und mit einem kleinen Pfeil markiert ist. Die monomere Bande ist im Bereich von schätzungsweise 10 kDa zu beobachten und ebenfalls mit einem kleinen Pfeil markiert. Ausgehend von links nach rechts zeigen die Bahnen des BN-Geles eine steigende NaCl-Konzentration im Dialyse-Puffer, die oberhalb jeder Bahn einzeln angegeben ist.

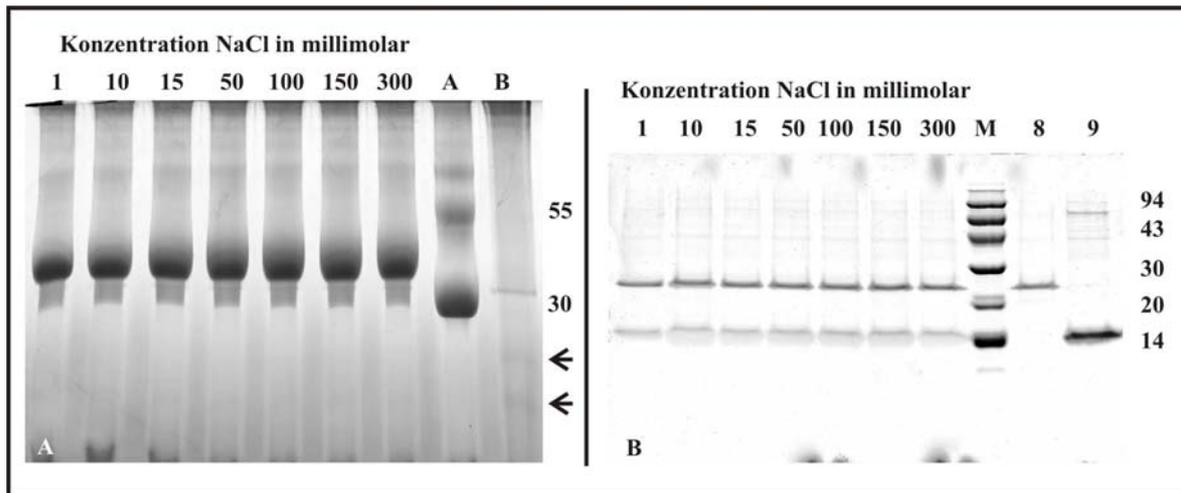


Abb. 3.2-4: A.) BN-PAGE mit anschließender SDS-PAGE zur Untersuchung eventuell vorhandener polarer Interaktionen bei der Komplexbildung. Der Rezeptor NpSR_{II} und der Transducer NpHtr_{II14} wurden als Referenz jeweils in Bahn A (20 μ g) und B (60 μ g) aufgetragen. Die solubilisierten Proteine NpSR_{II} und NpHtr_{II14} wurden in Puffern unterschiedlicher NaCl-Konzentration dialysiert, im molaren Verhältnis 1:1 gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinkonzentration betrug 50 μ M in einem 500 μ l Ansatz. 60 μ l wurden entnommen, mit 30 μ l Probenpuffer versehen und auf das BN-Gel aufgetragen. B.) Alle Komplexbanden wurden ausgeschnitten, zerkleinert, 15 Minuten bei 40°C inkubiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Referenz wurden der Rezeptor (Bahn 8) und der Transducer (Bahn 9) aufgetragen.

In allen Fällen (1–300 mM NaCl) setzt sich klar die Bande hervor, die in den zuvor beschriebenen Experimenten als die Komplex-Bande identifiziert werden konnte. Ihr kann das apparente Molekulargewicht von 40 kDa zugeordnet werden. Oligomere Formen, die beim Auftrag einzelner Proteine (wie z.B. NpSR_{II} Abb. 3.2-4 Bahn A) zu beobachten sind, werden durch die Komplexbildung fast völlig verdrängt. In einer denaturierenden SDS-Gelelektrophorese in die 2. Dimension (Abb. 3.2-4, B) wird deutlich, dass es sich wie erwartet bei den vorhandenen Banden mit dem geschätzten Molekulargewicht von 40 kDa um den Komplex aus NpSR_{II} mit NpHtr_{II14} handelt. Das SDS-Gel zeigt jeweils zwei Banden mit den scheinbaren Molekulargewichten von 26 kDa und 14 kDa, die, wie auch in Bahn 8 und 9 zu sehen, den Einzelkomponenten NSR_{II} und NpHtr_{II14} entsprechen.

3.3 Isotherme-Titrations-Kalorimetrie (ITC)

3.3.1 Experimentelle Grundlagen zu ITC

Die Bindung zweier Reaktionspartner lässt sich auch über die Bindungswärme bestimmen, d.h. über die Wärme, die bei der Bindung aufgenommen oder abgegeben wird. Durch ultrasensitive isotherme Titrations Kalorimeter wird die Bindungswärme bei gleichbleibender Temperatur gemessen. Das Messsignal ist ein Heizstrom an der Probenkammer, der Temperaturdifferenzen zu einer Referenzkammer ausgleicht. Wird zur Probe in der Messkammer eine definierte Portion, δn_j Mole, des in der Spritze befindlichen Reaktanden „j“ injiziert, so geht die Reaktion um die Änderung in der Reaktionslaufzahl ($d\xi$) voran. Eine damit verbundene Freisetzung oder Aufnahme von Wärme, q , wird durch das Kalorimeter mit der Variation des Kompensationsheizstromes beantwortet. Der zeitliche Verlauf dieses variablen Heizstromes ist das aufgezeichnete Messsignal. Aus diesem kann durch Integration über die Zeit die Wärmeentwicklung bei Zugabe von δn_j erhalten werden. Grundvoraussetzung für derartige Messungen ist, dass sich das System thermodynamisch im Gleichgewicht befindet. Die beim isobaren Übergang vom Zustand vor zu dem nach einer Injektion gemessene Wärme ist gemäß des ersten Hauptsatzes der Thermodynamik identisch mit einer Enthalpieänderung dH . Die gemessene Enthalpie ist als Zustandsfunktion abhängig von den unabhängigen Variablen Druck (p), Temperatur (T) und „Änderungen der Reaktionsmischung“ (ξ) und lautet somit:

$$q = dH = \left(\frac{\partial H}{\partial p} \right)_{T,\xi} \cdot dp + \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_{p,\xi} \cdot dT + \left(\frac{\partial H}{\partial \xi} \right)_{T,p} \cdot d\xi$$

Da im vorliegenden Experiment Druck und Temperatur konstant gehalten wurden ($dp = 0$ und $dT = 0$), ist die Enthalpieänderung bei der Reaktion nur abhängig von $d\xi$:

$$q = dH = \left(\frac{\partial H}{\partial \xi} \right)_{T,p} \cdot d\xi \quad \mathbf{1}$$

bzw. nach Division durch die zugegebene Stoffmenge n der Substanz j:

$$\frac{q}{dn_j} = \frac{dH}{dn_j} = \left(\frac{\partial H}{\partial \xi} \right)_{T,p} \cdot \frac{d\xi}{dn_j}$$

Unter der nach Annahme idealer Lösungen [es gilt: $(\partial H/\partial \xi)_{T,p} = \Delta_R H$] gilt:

$$\frac{q}{dn_j} = \frac{dH}{dn_j} = \Delta_R H \cdot \left(\frac{d\xi}{dn_j} \right) \quad 2$$

Allerdings stellt $d\xi$ im Gegensatz zu dn_j eine unbekannte Größe dar, weshalb es notwendig ist eine Beziehung zwischen dem Reaktionsfortschritt und der titrierten Stoffmenge abzuleiten. Die oben erwähnte Grundbedingung für ein ITC-Experiment ist, dass nach jeder Zugabe eine Reaktion abläuft, die das System von einem Gleichgewichtszustand in den anderen überführt. Die Einstellung eines chemischen Gleichgewichtes korrespondiert mit der Abnahme der Gibb's-Energie bis ein Minimum erreicht ist:

$$\left(\frac{\partial G}{\partial \xi} \right)_{T,p}^{Aquil} = 0 \quad 3$$

Unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie gilt:



Die Gesamtänderung der Gibb's-Energie ist darstellbar aus den chemischen Potentialen der auftretenden Moleküle gemäß:

$$\Delta_r G^\circ = \mu_{AB} - \mu_A - \mu_B = -R \cdot T \cdot \ln K_{Ass} \quad 4$$

Sie ist außerdem wie beschrieben mit der Bindungs-Gleichgewichtskonstante

$$K_{Ass} = \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]} \text{ verknüpft:}$$

	A	+	B	⇌	AB
t^0 nach Zugabe	n_A		n_B	0	(mole)
t^∞ im Gleichgewicht	$n_A - \xi$		$n_B - \xi$	ξ	(mole)

Nach Einsetzen in das Massenwirkungsgesetz und Umformung wird eine in ξ quadratische Gleichung erhalten, aus der sich durch Differenzieren die gesuchte Beziehung für $d\xi/dn$ herleiten lässt (Ladbury und Chowdhry, 1998):

$$\frac{d\xi}{dn_A} = 1/2 + \frac{1 - 1/2 \cdot (1+r) - X_r/2}{[X_r^2 - 2X_r \cdot (1-r) + (1+r)^2]^{1/2}} \quad \mathbf{5}$$

$$X = \frac{n_A}{n_B} \quad r = \frac{1}{K_{Ass}} \cdot n_B$$

Sie beschreibt die Änderung in der Reaktionslaufzahl nach der Injektion einer bestimmten Menge der Substanz A zu der im Reaktionsgefäß befindlichen Substanz B. Der obige Quotient ist also abhängig von der Assoziationskonstante sowie der Gesamtmenge der eingesetzten Substanzen. In Verbindung mit Gleichung 2 folgt der Zusammenhang

$$\frac{q}{dn_A} = \Delta_r H(aq) \cdot \left(1/2 + \frac{1 - 1/2 \cdot (1+r) - X_r/2}{[X_r^2 - 2X_r \cdot (1-r) + (1+r)^2]^{1/2}} \right), \quad \mathbf{6}$$

der im folgenden als Anpassungsfunktion für die Messdaten Verwendung findet.

3.3.2 Untersuchungen der Bindungsaffinität des NpSRII/NpHtrII-Komplexes

In Anlehnung an die BN-Experimente sollte das Bindungsverhalten der verkürzten Transducer NpHtrII_x an den Rezeptor NpSRII durch ITC analysiert werden. Zur Titration wurden die in DDM solubilisierten Proteine aufgereinigt und über Nacht in ITC-Puffer dialysiert. Die Durchführung der ITC-Experimente erfolgte analog zu Methode 2.11.1, wobei im Fall der Transducer NpHtrII₁₅₇ und NpHtrII₁₁₄ und deren Mutanten eine Temperatur von 45°C gewählt wurde, die für die kürzeren Fragmente NpHtrII₁₀₁ und NpHtrII₈₂ auf 22°C geändert wurde. Eine Inkubation der kürzeren Transducer führte im Gegensatz zu den beiden längeren Fragmenten bereits nach sehr kurzer Zeit zu einer Proteinaggregation, was eine 3 stündige Messung bei 45°C unmöglich machte. Bei 22°C konnte dagegen eine hohe Stabilität der Proteine beobachtet werden, auch nach der mehrstündigen ITC-Messung konnte keine Trübung der Komplexlösung oder eine Sedimentation nach Zentrifugation festgestellt werden. Als Kontrolle wurde nach jeder Messung mit den verschiedenen Transducern eine sogenannte Pufferkontrolle durchgeführt, bei der sich NpHtrII_x in der Messkammer und ITC-Puffer in der Spritze befand. Diese Kontrolle sollte Aufschluss über die generell vorhandenen Mischungswärmen bei der Titration zweier Lösungen geben. In Abb. 3.3-1 sind die Titrationskurven von NpSRII mit den vier verschiedenen Transducern NpHtrII₁₅₇, NpHtrII₁₁₄, NpHtrII₁₀₁ und NpHtrII₈₂ und in Tabelle 3.3-1 die dazugehörigen thermodynamischen Parameter gezeigt. Der obere Teil der jeweiligen Titrationskurven repräsentiert die Rohdaten nach Basislinienkorrektur, d.h. die Messkurve gibt den zeitlichen Verlauf der zugeführten Wärme pro Sekunde an, die zur Kompensation der Temperaturdifferenz von Messkammer zur Referenzkammer gebraucht wurde. Im unteren Teil ist die aus der Messkurve berechnete molare Wärme in Abhängigkeit vom Titrationsfortschritt aufgetragen.

Die Rohdaten zeigen für NpHtrII₁₅₇ und NpHtrII₁₁₄ zunächst nach jeder Injektion ein Signal mit negativer Amplitude, entsprechend einer Abnahme des Heizstromes, also die Folge eines exothermen Prozesses. Das Signal relaxiert dann innerhalb der Wartezeit wieder zum Ausgangsniveau. Integriert man dieses Signal über die Zeit, erhält man für die freigesetzte Wärme ΔH einen Wert von etwa -17 - -18 kJ mol⁻¹ für beide Proteinkombinationen. Im Bereich der 1:1 Stöchiometrie schlägt das Signal in ein positives Signal mit bedeutend schnellerer Kinetik um. Die aufgenommene Wärme entspricht im Mittel 2 kJ mol⁻¹. Dieses Signal ist auch in der beschriebenen Pufferkontrolle zu beobachten und kann den generell vorhandenen Mischungswärmen zugeordnet werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit war dieses Signal in gleicher Größe schon zuvor vorhanden, wurde aber durch den exothermen Prozess überlagert. Zur Auswertung wurden die aus der Integration erhaltenen Wärmen um den Betrag des endothermen Prozesses basislinienkorrigiert und gegen das molare Verhältnis NpSRII/NpHtrII aufgetragen. Als

stöchiometrischen Wert N wird für die beiden längeren Fragmente 1,03 erhalten, was im Rahmen der Genauigkeit der Proteinbestimmung einem Verhältnis von 1:1 entspricht. Unter den vorgegebenen Bedingungen wird für NpHtrII₁₅₇ eine Komplexbildungskonstante K_{ass} von $6,2 (\pm 0,6) 10^6 \text{ Lmol}^{-1}$ ermittelt, die nach Umrechnung einer Dissoziationskonstanten K_{D} von 160 nM für NpHtrII₁₅₇ entspricht. Für NpHtrII₁₁₄ wird eine vergleichbare Komplexbildungskonstante K_{ass} von $4,2 (\pm 0,6) 10^6 \text{ Lmol}^{-1}$ ermittelt, die der Dissoziationskonstanten K_{D} von 240 nM entspricht.

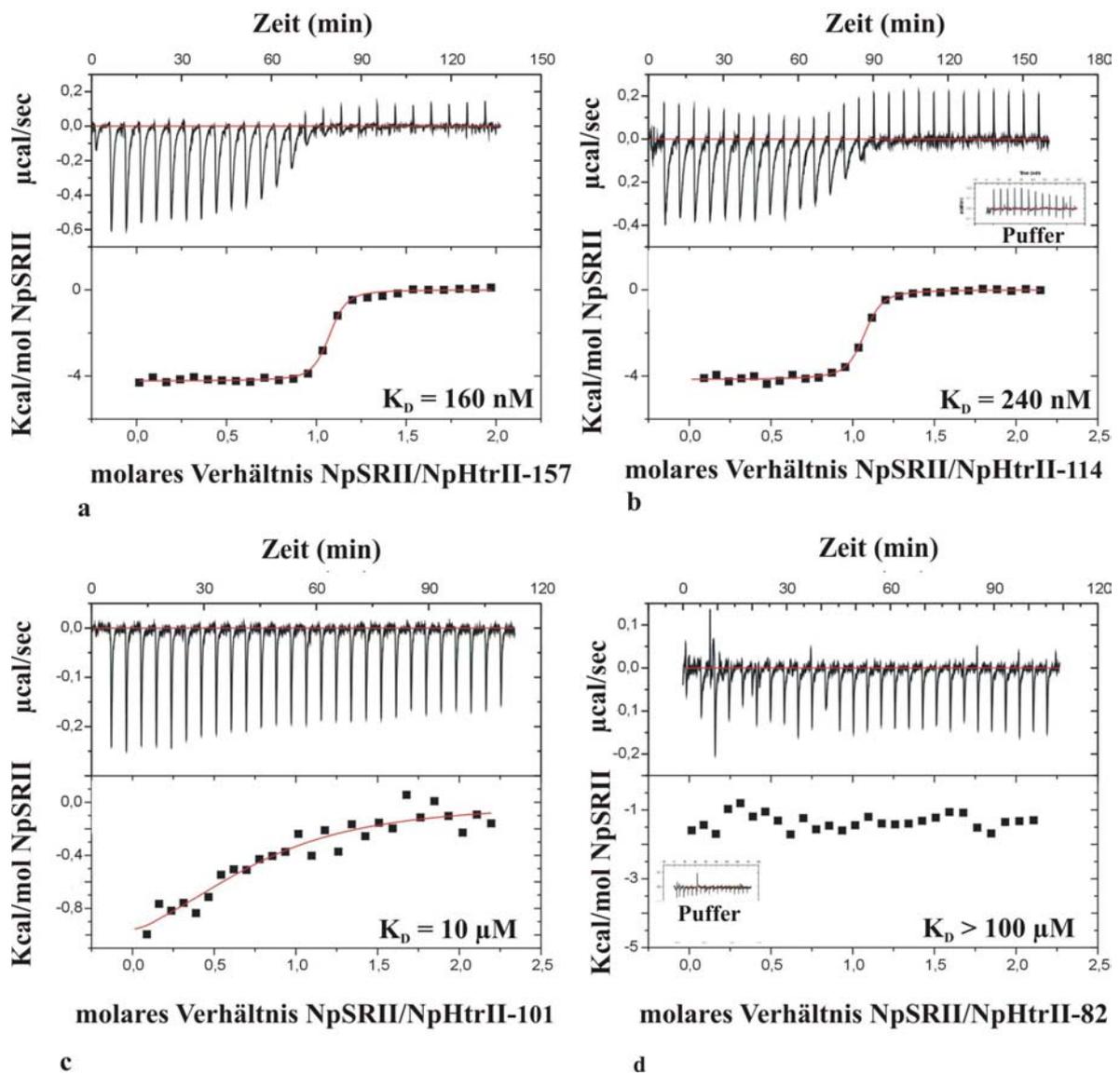


Abb. 3.3-1: ITC-Messungen von NpSRII mit den verkürzten Transducern NpHtrII₁₅₇, NpHtrII₁₁₄, NpHtrII₁₀₁ und NpHtrII₈₂. Die oberen Bereiche der einzelnen Messungen zeigen die basislinienkorrigierten Rohdaten. In der Messung von NpSRII mit NpHtrII₁₁₄ und NpHtrII₈₂ wurde als Beispiel die Pufferkontrolle mit eingeblendet, darauf wurde bei den anderen Graphen aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Beim Assoziationsprozess von NpSR_{II} mit NpHtr_{II}₁₅₇ wird eine Reaktionswärme von Δ_rH (318K) = -17,9 (\pm 0,1) kJ/mol freigesetzt. Der Assoziationsprozess von NpSR_{II} mit dem kleineren Transducer-Fragment NpHtr_{II}₁₁₄ setzt eine Reaktionswärme von Δ_rH (318K) = -17,9 (\pm 0,1) kJ/mol frei. Gemäß der Definition der freien Enthalpie (Gibbs-Funktion) $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ und unter Berücksichtigung von Gleichung 4 kann der Beitrag der Entropieänderung Δ_rS (318K) = 73,74 J/molK für NpHtr_{II}₁₅₇ und Δ_rS (318K) = 71,16 J/molK für NpHtr_{II}₁₁₄ berechnet werden.

Im Fall des NpHtr_{II}₁₀₁ ist eine deutlich schwächere Bindung zu beobachten. Der stöchiometrische Wert $N = 0,75$ lässt in Anbetracht des Signal/Rausch-Verhältnisses dieser Messung ebenfalls eine Stöchiometrie von 1:1 als sehr wahrscheinlich erscheinen. Die Komplexbildungskonstante wird hier als $K_{\text{ass}} = 0,1 (\pm 0,04) 10^6 \text{ Lmol}^{-1}$ angegeben. Daraus lässt sich eine Dissoziationskonstante von nur $K_D = 10 \mu\text{M}$ berechnen. Die freigesetzte Wärme entspricht einem $\Delta_rH = -5,8 \text{ kJ/mol}$. Mit Hilfe von Gleichung 4 und der Definition der freien Enthalpie lässt sich ein Δ_rS (295K) = 76,20 J/molK ermitteln.

Für das kürzeste Fragment NpHtr_{II}₈₂ konnte unter diesen Bedingungen keine Bindung mehr festgestellt werden, was aufgrund der Konzentration von NpHtr_{II}₈₂ in der Messkammer von 100 μM auf einem K_D -Wert $> 100\mu\text{M}$ hinweist. Der signifikante Unterschied in den Dissoziationskonstanten von NpHtr_{II}₁₁₄ und NpHtr_{II}₁₀₁ um zwei Größenordnungen lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei der Sequenz zwischen AS 101 und AS 114 (GDGDL DVELETRRE) um eine unverzichtbare Struktur für die Bindung des Transducers an den Rezeptor handelt.

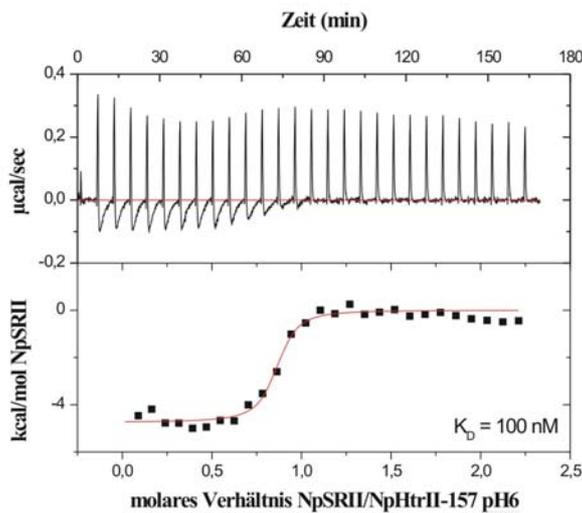
Die aus den ITC-Messungen berechneten und im Text beschriebenen Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

NpHtr _{II}	C _{NaCl} (mM)	pH	T (K)	ΔH^0 (kJ/mol)	K_{ass} ($\text{M}^{-1} \cdot 10^6$)	ΔG kJ mol ⁻¹	ΔS^0 (J/molK)	K_D (nM)
157	150	8	318	- 17.9	6.2	-41,35	73,74	160
114	150	8	318	- 17.6	4.2	-40,38	71,16	240
102	150	8	295	- 5.8	0,1	-28,23	76,20	10 ⁴
82	150	8	295	-	< 0,01	-	-	> 10 ⁵

Tabelle 3.3-1: Thermodynamische Parameter der Komplexbildung NpSR_{II}/NpHtr_{II}_x.

3.3.3 Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf die Komplexbildung

Um weitere Informationen zur Natur des Komplexes zu erhalten, sollten ITC-Experimente mit unterschiedlichen pH-Bedingungen durchgeführt werden. Dazu wurden die Proteine NpHtrII₁₅₇ und NpSRII nach der Reinigung durch die DEAE-Chromatographie gegen ITC-Puffer pH 6, pH 5 und pH 4,5 dialysiert. Während die Proteine im Bereich von pH 6 nach



wie vor stabil waren, konnte man bei pH 4,5 und pH 5 starke Proteinaggregation beobachten, die eine ITC-Messung nicht möglich machten. ITC-Experimente im Bereich von pH 6 lieferten vergleichbare Ergebnisse zu denen die mit pH 8 erzielt wurden. Für die links abgebildete Messung konnte ein stöchiometrischer Wert von $N = 0,83$ bestimmt werden, was einem äquimolaren Verhältnis nahe kommt. Des Weiteren kann unter den vorgegebenen Bedingungen eine Komplexbildungskonstante zu $K_{\text{ass}} = 9,9 (\pm 3,5) 10^6 \text{ Lmol}^{-1}$ berechnet werden.

Das entspricht einer Dissoziationskonstante K_D von 100 nM, was im Bereich der angegebenen Fehlergenauigkeit der Komplexbildungskonstante den Ergebnissen der längeren Transducern entspricht. Für $\Delta_r H$ wird in diesem Fall ein Wert von 20 kJ/mol ermittelt. Auf Basis dieser Werte kann $\Delta_r S (318\text{K}) = 71,10 \text{ J/molK}$ ermittelt werden.

3.3.4 Einfluss von verschiedenen NaCl-Konzentrationen

Wie schon für die BN-Experimente beschrieben, sollte auch in diesem Fall der Einfluss der Ionenkonzentration auf die Bildung des NpSR_{II}/NpHtr_{II114}-Komplexes analysiert werden. Dazu wurden die gereinigten Proteine über Nacht gegen ITC-Puffer mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen dialysiert. Die folgende Tabelle zeigt die erhaltenen Assoziationskonstanten und die daraus resultierenden Dissoziationskonstanten für die NaCl-Konzentrationen 1, 10, 15, 50, 100, 150 und 300 mM.

NpHtr _{II}	C _{NaCl} (mM)	pH	T (K)	K _{ass} (M ⁻¹ · 10 ⁶)	K _D nM
114	1 mM	8	318	3.13	320
114	10 mM	8	318	4.20	240
114	15 mM	8	318	2.97	340
114	50 mM	8	318	4.85	210
114	100 mM	8	318	4.41	230
114	150 mM	8	318	4.21	230
114	300 mM	8	318	9.37	110

Die K_{ass}- und somit auch die K_D-Werte sind vergleichbar mit den bereits beschriebenen Werten für die Transducer NpHtr_{II157} und NpHtr_{II114}. Aufgrund der geänderten Ionenkonzentration wurden keine Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften des Komplexes beobachtet und es konnte kein Einfluss der Ionenstärke auf die Bildung des Komplexes nachgewiesen werden.

3.3.5 Einfluss spezifisch eingeführter Mutationen

Um einen tieferen Einblick in den Komplexbindungsbereich zu erlangen, wurden spezifische Mutationen in den Rezeptor und den Transducer eingeführt. Aufgrund von ESR-Daten (Wegener *et al.*, 2001b), in denen den Aminosäuren Tyr199 des Rezeptors und Phe28 des Transducers eine zentrale Rolle bei der Komplexbildung zugeordnet wird, wurde die Aminosäure Tyrosin 199^{NpSR_{II}} durch Phenylalanin oder Alanin ausgetauscht, zudem wurde das Phenylalanin 28^{NpHtr_{II}} durch Alanin ersetzt. In Abb. 3.3-2 (oben) ist die kalorimetrische Titration von NpSR_{II}_{Y199F} mit dem Transducer NpHtr_{II157} dargestellt.

Anhand der Komplexbildungskonstante $K_{\text{ass}} = 3,22 (\pm 0,9) 10^6 \text{ Lmol}^{-1}$ kann eine Dissoziationskonstante von 310 nM ermittelt werden, die vergleichbar ist mit dem bereits erhaltenen Werten in den Messungen der beiden längeren Transducer. Der stöchiometrische Wert $N = 0,816$ weist auf eine 1:1 Stöchiometrie der Proteine hin. Die Reaktionswärme beträgt 22,6 kJ/mol. Für $\Delta_r S$ (318K) errechnet sich ein Wert von 53,52 J/molK und ΔG beträgt -39.62 kJ/mol.

Dieser Effekt ändert sich allerdings schlagartig, sobald man auch das aromatische Ringsystem entfernt. Ein Austausch von Tyrosin₁₉₉ gegen Alanin im NpSR_{II} (Abb. 3.3-2, Mitte) oder der Austausch von Phenylalanin an Position 28 im NpHtr_{II} in ein Alanin (Abb. 3.3-2, unten) führen zum Verlust der Komplexbildungsfähigkeit. Auffällig sind hier zwei exotherme Signale zu Beginn der Messungen, die vermutlich auf eine anfängliche Wärmedifferenz von Spritze und Messkammer zurückzuführen sind. Eine Pufferkontrolle (jeweils rechts unten in der Messung eingeblendet) bestätigt diese Vermutung, indem sie ebenfalls dieses Merkmal zeigt. Die Temperatur der Messkammer wird apparaturbedingt immer konstant gehalten. Da die Spritze kurz vor der Messung manuell befüllt wird, ist es möglich, dass die vorgewärmte Proteinlösung geringfügig abkühlt und nicht mehr die gleiche Temperatur wie die Proteinlösung in der Messkammer aufweist. Dieses Phänomen ist vermutlich bei allen Messungen bei 45°C vorhanden, wird aber im Fall einer Bindung der beiden Partner durch deren exothermes Signal überlagert. Der Vergleich zur Pufferkontrolle zeigt, dass hier keine Bindung vorliegt. Somit ist die postulierte Wasserstoffbrückenbindung zwischen Tyr₁₉₉^{NpSR_{II}} und dem in der TM 2 lokalisierten Asn₇₄^{NpHtr_{II}} (Gordeliy *et al.*, 2002) unter den gemessenen Bedingungen für eine Komplexbildung nicht essentiell. Dagegen scheint das aromatische Ringsystem erheblich zur Ausbildung des Komplexes beizutragen.

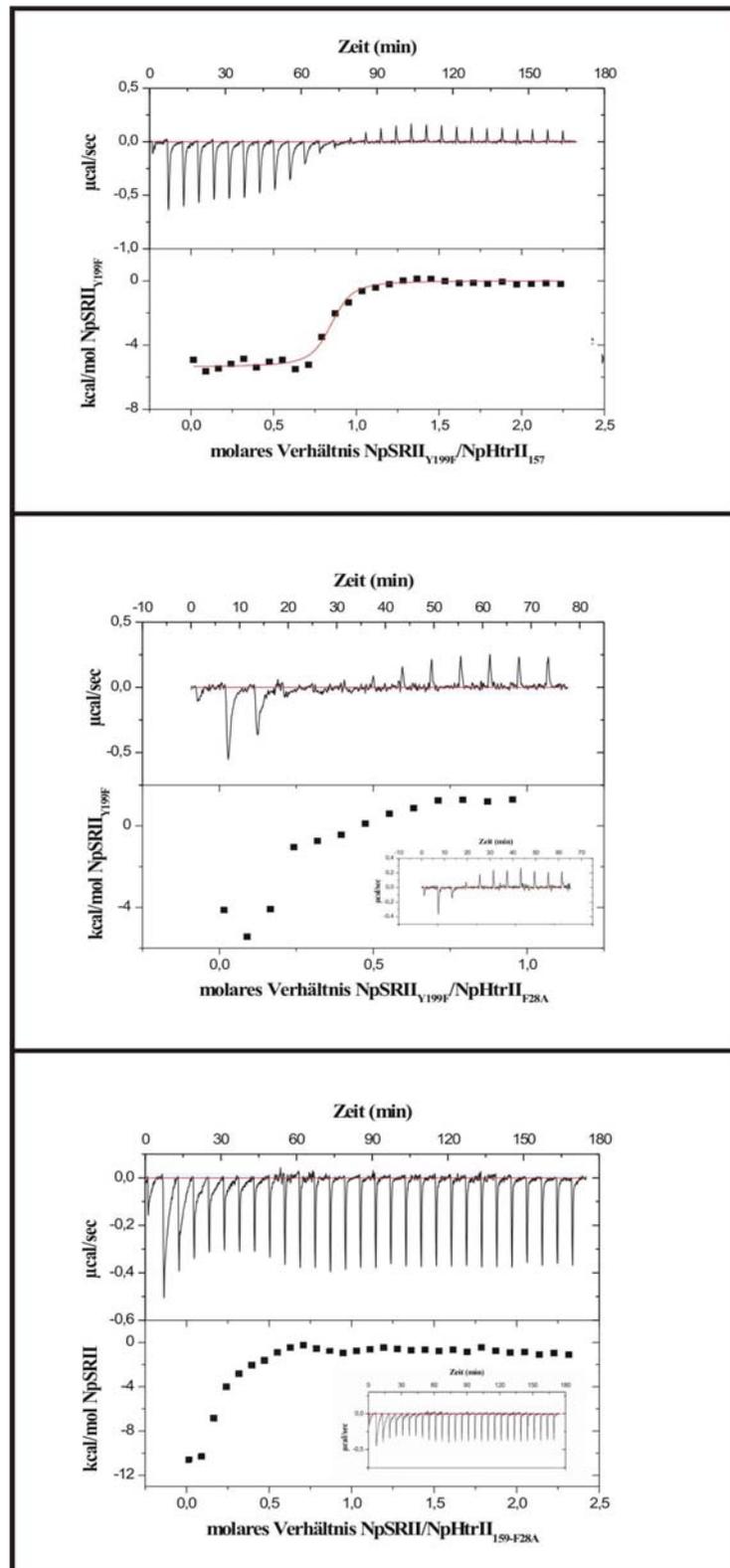


Abb. 3.3-2: ITC-Messungen von NpSR_{wt} und NpSR_{Y199F} mit NpHtrII_{157wt} und NpHtrII_{157-F28A}. Oben: Austausch von Tyrosin gegen ein Phenylalanin an Position 199 im Rezeptor. Mitte: Austausch von Tyrosin gegen ein Alanin an Position 199 im Rezeptor. Der eingefügte Graph zeigt die Pufferkontrolle. Unten: Austausch von Phenylalanin gegen ein Alanin an Position 28 im Transducer. Der Verlauf der Pufferkontrolle ist im eingefügten Graphen zu sehen. Alle Proteine wurden im Verhältnis NpSR_{II} 1000 μM und NpHtrII 100 μM titriert. Die experimentellen Bedingungen sind analog zu den bereits beschriebenen.

3.4 Modellsystem zur Untersuchung von Phototaxis in *E.coli*

Alle bisherigen Ergebnisse wurden auf der Grundlage von *in-vitro* Experimenten erhalten. Das heißt, dass alle Untersuchungen außerhalb des entsprechenden archaebakteriellen Organismus *N. Pharaonis* durchgeführt wurden. Es existiert bisher kein Expressionssystem in *N. pharaonis*, so dass ein Einfluss von eingeführten Mutationen oder die Antwort auf unterschiedliche Umgebungsbedingungen nicht direkt anhand des phänotypischen Verhaltens der Bakterien untersucht werden kann. Die Konstruktion eines Modellsystems für die archaebakterielle Phototaxis scheint daher neue und interessante Möglichkeiten zu eröffnen. Durch die Homologie der archaebakteriellen Transducers zu den eubakteriellen Chemorezeptoren und der gemeinsamen Signalweiterleitung im zwei-Komponenten-System bietet sich *Escherichia Coli* als Modellorganismus an. Die Verdopplungszeit von 20 Minuten bei optimalen Bedingungen ist ein weiterer Vorteil dieses Systems gegenüber dem in Archaeobakterien, mit einer Verdopplungszeit von sieben Stunden. Auf dieser Grundlage sollte das phototaktische System aus *N. pharaonis* funktionell im *E. coli* System eingeführt werden. Dazu sollten verschiedene C-terminale Fusionen des Aspartat-Rezeptors aus *E. coli* (MCP2) an den archaebakteriellen Transducer NpHtrII kloniert und in *E.coli* exprimiert werden. Unter Voraussetzung einer erfolgreichen Expression und Membranintegration dieser Fusionsproteine und einer, über die Chemotaxis-Signalkaskade weitergeleitete, erfolgreichen Signalgebung, sollte der *E.coli* Organismus sensibel auf Licht bestimmter Wellenlänge reagieren.

3.4.1 Sequenzanalyse zur Auswahl der Fusionsschnittstellen

Die Analyse der Primärstruktur des Transducer-Proteins NpHtrII wurde anhand von bereits früher erhaltenen Daten zur Homologie bakterieller Chemorezeptoren (Seidel *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996a; Wegener, 2000) durchgeführt. Die hohe Homologie des archaebakteriellen Transducers NpHtrII zu eubakteriellen Chemorezeptoren aus *E.coli* wird hier sehr deutlich. Die Ausrichtung der Sequenzen gegeneinander orientiert sich an einer von LeMoual und Koshland, Jr. durchgeführten Sequenzanalyse aus dem Jahr 1996 und wurde manuell von Wegener (2000) und Klare (2003) nachbearbeitet. Das Sequenzalignment zeigt zum Teil sehr deutliche Übereinstimmungen (grau unterlegt) bzw. Homologien (siehe Farbcodierung der Aminosäuren) der Sequenz des NpHtrII mit den Chemorezeptoren. Auffallend ist allerdings ein eingeschobener Sequenzbereich von 88 Aminosäuren im NpHtrII (AS-136 bis AS-223), der in den Chemorezeptoren nicht vorhanden ist. Diese Sequenz wurde von Le Moual und Koshland (1996) als eigenständig für archaebakterielle Phototransducer wie HtrI und HtrII beschrieben.

Die im Sequenzvergleich von Le Moual und Koshland (1996) als $\alpha 5$ und $\alpha 6$ gekennzeichneten Bereiche wurden auch von Butler und Falke (1998) als amphiphatische Helizes gefunden und zunächst für den Aspartat-Rezeptor aus *E.coli* identifiziert. Später wurden amphiphatische Sequenzen mit vermutlich α -helikaler Struktur in einer ganzen Reihe von Sensorproteinen und Chemorezeptoren sowie auch im HtrF aus *H.salinarum* identifiziert (Williams und Stewart, 1999). Aus dieser Veröffentlichung wurden die Bezeichnungen AS 1 und AS 2 für diese beiden Sequenzabschnitte in diese Arbeit übernommen.

Die Grundlage für die Konstruktion der Fusionsproteine diente der beschriebene Sequenzvergleich, sowie Mutationsstudien (Spudich, 1998; Zhang *et al.*, 1999) und die in dieser Arbeit erhaltenen Informationen zur Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers (RBD-T). Spudich und Mitarbeiter führten Mutationsstudien an HsHtrII und HsHtrI durch. Die Ergebnisse zeigten, dass die transmembranen Bereiche des Transducers HsHtrII unerlässlich sind um ein von HsSRII aufgenommenes Lichtsignal zu übertragen. Die periplasmatische Domäne des HsHtrII, die im NpHtrII nicht vorhanden ist, hat dabei keinen Einfluss auf die Phototaxis. Die zytoplasmatische Domäne kann durch die von HsHtrI ersetzt werden, ohne das Signal zu beeinflussen (Zhang *et al.*, 1999). Daher sollte die Fusion des NpHtrII mit einem eubakteriellen Chemorezeptor prinzipiell möglich sein. Ein Sequenzvergleich von NpHtrII mit den eubakteriellen Chemorezeptoren MCP 1 und MCP 2 zeigt zahlreiche Homologien. Besonders auffällig ist die Ausbildung eines parallelen "coiled-coils" u.a. im Bereich AS₁₁₆₋₁₂₃ mit den dafür typischen heptadischen Sequenzmotif (abcdefg)_n. Dabei tragen a und d typischerweise hydrophobe und f bzw. g geladene Seitenketten (siehe Abb. 3.4-1). Aufgrund der in dieser Arbeit bestimmten Rezeptor-Bindungsdomäne des zytoplasmatischen Teils des Transducers konnte gezeigt werden, dass der Bereich bis AS-114 noch eine Bindung an den Rezeptor vermittelt. Der Transducer wurde daher in den verschiedenen Fusionen mit vollständiger bzw. verkürzter RBD-T eingesetzt. Als Schnittstellen wurden daher die Aminosäuren 123, 116 und 102 gewählt. Um dem heptadischen Sequenzmotif zu folgen, wurden die im Sequenzvergleich angrenzenden Aminosäuren des Aspartat-Rezeptors MCP 2 mit dem Transducer fusioniert (entsprechende AS sind in Abb. 3.4-1 fett hervorgehoben und unterstrichen). Für die einzelnen Fusionsstellen ergibt sich somit die Sequenz:

NpHtrII/MCP2-102/233
 NpHtrII/MCP2-116/247
 NpHtrII/MCP2-123/254

RMGD¹⁰²/₂₃₃GNLA
 REDE¹¹⁶/₂₄₇MGDL
 LYAA¹²³/₂₅₄VSHM

3.4.2 Konstruktion von Fusionsproteinen aus NpHtrII und MCP2

Zur Konstruktion der Fusionsproteine wurden drei Polymerase-Kettenreaktionen abweichend von der in 2.8.7 beschriebenen Methode durchgeführt. Die beiden ersten PCR-Reaktionen, die die ausgewählten DNA-Sequenzen von NpHtrII und MCP2 amplifizieren sollten, wurden parallel unter gleichen Bedingungen angesetzt. Die Reaktionen wurden nach der „Hot-start“-Methode durchgeführt, bei der den Syntheszyklen eine Denaturierungsphase von 4 min vorgeschaltet war, bevor die Amplifizierung durch Zugabe von 3 U der Polymerase gestartet wurde. Dem schloss sich ein 20 facher Zyklus mit folgenden Bedingungen an:

Denaturierung:	40s bei 96°C
Hybridisierung:	30s bei 53°C
Elongation:	60s bei 72°C

Abschließend erfolgte ein weiterer Schritt von 3 Minuten bei 72°C um die Elongation aller amplifizierten DNA-Fragmente zu gewährleisten. Nach Präparation der erhaltenen DNA-Fragmente durch eine Agarose-Gelelektrophorese, wurde eine Fusions-PCR durchgeführt, die beide DNA-Fragmente fusionierte. Dazu wurde eine Denaturierungsphase von 3 Minuten gewählt, nach der die Einzelstränge bei RT langsam abkühlen und die komplementären Sequenzen zueinander finden sollten. Nach Zugabe der Polymerase wurden die Ansätze für 30 Sekunden auf 72°C erhitzt, um die Elongation der komplementären Sequenzen zu starten. Es folgte ein 20 facher Zyklus mit folgenden Bedingungen:

Denaturierung:	40s bei 96°C
Hybridisierung:	30s bei 53°C
Elongation:	60s bei 72°C

Abschließend erfolgte auch hier ein weiterer Schritt von 3 Minuten bei 72°C um die Elongation aller amplifizierten DNA-Fragmente zu gewährleisten. Als Matrize in den parallelen PCR-Reaktionen wurde für die Transducer-Sequenzen der Vektor pET27bmod-nphtrII₁₅₇-His und für die MCP2-Sequenzen der Vektor pDV4 (Scharf *et al.*, 1998) verwendet. Als Beispiel sind im Folgenden die Sequenzen und Merkmale der Primer für die NpHtrII/MCP2-Fusion 116/247 angegeben:

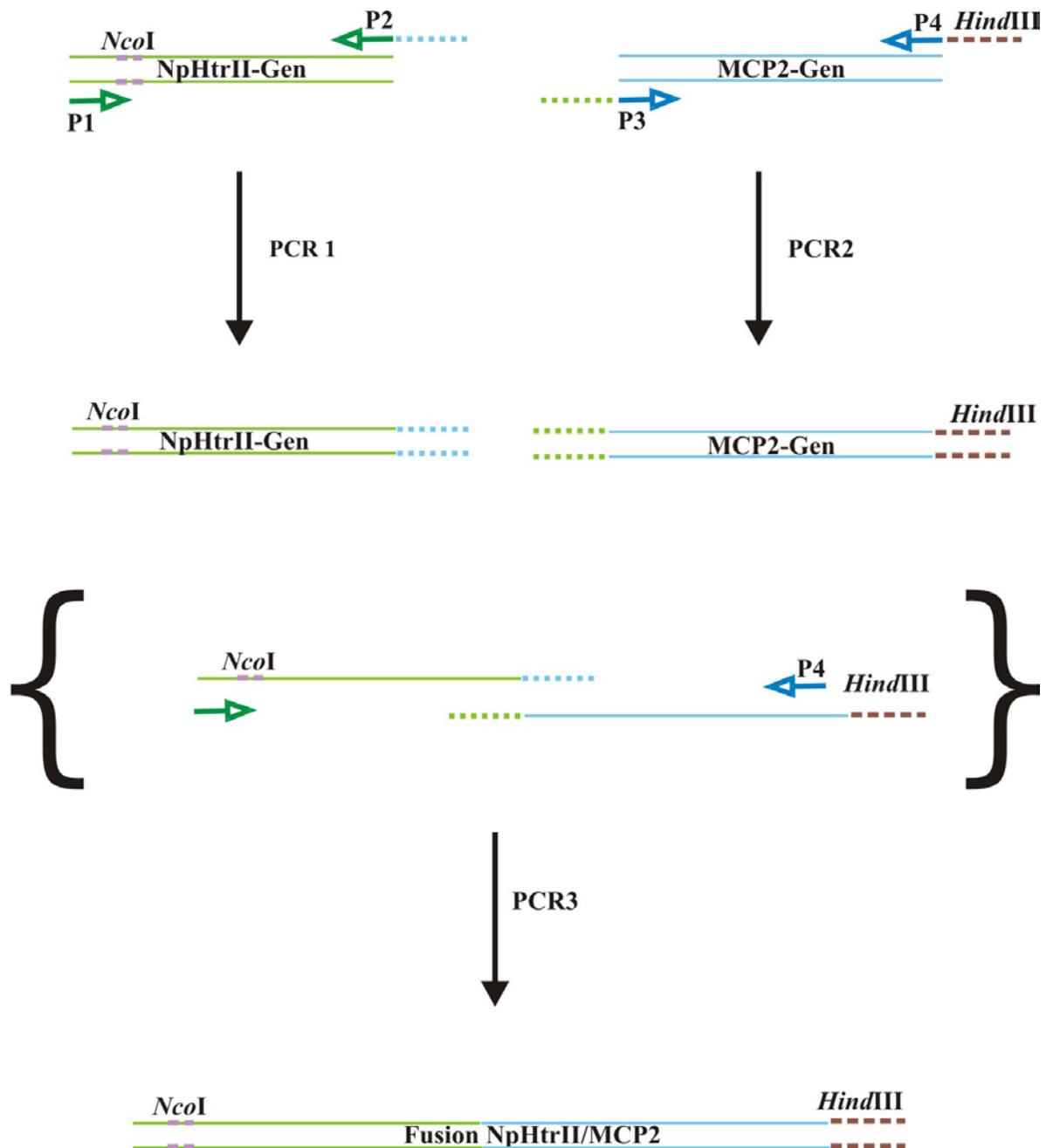


Abb. 3.4-2: Polymerase-Kettenreaktion. Schema für die C-terminale Konstruktion von NpHtrII an MCP2 durch Fusion der jeweilig codierenden DNA-Sequenzen. Die einzelnen Reaktionen sind ausführlich im Text erläutert.

Nach Präparation der erhaltenen PCR-Amplifikate wurden diese mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *HindIII* geschnitten und in den *NcoI/HindIII* geschnittenen Vektor pET27bmod-SH- Δ NpSRII-His kloniert. Alle Fusionen wurden durch die Primer T₇prom, PrimAS60NpHtrII und T₇term sequenziert und auf eventuell durch die PCR entstandene Mutationen überprüft.

Da eine Durchführung der geplanten Experimente nur in einem *E.coli* Stamm stattfinden konnte der in Bezug auf Chemotaxis dem Wildtyp entspricht (RP437) und dieser Stamm kein Gen für die T₇-Polymerase trägt, wurden die 1,4 kb großen, in den pET27bmod-SH- Δ NpSRII-His klonierten Fusionsfragmente NpHtrII/MCP2 *NcoI/HindIII* geschnitten und in den *NcoI/HindIII* geschnittenen Vektor pTrc99A kloniert. Dieser Vektor trägt einen Trc-Promotor, ein pBR322 Replikationsursprung und eine Ampicillin-Resistenz.

Eine weitere Voraussetzung für das Gelingen des Experimentes ist eine zusätzliche Expression des Rezeptors NpSRII in den *E.coli* Zellen, da eine Weiterleitung des Photosignals ohne den Rezeptor nicht möglich ist. Die Expression von zwei Plasmiden in einer *E.coli* Zelle erfordert zwei verschiedene Antibiotika-Resistenzen, um auf eine plasmidkodierte Resistenz zu selektieren und zwei aus unterschiedlicher Herkunft stammende Replikationsursprünge. Somit musste der Rezeptor NpSRII in einen anderen Vektor als die Fusionsfragmente kloniert werden, aber den gleichen Promotor tragen um eine vergleichbare Expression zu gewährleisten. Dazu wurde das Plasmid pET27bmod-npsopII-His *NcoI/HindIII* geschnitten und das 750 bp-Fragment in den *NcoI/HindIII* geschnittenen Vektor pTrc99A kloniert. Das so klonierte Plasmid pSM_NpSRII wurde daraufhin mit *TatI* geschnitten und das 3,3 kb-Fragment in den *TatI*-geschnittenen Vektor pACYC184 kloniert. Dieses Plasmid pSM_CT_pTrcNpSRII trägt einen Trc-Promotor, eine Tetrazyklin- und eine Cloramphenicol-Resistenz, einen His-Tag und einen p15A Replikationsursprung und kann daher zusammen mit den jeweiligen Fusionsplasmiden in *E.coli* exprimiert werden. Durch die Klonierung mit nur einem Restriktionsenzym existiert das Plasmid in zwei verschiedenen Versionen a und b, die sich in der Richtung des NpSRII-Leserasters unterscheiden.

Die aus den beschriebenen Klonierungen entstandenen Plasmide sind in der folgenden Abb. gezeigt:

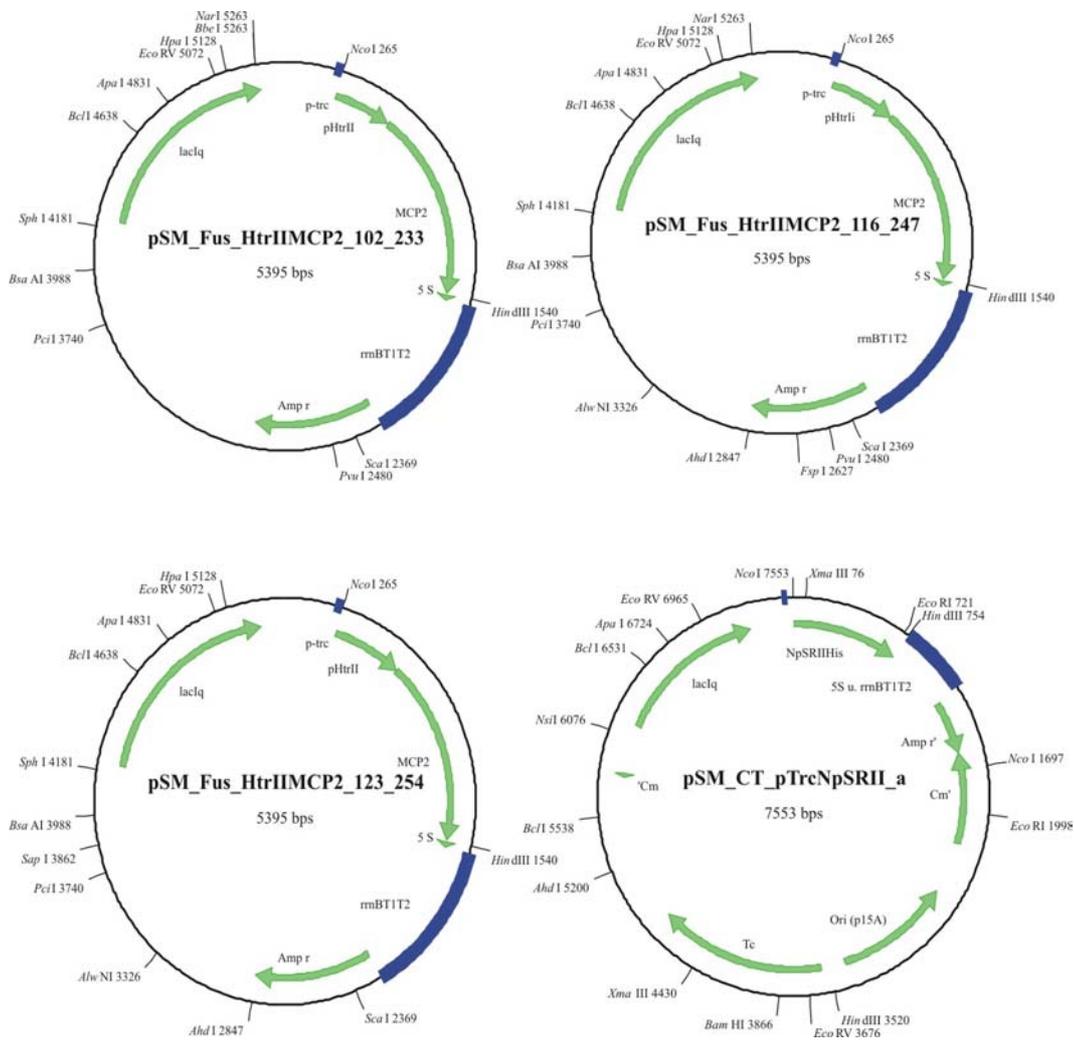


Abb. 3.4-3: Konstruierte Plasmide zur Expression von NpHtrII/MCP2-Fusionsproteinen und NpSRII in *E.coli*. Die pSM_Fus_HtrIIMCP2-Plasmide sind alle gleich aufgebaut und tragen einen starken Trc-Promotor vor dem fusionierten ORF, ein pBR322 Replikationsursprung und eine Ampicillin-Resistenz. Das Plasmid pSM_CT_pTrcNpSRII wurde zur Koexpression mit gleichem Promotor, aber p15A Replikationsursprung und anderer Resistenz (Tetrazyklin und Chloramphenicol) ausgestattet. Die blau unterlegten Regionen markieren die Promotor- und die Terminatorregionen, während grün schattierte Pfeile die offenen Leseraster bezeichnen. Das Protein NpSRII trägt im Gegensatz zu den Fusionsproteinen einen His-Tag.

3.4.3 Koexpression der Fusionsproteine und des Rezeptors in *E. coli*

Zur Expression in *E.coli* wurden die oben beschriebenen Plasmide und das pET27bmod-npSRII-His in den *E.coli* Stamm RP437 transformiert. Aus einer vereinzelt Kolonie wurde eine Vorkultur und aus dieser dann die Expressionskultur inokuliert. Die Inkubation der Zellen erfolgte analog zu den in 2.4 beschriebenen Bedingungen. Nach Steigerung der

Zelldichte auf $OD_{578nm} = 0,6-0,8$ wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Bei der Expression von NpSR_{II} wurde zeitgleich ad 10 μ M all-trans-Retinal aus ethanolischer Stammlösung ($\times 1000$) zugegeben. Die Zellernte erfolgte 2,5 h nach Induktion durch Zentrifugation bei $5000\times g$ und $4^{\circ}C$ für 15 min. Die Präparation der exprimierten Membranproteine ist in 2.9.2 beschrieben.

Als Vorversuch wurde das Fusionsprotein NpHtr_{II}/MCP2-123/254 ohne den Rezeptor NpSR_{II} in *E. coli* RP437 exprimiert. Vor der Induktion und 0,5, 1,5 und 2,5 Stunden nach der Induktion wurden Proben entnommen und in SDS-Probenpuffer lysiert. Nach 2,5 Stunden wurden die Zellen sedimentiert und homogenisiert. Nach der Solubilisierung wurde die Suspension erneut sedimentiert und aus dem Pellet und dem Überstand jeweils zwei weitere Proben entnommen. Anschließend wurden Aliquots aller Proben in einer SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.4-4). Bahn 1 zeigt das erwartete Bandenmuster eines Zelllysats, mit einer etwas stärkeren Anfärbung in dem Molekulargewichtsbereich von 43 kDa. Diese Bande tritt mit zunehmender Expression immer deutlicher hervor (Bahn 2,3 und 5). Die Bande kann dem Fusionsprotein zugeordnet werden, dessen errechnete Molekularmasse 42 kDa beträgt. Durch Betrachten der Bande in Bahn 7 (Proteinauftrennung des Pellets) wird deutlich, dass sich der Hauptanteil des Membranproteins erwartungsgemäß im Pellet befindet. Das Auftreten der Bande bei 43 kDa im Überstand des Zelllysats (Bahn 6) konnte auf eine unvollständige Sedimentation zurückgeführt werden, da nach nochmaliger Sedimentation keine Bande mehr nachweisbar war.

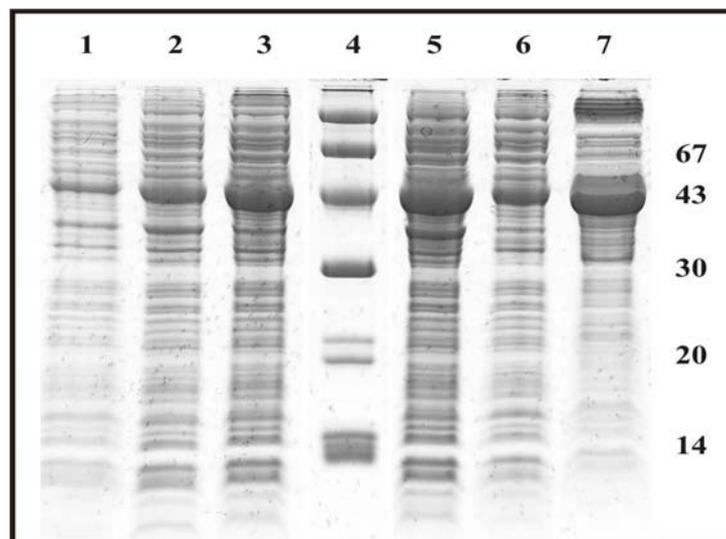


Abb. 3.4-4: Expressionsgel der Expression von NpHtr_{II}/MCP2 123/254. Vor und nach der Induktion wurden Proben genommen, in SDS-Probenpuffer lysiert und Aliquots auf ein Gel aufgetragen. Von Bahn 1 bis Bahn 5 (jeweils 8 μ l einer 1ml Probe) ist die zunehmende Proteinexpression nach 0; 0,5; 1,5 und 2,5 Stunden zu verfolgen. Die Proben die nach der Solubilisierung aus dem Überstand und aus dem Pellet entnommen wurden sind jeweils in Bahn 6 (1 μ l) und 7 (0,4 μ l) zu sehen.

Nach der Expression der Proteine wurde eine Aufreinigung über den HisTag des NpSR_{II} durchgeführt. Nach der Aufreinigung konnte in einem SDS-Gel nicht nur die Bande des NpSR_{II} detektiert werden, sondern ebenfalls die der Fusionsproteine. Die Abb. 3.4-5 zeigt als Beispiel ein Acrylamid-Gel mit jeweils 10 µl DEAE-Eluaten der Fusionen NpHtr_{II}/MCP2 102/233 und 116/247 mit und ohne Induktion. Als negative Kontrolle wurden RP437wt-Zellen aufgetragen (Bahn 5 und 6). Bahn 1 zeigt das Eluat nach der Präparation und Aufreinigung der Zellsuspension von RP437-Zellen, die die Plasmide codierend für NpSR_{II} und das Fusionsprotein NpHtr_{II}/MCP2-102/233 exprimieren (ohne Induktion). Bahn 2 zeigt Gleiches, allerdings mit Induktion. Die Proteine haben ein errechnetes Molekulargewicht von 42 kDa (Fusionsprotein) und 26 kDa (Rezeptor NpSR_{II}), was der Größe der Banden in Bahn 2 entspricht. Ohne Induktion konnte kein Protein isoliert werden. Gleiches lässt sich für die Banden in Bahn 4 beobachten. Hier sind die Eluate der Zellsuspensionen aufgetragen, die das Fusionsprotein NpHtr_{II}/MCP2 116/247 und den Rezeptor NpSR_{II} exprimieren. Während ohne Induktion auch hier kein Protein isoliert werden konnte (Bahn 3), zeigt die Aufreinigung nach der Induktion zwei vorherrschende Banden mit dem apparenten Molekulargewicht von 42 kDa und 26 kDa. Im Falle der negativen Kontrolle wurde erwartungsgemäß auch nach einer Induktion kein Protein beobachtet (Bahn 6).

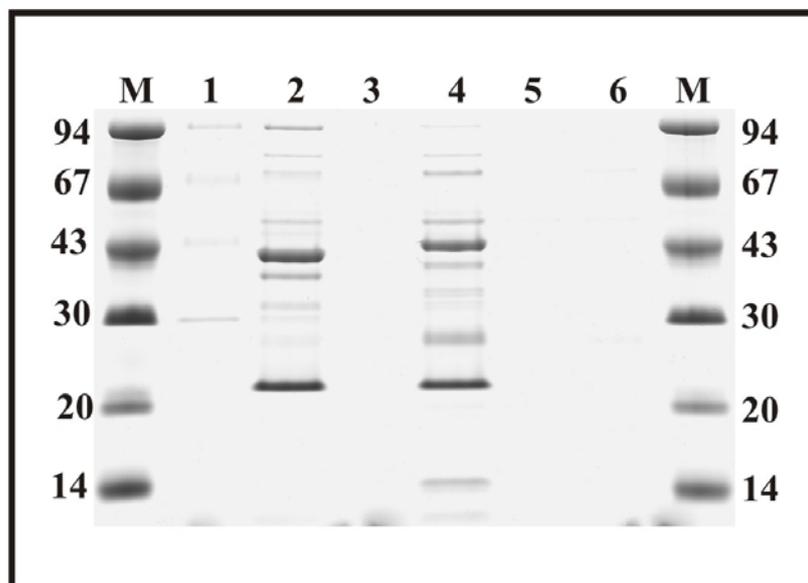


Abb. 3.4-5: SDS-PAGE der Präparation des NpSR_{II}/NpHTR_{II}/MCP2-Komplexes ohne und mit Induktion durch 1 mM IPTG. Bahn 1 und 2 zeigt das Eluat der Expression von NpSR_{II} und NpHtr_{II}/MCP2 102/233, ohne und mit Induktion. Bahn 3 und 4 zeigt Gleiches für die Expression von NpSR_{II} und NpHtr_{II}/MCP2 116/247. In Bahn 5 und 6 wurde das Eluat des wt-Stammes RP437 zur Kontrolle aufgetragen, ebenfalls ohne und mit Induktion.

Eine weitere Analyse der Banden durch einen Western Blot bestätigt die Vermutung, dass es sich im Bereich von ca. 42-45 kDa um das Fusionsprotein handelt. Dazu wurde eine weitere SDS-PAGE mit anschließendem Westerntransfer auf PVDF-Membran durchgeführt. Nach Inkubation mit dem primären anti-NpHtrII-AK sowie dem Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper erfolgte die Detektion über eine Chemiluminiszenz-Reaktion. Dabei ist die Chemoluminiszenz schon mit dem bloßen Auge wahrzunehmen, so dass eine geringstmögliche Belichtung des Röntgenfilms von 2 Sekunden ausreichte. Der Antikörper anti-NpHtrII-AK erkennt einen Bereich von 72 Aminosäuren im Transducer NpHtrII, der in den verwandten Chemorezeptoren des *E.coli* nicht vorkommt.

Auf dem Film sind Banden (Bahn 3 und 5) mit einem apparenten Molekulargewicht von ungefähr 42-45 kDa intensiv markiert. Es bestätigt sich also die Vermutung, dass es sich hier um die Fusionsproteine handelt. In den nicht induzierten Proben (Bahn 2 und 4) ist keine Markierung zu beobachten, was darauf hinweist, dass eine Basalexpression der Proteine nur sehr schwach vorhanden ist. Im Falle des Fusionsproteins NpHtrII/MCP2 116/247 kann eine starke proteolytische Degradation beobachtet werden die durch die Banden bei 32 kDa, 20 kDa und 10 kDa angezeigt wird. Neben den intensiven Signalen für die exprimierten Fusionsproteine treten bei ca. 75-85 kDa Kreuzreaktionen des primären Antikörpers gegen Komponenten des *E.coli* Zelllysats auf. Diese Kreuzreaktionen wurden bereits von Wegener (2000) beobachtet, beruhen allerdings nicht auf Reaktionen gegen Chemotaxisproteine aus *E.coli*, da diese ein apparentes Molekulargewicht von etwa 64 kDa in SDS-PAGE Analysen aufweisen (Morgan *et al.*, 1993). Bahn 1 zeigt als positive Kontrolle die Reaktion des Antikörpers auf NpHtrII₁₅₇. Dabei wird eine distinkte Bande bei 17-18 kDa beobachtet, die dem NpHtrII₁₅₇ mit dem errechneten Molekulargewicht von 17,2 zugeordnet werden kann.

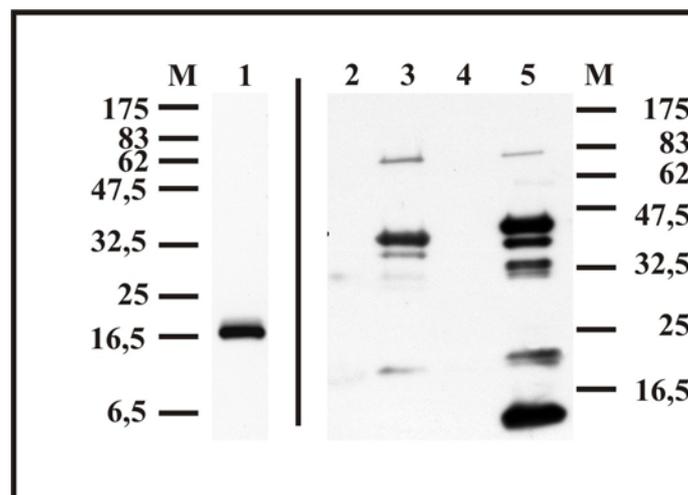


Abb. 3.4-6: Lumigramm des Immun-Nachweises mit dem Antikörper NpHtrII(77-149). Bahn 1 zeigt die positive Kontrolle mit NpHtrII₁₅₇. Bahn 2 und 3 zeigen jeweils die nicht induzierte und die induzierte Probe des Fusionsproteins NpHtrII/MCP2 102/233, Bahn 4 und 5 zeigt Gleiches für NpHtrII/MCP2 116/247.

3.4.4 Kontrollmessungen zur Phototaxis

Es konnten zwei Retinalproteine, HsSRI und HsSRII, identifiziert werden, die verantwortlich für die phototaktische Antwort des Archaeobakteriums *H. salinarum* sind. Die Kombination dieser Pigmente kontrolliert das Schwimmverhalten in unterschiedlichen Lichtverhältnissen (Übersichtsartikel (Oesterhelt und Marwan, 1990)). Später wurde das NpSRII auch in dem Archaeobakterium *N. pharaonis* gefunden (Bivin und Stoeckenius, 1986). Der Vergleich beider Proteine zeigte Ähnlichkeiten in Bezug auf biochemische und photochemische Eigenschaften (Scharf *et al.*, 1992). Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass es sich bei dem NpSRII um einen Photorezeptor handeln muss. Den Beweis lieferten Scharf und Wolff allerdings erst 1994 durch Phototaxis-Messungen im Dunkelfeld (Scharf und Wolff, 1994). Basierend auf dieser Methode (siehe auch 2.11.2) wurden in der vorliegenden Arbeit Phototaxis-Messungen mit *N. pharaonis* als positiver Kontrolle, *E. coli* RP437wt als negativer Kontrolle und den drei Mutationsstämmen durchgeführt. Dabei entsprechen die erhaltenen Werte in mV prozentual der Zellzahl, die mit 0-1 konstant gehalten wurde, um die einzelnen Messungen vergleichbar zu machen. Dabei steht 1 für den Anteil der Zellen, die sich zu Beginn der Messung im Spot befinden und 0 würde bedeuten, dass sich keine Zelle mehr darin befindet.

Um eine positive Vergleichskontrolle zu den folgenden Experimenten zu haben, wurden Phototaxismessungen mit *N. pharaonis* durchgeführt. Dazu wurden die Zellen wie in 2.4 beschrieben angezogen und auf Schwarmplatten selektiert. Allerdings war im Fall von *N. pharaonis* eine Selektion der Zellen auf Schwarmplatten nicht unbedingt nötig, die Zellen zeigten auch ohne Selektion eine Reaktion auf Licht. Mit Hilfe des beschriebenen Mikroskops sollte die phototaktische Reaktion der Zellen auf blau-grünes Licht der Wellenlänge 500 nm aufgezeichnet werden. Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der Zelldichte gegen die Zeit.

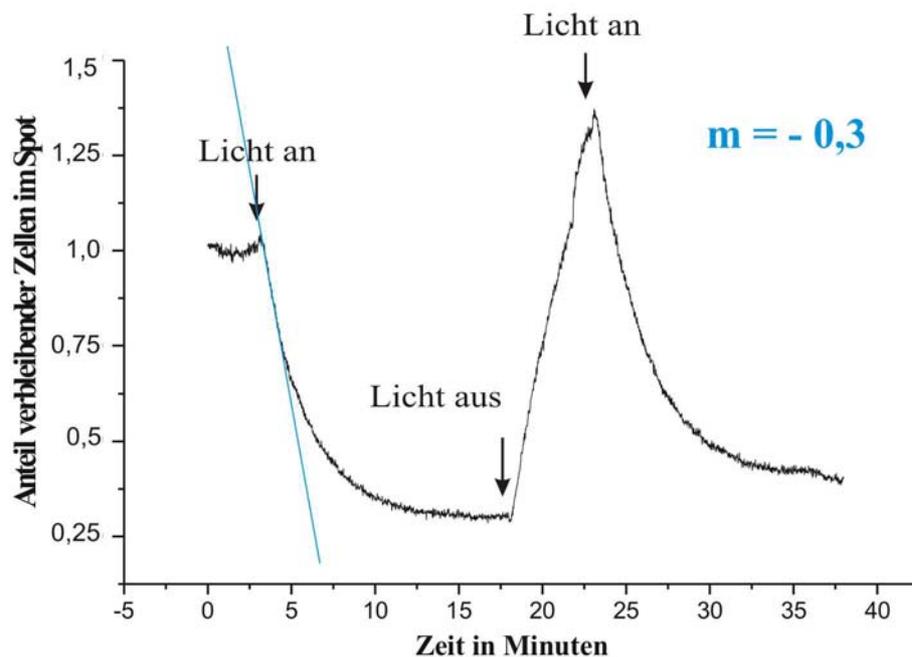


Abb. 3.4-7: Phototaxismessung von *N. pharaonis* als positive Kontrolle. Basislinienkorrigiert. Links: Nach drei Minuten wurden die Zellen mit blau-grünem Licht der Wellenlänge 500 nm bestrahlt. Nach 18 Minuten wurde das blaue Licht ausgestellt und nach weiteren 4 Minuten wieder angestellt. Farblich hervorgehoben ist die Anfangssteigung ($m = -0,3$).

Die Reaktion von *N. pharaonis* auf Licht der Wellenlänge 500 nm ist deutlich zu beobachten. Der Graph zeigt die dreiminütige Basislinie, die nach Bestrahlung mit blau-grünem Licht stark abfällt. Die Anfangssteigung in den ersten 1,5 Minuten erreicht den Wert von $-0,3$. Sobald das Licht wieder ausgeschaltet wurde, wanderten die Zellen wieder in den Spot ein, was durch das Ansteigen der Zelldichte gekennzeichnet ist. Bei erneuter Bestrahlung verließen sie den Spot erneut, die Zelldichte sinkt. Kurz nach Anschalten des blau-grünen Lichtes ist eine schnelle, kurze Steigung der Zellzahl zu beobachten, die sofort wieder sinkt. Gleiches kann man umgekehrt beim Ausschalten des Lichtes beobachten. Diese, sogenannten Overshoots, sind bereits für *H. salinarum* in der Literatur bekannt und

charakteristisch für das phototaktische Verhalten von Archaeobakterien (Stoeckenius *et al.*, 1988). Es ist jedoch nicht ganz geklärt wodurch diese Overshoots zustande kommen.

3.4.5 Phototaxismessungen von *E.coli* RP437-Chimären

Die Reaktion von *E. coli* Bakterien auf Licht bestimmter Wellenlänge wäre der erste Beweis für die erfolgreiche Einführung phototaktischer Eigenschaften. Nachdem bereits nachgewiesen wurde, dass die drei konstruierten RP437-Chimären die Fusionsproteine erfolgreich exprimieren, sollte nun das phänotypische Verhalten der Chimären analysiert werden. Im Falle eines korrekten Einbaus des Rezeptors und des Fusionsproteins in *E. coli* und einer gegebenen Signalweiterleitung, sollten die Zellen auf Licht der Wellenlänge 500 nm abweisend reagieren. Da die hergestellten Fusionsplasmide zwei Antibiotika-Resistenzen, Chloramphenicol und Tetrazyklin, tragen, und das Plasmid pETbmod-*npSR*II-His eine Ampicillin-Resistenz, wurde den Anzuchtmedien in allen drei Fällen entweder Chloramphenicol und Ampicillin oder Tetrazyklin und Ampicillin zugegeben. Chloramphenicol wird die Eigenschaft zugeschrieben die Biosynthese der genomischen DNA, nicht aber die der Plasmid-DNA zu behindern, somit Plasmid in der Zelle anzuheufen und sie zu schädigen (Stryer, Biochemie). Durch die Anzucht in zwei verschiedenen Medien sollte der eventuell schädigende Effekt durch Chloramphenicol beobachtet werden. Es konnte jedoch weder bei der bereits beschriebenen Proteinexpression mit anschließender Proteinpräparation noch bei den im folgenden beschriebenen Experimenten ein negativer Einfluss von Chloramphenicol festgestellt werden. Die Anzucht in unterschiedlichen Medien führte zu den gleichen Ergebnissen.

Weiterhin mussten die Zellen auf ihre „Schwimmfähigkeit“ untersucht werden, d.h. um Reaktionen auf Licht zu erhalten, musste gewährleistet sein, dass die Zellen überhaupt in der Lage sind, sich schnell fortzubewegen. Das wurde anhand der Chemotaxis überprüft. Dazu wurden jeweils einige Zellen der drei RP437-Chimären und RP437wt auf die Mitte einer Schwarmplatte gegeben und bei 30°C über Nacht (10-16 Stunden) inkubiert. Schwarmplatten werden aus Medium mit einem sehr geringen Anteil von Agar gegossen (0,3% statt 1,5%) und sind daher nicht fest, sondern gleichen eher einer viskosen Masse. Durch diese Viskosität sind die Bakterien in der Lage sich in der Agarmasse fortzubewegen. Die Bewegung ist leicht anhand eines entstehenden Kreises zu beobachten, der von der Mitte gleichmäßig nach außen läuft. Gibt man beispielsweise Asparaginsäure als Lockstoff ins Medium sieht man den für die Chemotaxis typischen distinkten weißen Ring am Rand des trüben Kreises. Die Bakterien wandern auf der Suche nach Nährstoffen von innen nach außen. Die besten „Schwimmer“ fressen den zugegeben Lockstoff weg und lassen somit eine Lücke zu den nachfolgenden Bakterien entstehen. Der Beobachter sieht

daher einen scharfen weißen Ring, dahinter ein dunkleren Ring indem sich noch keine Bakterien befinden und nachfolgend die restlichen Bakterien (siehe Abb. 3.4-8).

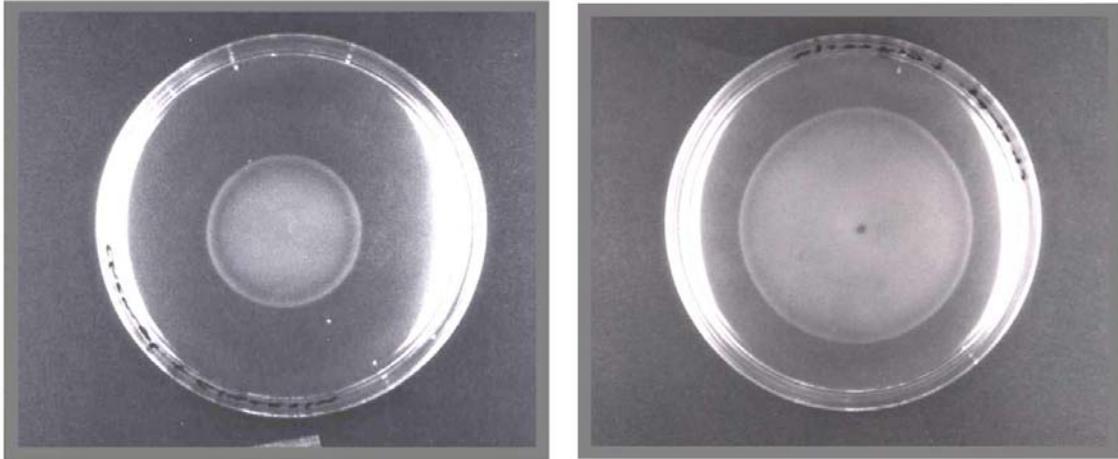


Abb. 3.4-8. Beispiel für den Nachweis von Chemotaxis in *E. coli* Bakterien. Links: Mutanten des Stammes RP437, die den Rezeptor NpSRII und das Fusionsprotein NpHtrII/MCP2-123/254 exprimieren. Rechts: Wildtyp RP437 Zellen. Die Bakterien wurden aus einer Flüssigkultur auf die Mitte einer Schwarmplatte mit asparaginsäurehaltigem Medium geimpft und für 10 Stunden (links), bzw. 14 Stunden (rechts) bei 37 °C inkubiert.

Die obere Abb. zeigt am Beispiel der Mutanten Rp437-NpHtrII/MCP2-123/254 und Rp437wt deutlich die Chemotaxisfähigkeit der Bakterien, die hier überprüft werden sollte. Die unterschiedliche Größe der Kreise liegt an der unterschiedlichen Inkubationsdauer der Platten und hat nichts mit der Schwimmfähigkeit zu tun. Gleiche Ergebnisse wurden auch für die Mutanten Rp437-NpHtrII/MCP2-1163/247 und Rp437-NpHtrII/MCP2-102/233 erhalten (Daten nicht gezeigt). Zur Selektion der Bakterien auf die besten „Schwimmer“ wurden von den inkubierten Platten am äußeren Rand Zellen entnommen und auf Schwarmplatten aus Minimalmedium geimpft. Das Bakterienwachstum ist auch hier von innen nach außen zu beobachten, allerdings bilden die Zellen keinen scharfen Rand. Es entsteht vielmehr ein diffuser Kreis, in dem die schnellsten „Schwimmer“ auf ihrer Suche nach Nahrung im äußeren Bereich zu finden sind. Dieser Vorgang wurde 4 bis 6 mal wiederholt, bis alle Zellen unter dem Mikroskop deutliche Bewegungsaktivität zeigten. Für die Aktivität der Zellen spielte es, entgegen den Erwartungen, keine Rolle ob Erlenmeyer-Kolben mit oder ohne Schikane benutzt wurden und ob bei 100 upm oder 130 upm geschüttelt wurde. In Trypton-Medium war erwartungsgemäß eine deutlich höhere Aktivität der Zellen im Vergleich zum 2 TY-Medium zu beobachten, da das Nahrungsangebot deutlich geringer war.

Für die Phototaxismessungen wurden alle chimären RP437-Mutanten wie in 2.11.2 beschrieben inkubiert und vorbereitet. Als negative Kontrolle wurden in Abb. 3.4-9 RP437wt-Zellen gemessen. Nach 5 Minuten wurden die Zellen mit blau-grünem Licht bestrahlt, das nach weiteren 5 Minuten wieder ausgeschaltet wurde.

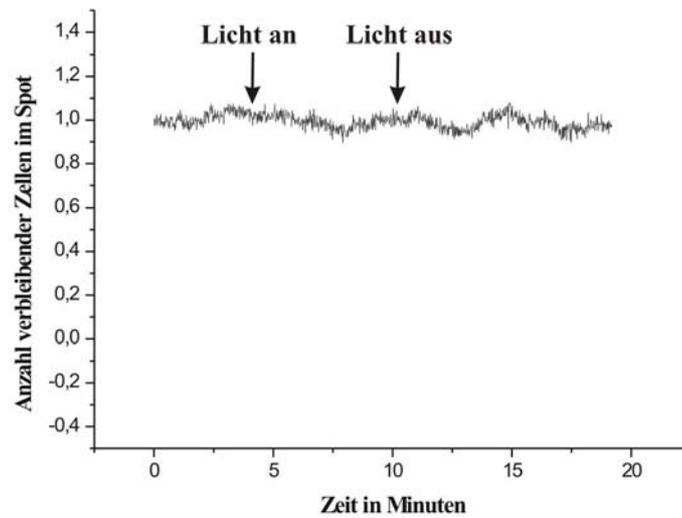


Abb. 3.4-9: Phototaxismessungen von *E. coli* RP437. Als negative Kontrolle wurden RP437wt-Zellen mit IPTG induziert und nach 2 Stunden gemessen.

Erwartungsgemäß zeigt sich kein Effekt durch Bestrahlung mit blau-grünem Licht. Während der Aufzeichnung eines Signals konnten apparativ bedingte Schwingungen mit einer Frequenz von 6 Minuten beobachtet werden, die auch in den folgenden Experimenten nicht ganz behoben werden konnte. Keine der 15 durchgeführten Messungen mit RP437wt-Zellen zeigte einen Effekt von blau-grünem Licht.

Im Folgenden wurden Phototaxismessungen mit den konstruierten Chimären durchgeführt. In den nachstehenden Experimenten sollte durch die beschriebene Expression der Fusionsproteine die Reaktionsfähigkeit auf Licht nachgewiesen werden. Dazu wurden die Zellen zunächst 2 Stunden nach der Induktion mit IPTG gemessen. In den in Abb. 3.4-10 gezeigten Experimenten wurde das Schwimmverhalten der RP437-Chimären in Reaktion auf die Bestrahlung mit blau-grünem Licht der Wellenlänge 500 nm verfolgt.

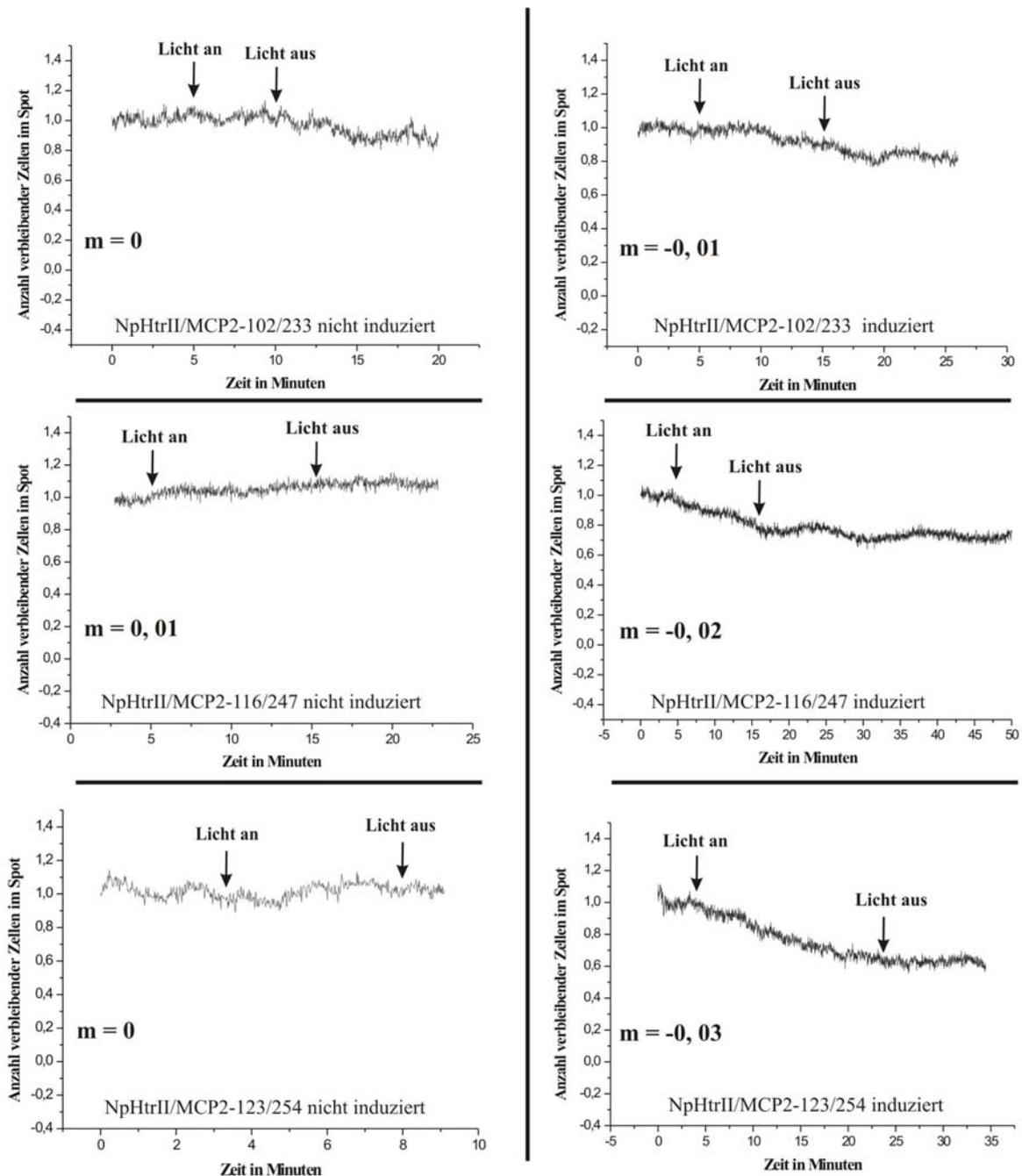


Abb. 3.4-10: Phototaxismessungen der RP347-Chimären. Links sind die Graphen der nicht induzierten Proben, rechts der induzierten Proben abgebildet. Die induzierten Zellen wurden 2 Stunden nach Induktion gemessen.

Zur Kontrolle der Basalexpression des Promotors wurden, neben den induzierten Zellen, auch nicht induzierte Zellen gemessen. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse einer Serie von Experimenten, in denen nicht induzierte Zellen und induzierte Zellen nach 2 Stunden Induktion gemessen wurden. Die gezeigten Ergebnisse zeigten eine geringe Schwankung der Basislinie während der ersten 5 Minuten, bei der es möglich war eine Reaktion zu ermitteln. Im Fall der nicht induzierten Zellen konnte keine Reaktion auf Licht beobachtet werden konnte. Die Basalexpression der Proteine reichte nicht aus um eine Reaktion der Zellen auf blau-grünes Licht zu vermitteln (Abb. 3.4-10). Das steht im Einklang mit der Beobachtung, dass ohne eine Überexpression der Proteine keine Aufreinigung des Rezeptors, bzw. der Fusionsproteine möglich war (Abbildung 3.4-5, Bahn 1 und 3). Für die Chimäre NpHtrII/MCP2 116/247 kann eine leichte Steigung ($m = 0,01$ Pro Minute) der Basislinie beobachtet werden, die jedoch über das Ausschalten des Lichtes hinaus besteht. Die Chimären NpHtrII/MCP2 101/233 und NpHtrII/MCP2 123/254 zeigen eine kontinuierliche Basislinie im Bereich von 1,0 der Zelldichte.

Eine zweistündige Induktion der Zellen mit IPTG zeigt im Fall der NpHtrII/MCP2-102/233 Chimäre keine signifikante Reaktion, während die beiden anderen NpHtrII/MCP2-116/247 und NpHtrII/MCP2-123/254 eine abstoßende Reaktion zeigen, d.h. sie verlassen den Spot. Mit einer berechneten Steigung von $-0,02$ pro Minute für NpHtrII/MCP2 116/247 und $-0,03$ pro Minute für NpHtrII/MCP2-123/254 ist die Reaktion im Vergleich zur positiven Kontrolle (Abb. 3.4-7) mit einer Steigung von $-0,30$ pro Minute um etwa eine Größenordnung schwächer. Ein weiterer Unterschied im Vergleich zur positiven Kontrolle ist, dass die Zellen nach der Bestrahlung nicht wieder in den Spot einwandern. Der Grund könnte in der geringen Lebensdauer der *E. coli* Zellen auf den Objektträgern liegen. Teilweise konnte schon nach bereits 10 Minuten ein deutlicher Rückgang der Bewegungsaktivität unter einen Lichtmikroskop beobachtet werden. Dies könnte auch eine Erklärung für das nur sehr schwache Signal sein. Wenn ein Großteil der Zellen schon zu Beginn absterben würde, wäre eine quantitative Aussage über die den Kreis verlassende Zellzahl nur begrenzt möglich. Weiterhin konnte unter dem Lichtmikroskop die bereits bekannte schädliche Wirkung von IPTG auf *E. coli* Zellen beobachtet werden. Sie verloren die Fähigkeit zur Zellteilung und es entstanden ungewöhnlich lange Zellen, die teilweise ein Zehnfaches der normalen Länge zeigten und somit in ihrer Bewegung erheblich eingeschränkt waren. Weiterhin kann eine überexprimierte Einlagerung von Membranproteinen die Zellen zusätzlich schädigen. Um diese Probleme zu minimieren wurden weitere Messungen durchgeführt mit einer verkürzten Induktionszeit von 20 Minuten und 40 Minuten. Außerdem wurde die Bestrahlung mit Licht nur 5 Minuten durchgeführt.

Eine Induktionszeit von 20 Minuten führte zu den gleichen Ergebnissen wie die Messungen ohne Induktion, d.h. man kann davon ausgehen, dass sich noch nicht genug Protein eingelagert hatte um ein Signal zu erzeugen.

Eine 40 minütige Induktion der Expression im Fall der beiden Konstrukte NpHtrII/MCP2-101/233 und NpHtrII/MCP2-116/247 liefert vergleichbare Ergebnisse zu den bereits erhaltenen Daten. Wie in Abb. 3.4-11 zu sehen ist, zeigt NpHtrII/MCP2-101/233 auch diesmal keine Reaktion auf die Bestrahlung, während NpHtrII/MCP2-116/247 ein schwaches Signal zeigt mit einer Steigung von $-0,02$ pro Minute zeigt.

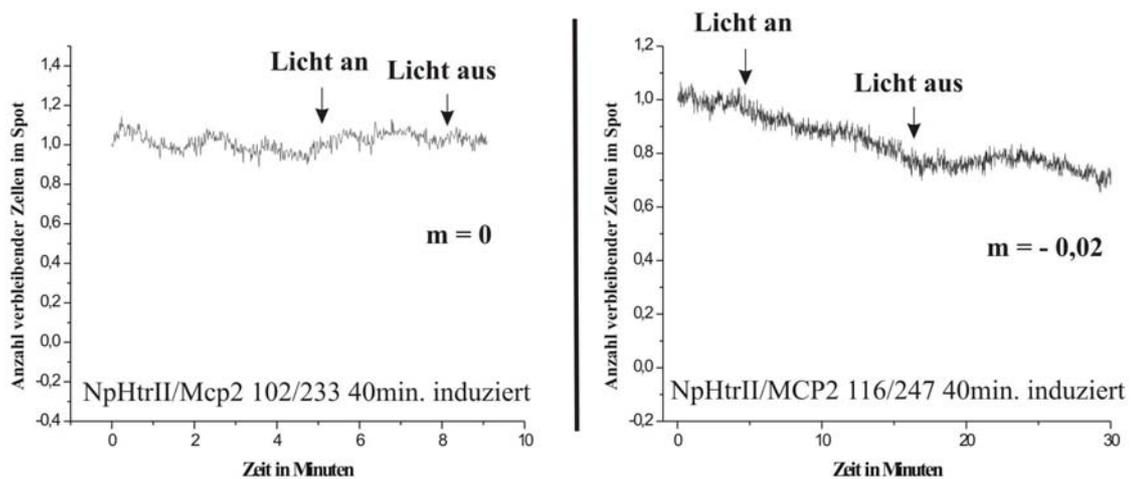


Abb. 3.4-11: Phototaxismessungen von NpHtrII/MCP2-101/233 und NpHtrII/MCP2-116/247 nach 40 Minuten Induktion.

Die RP437-Chimäre NpHtrII/MCP2-123/254 zeigt jedoch nach 40 minütiger Induktion ein deutlich stärkeres Signal als bisher beobachtet. Wie in Abb. 3.4-12 zu sehen, wurden die Zellen für 5 Minuten mit blau-grünem Licht bestrahlt. Die Zelldichte sinkt sofort nach Einschalten des Lichtes. Es kann eine Steigung von $-0,06$ berechnet werden. Das beträgt $1/3$ der Steigung der positiven Kontrolle (Abb. 3.4-7). Nach Ausschalten des Lichtes wird kein weiterer Abfall beobachtet, die Zellzahl bleibt auf einem konstanten Level.

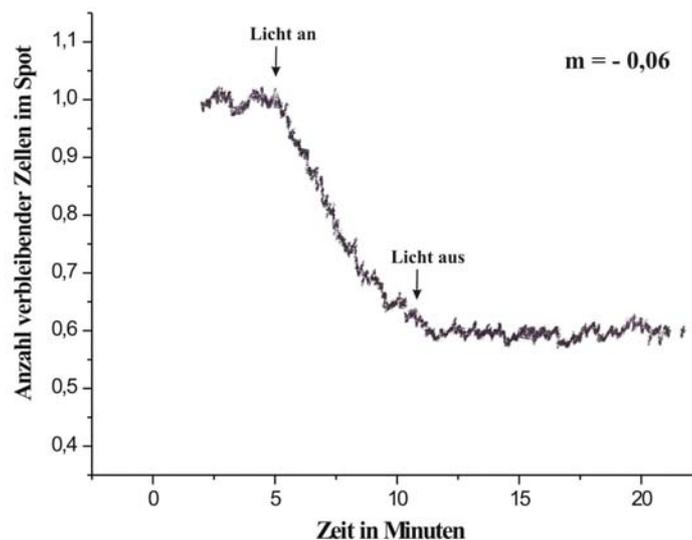


Abb. 3.4-12: Phototaxismessung der RP437-Chimäre NpHtrII/MCP2-123/254 nach 40 Minuten Induktion. m gibt die Steigung zwischen der Bestrahlung mit Licht an.

Wird die Bestrahlung eingestellt bleibt der Anteil der Zellen im Spot nach kurzer Zeit konstant bei 0,6 stehen. Eine Einwanderung in den Spot kann nicht beobachtet werden. Der Grund liegt vermutlich trotz der verkürzten Induktionszeit an der mangelnden Beweglichkeit der Zellen. Nach der Messung wurden die Zellen unter einem normalen Lichtmikroskop beobachtet und 90% der Zellen hatten ihre Bewegungsaktivität eingestellt, bzw. waren tot.

Zusammenfassend zeigt die Chimäre NpHtrII/MCP2-102/233 keine, die Chimäre NpHtrII/MCP2-116/247 eine sehr schwache abstoßende und die Chimäre NpHtrII/MCP123/254 eine stärkere abstoßende Reaktion auf blau-grünes Licht.

3.4.6 Messung der Methanolfreisetzung

Die Methylierungsdomäne ist im zytoplasmatischen Teil von archaebakteriellen Transducern und bakteriellen Chemorezeptoren für die Adaptation gegenüber konstanten Bedingungen verantwortlich. Die Adaptation korreliert mit dem Methylierungslevel der Transducer / Rezeptoren. Eine Zunahme der Methylierung korreliert dabei mit der Adaptation auf einen positiven Reiz, eine Abnahme der Methylierung mit der Adaptation auf einen negativen Reiz (Kehry *et al.*, 1984). Methylgruppen werden dabei von S-adenosylmethionin auf die γ -carboxylgruppe eines bestimmten Glutaminsäurerestes der Methylierungsdomäne des Rezeptors übertragen. Der Tsr-Rezeptor besitzt fünf solcher Methylierungsstellen, der Tar- und der Trg-Rezeptor jeweils vier (Kehry *et al.*, 1984). Für die Transducer HsHtrI und HsHtrII aus *Halobacterium salinarum* konnten fünf Methylierungspaare, bzw. ein Methylierungspaar nachgewiesen werden (Perazzona und Spudich, 1999). Die Methylierungsstellen liegen in einer stark konservierten Region. Die Konsensussequenz für die eubakterielle Methyltransferase lautet (Terwillinger *et al.*, 1986) A/-/S; X, X; E; E; X; A/T/S; A; A/T/S wobei anstelle der Glutaminsäure (E) ein Glutamin (Q) stehen kann, welches vor der Methylierung deamidiert wird. Diese Konsensus-Sequenz ist in ähnlicher Form auch in den archaebakteriellen Transducern vorhanden (Perazzona und Spudich, 1999). Die Methylgruppen werden durch eine chemotaxisspezifische Methyltransferase CheR übertragen. Hydrolyse des Glutamylmethylesters wird durch das CheB (Methylesterase) Genprodukt katalysiert, es entsteht dann Methanol und freies γ -carboxyl der Glutaminsäure. Die Methylierung durch CheR (Methyltransferase) erfolgt konstitutiv, während die Demethylierung von CheA abhängt.

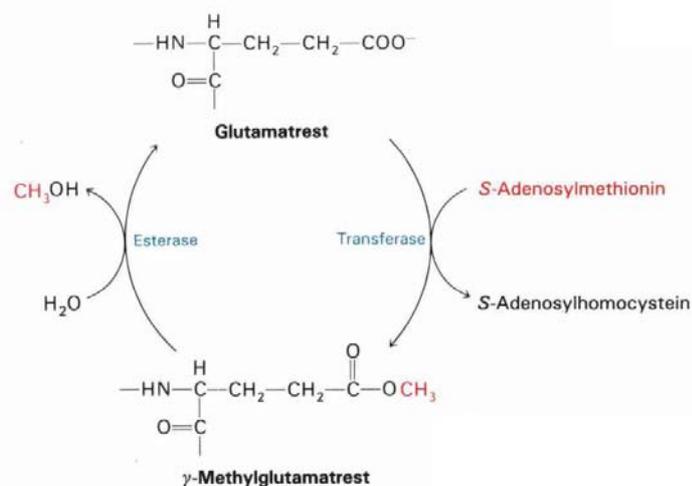


Abb. 3.4-13: Die reversible Methylierung von Glutamatresten in der zytosolischen Domäne von Methylokzeptor-Chemotaxis-Proteinen

Auf der Basis dieser Erkenntnisse sollte nach Kehry *et al.* (1984) die Methylesteraseaktivität über die Methanolfreisetzung verfolgt werden. Dazu wurden die Zellen wie in 2.9.4 beschrieben in Medium mit (H^3)-markiertem Met inkubiert und auf einen Filter aufgetragen. Da die Chimäre NpHtrII/MCP2-123/254 das stärkste Signal in den Phototaxismessungen gezeigt hat, wurden nur mit ihr die folgenden Experimente durchgeführt. In einem ersten Kontroll-Experiment, welches die Methylierung/Demethylierung in der Chemotaxis untersucht, wurden RP437wt-Zellen und die Chimäre NpHtrII/MCP2-123/254 nach Zugabe von $120\mu Ci$ (H^3)-Methionin 40 Minuten bei $30^\circ C$ im Wasserbad inkubiert und anschließend zentrifugiert. Von nun an wurde nur noch mit Puffern gearbeitet, die nicht radioaktives Methionin enthielten. Die Zellen wurden in 1 ml Puffer ohne Lockstoff (Serin) aufgenommen und auf einen Filter gegeben. Nach achtminütigem Waschen (siehe Material und Methoden 2.9.4) wurden die Fraktionen 60 Minuten lang in einem Fraktionssammler gesammelt. Von 12 - 20 und 36 - 42 Minuten wurde der Puffer jeweils durch Puffer mit Lockstoff (Serin) ersetzt. In der ersten Messung wurde alle 0,6 Minuten eine neue Fraktion gesammelt, in allen folgenden Experimenten schien eine Fraktion pro Minute ausreichend. Die einzelnen Reaktionsgefäße wurden in Scintillationsgefäßen mit 4 ml Scintillationsflüssigkeit gesammelt und über Nacht bei $35^\circ C$ schüttelnd inkubiert. Da Methanol flüchtig ist, steigt es aus dem Reaktionsgefäß auf und löst sich in der umgebenden Szintillationsflüssigkeit. Am nächsten Morgen wurde die Radioaktivität gemessen und graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Als Vergleich wurde eine negative Kontrolle mit RP437-Zellen durchgeführt, die ohne den Austausch der Puffer gemessen wurden.

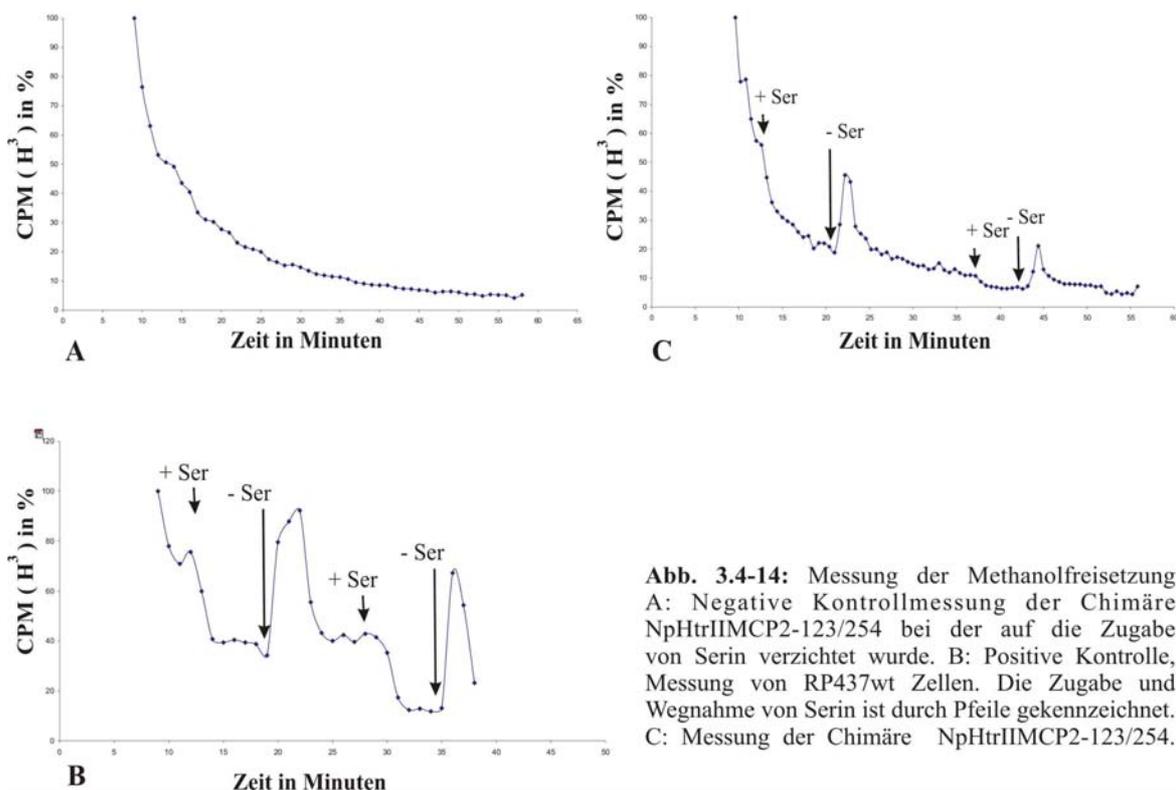


Abb. 3.4-14: Messung der Methanolfreisetzung
 A: Negative Kontrollmessung der Chimäre NpHtrII/MCP2-123/254 bei der auf die Zugabe von Serin verzichtet wurde. B: Positive Kontrolle, Messung von RP437wt Zellen. Die Zugabe und Wegnahme von Serin ist durch Pfeile gekennzeichnet. C: Messung der Chimäre NpHtrII/MCP2-123/254.

Durch die konstitutive Methylierung/Demethylierung des Rezeptors wird das zuvor eingebaute, markierte (H^3)-Met wieder abgebaut und durch nicht markiertes ersetzt. Dies ist hier sehr anschaulich in der negativen Kontrolle dargestellt (A). Da nur das entstehende, markierte Methanol gemessen werden kann, ist der Anteil zu Beginn der Messung noch sehr hoch und wird immer mehr durch nicht markiertes Methanol ersetzt. Diese abfallende Tendenz war in allen Messungen deutlich zu beobachten. Durch Zugabe eines positiven Stimulus, wie z.B. Serin oder Asparaginsäure, wird die Histidinkinase CheA runterreguliert. Das führt zur Inhibierung der Demethylierung (und somit der Freisetzung von Methanol), während die Methylierung konstitutiv bleibt. Das bedeutet, dass im Überstand kein Methanol gemessen werden sollte. Ein negativer Stimulus (z.B. die Wegnahme eines positiven Stimulus) führt zur Aktivierung der Histidinkinase und somit zur Aktivierung der Esterase. Das bedeutet, dass der Gehalt an Methanol im Überstand ansteigen sollte. Die positive Kontrolle (B) zeigt nach Zugabe von Serin einen, durch die fehlende Demethylierung hervorgerufenen, deutlich stärkeren Abfall des im Medium vorhanden radioaktiven Methanols im Vergleich zur negativen Kontrolle. Tauscht man dem Puffer mit Serin gegen solchen ohne Serin, wird ein kurzzeitig starker Anstieg der Methanolkonzentration beobachtet. Anhand der Methanolfreisetzung kann somit indirekt auf die Aktivität, bzw. Inaktivität der Methylesterase geschlossen werden, die wiederum durch die aktive Histidinkinase aktiviert wird. Ein positiver Stimulus führt in der bakteriellen Chemotaxis zu einer inaktiven Histidinkinase, die somit nicht in der Lage ist die Esterase zu aktivieren. Somit ist die Demethylierung inhibiert. Da auch die Chimäre NpHtrII/MCP2-123/254 einen deutlich stärkeren Abfall des radioaktiven Methanols in Folge eines positiven Stimulus zeigte und auch ein Anstieg durch einen negativen Stimulus beobachtet werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Chemotaxis durch die Überexpression der Phototaxisproteine nicht beeinträchtigt wurde (C).

Im Folgenden sollte die Methanolfreisetzung der RP437-Chimäre NpHtrII/MCP2-123/254 in der Phototaxis gemessen werden. Als negatives Signal diente hier nicht die Wegnahme des Lockstoffes, wie in den Messungen zur Chemotaxis, sondern die Bestrahlung mit blauem Licht. Dazu wurden die Zellen genau wie die oben beschriebenen RP437wt-Zellen behandelt und auf einen Filter aufgetragen. Jede Minute wurde eine Fraktion gesammelt und über Nacht in Szintilationsflüssigkeit inkubiert. Abwechselnd wurde, wie durch die Pfeile markiert, mit blau-grünem Licht bestrahlt.

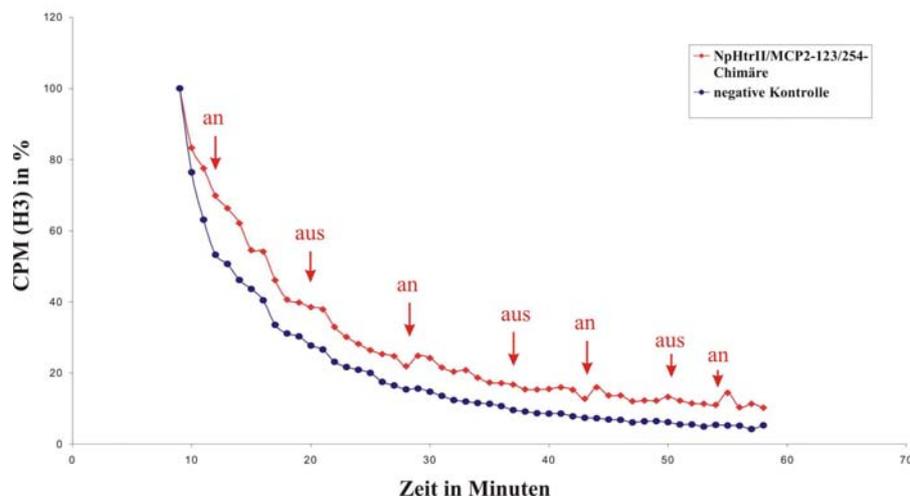


Abb. 3.4-15: Messung der Methanolfreisetzung der RP437-Chimäre NpHtrII/MCP2-123/254. Die Pfeile markieren die Punkte, an denen das blau-grüne Licht (500 nm) ein-, bzw. ausgeschaltet wurde. Negative Kontrolle aus Abb. 3.4-14, A (blau): Messung der RP437-Zellen ohne Austausch der Puffer.

Als direkter Vergleich wurde die negative Kontrolle aus Abb. 3.4-14 A dem oberen Graphen zugefügt. Der Vergleich beider Graphen macht deutlich, dass die Chimäre *E. coli* NpHtrII/MCP2-123/254 unter diesen Bedingungen keine Reaktion auf Licht zeigt oder diese nicht mit einer Änderung des Methylierungslevels einhergeht. Perazzona und Spudich konnten 1999 nachweisen, dass das Maß der Methylierung von HsHtrI nicht durch Licht beeinflusst wird. Obwohl konservierte Methylierungsstellen gefunden wurden, zeigt *H. salinarum* zwar eine der Phototaxis entsprechende Schlagumkehr der Flagellenmotoren, jedoch bleibt das Maß der Methylierung konstant. Zwar wird im Fall von HsHtrII das Methylierungslevel durch Licht beeinflusst, aber eine Deletion aller Methylierungsstellen verhindert nicht die Adaptation (Perazzona und Spudich, 1999).

4 Diskussion

Die Signaltransduktion in der Phototaxis des Archaeobakteriums *Natronobacterium pharaonis* beginnt mit der Aufnahme eines Lichtreizes durch das sensorische Rhodopsin II. Die Weiterleitung des Signals erfolgt über Interaktionen des Rezeptors mit der Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers (RBD-T), wodurch eine Zwei-Komponenten-Signalkaskade im Inneren der Zelle ausgelöst wird. Grundlage für das Verständnis der primären Signalweiterleitung ist die Kenntnis über den genauen Bereich der Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers.

Basierend auf den Ergebnissen von Photostrom-Messungen wurden verkürzte Fragmente des Transducers ausgewählt, um anhand von Bindungsstudien den Bereich der Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers zu bestimmen. Weiterhin wurden Positionen ausgewählt an denen Mutationen in die transmembranen Bereiche beider Proteine eingeführt werden sollten, um die Rolle dieser Bereiche bei der Komplexbildung zu definieren. Des Weiteren sollten die stöchiometrischen Verhältnisse der verkürzten Fragmente, sowie die Oligomerisierung analysiert werden. Notwendige Voraussetzung für die Untersuchungen war die Klonierung, die präparative Darstellung und Isolierung der verkürzten Transducer. Die erhaltenen Daten sollten thermodynamisch betrachtet und mit bereits vorhandenen Daten verglichen werden. Dabei wurde der Einfluss von pH-Wert und Ionenstärke mit einbezogen. Anhand des Bindungsverhaltens der verschiedenen Transducer-Fragmente an den Rezeptor konnte ein Modell der Rezeptor-Bindungsdomäne aufgestellt werden. Die sich hieraus ergebenden Informationen über die Interaktion des Transducers mit dem Rezeptor könnten zudem weitere Hinweise auf einen möglichen Mechanismus der Signalverstärkung liefern.

Aufgrund der bestehenden Homologie der archaeobakteriellen Phototaxis zur eubakteriellen Chemotaxis und basierend auf den erhaltenen Erkenntnissen über die Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers, sollte ein phototaktisch sensibles *E. coli* Modellsystem entwickelt werden. Als Grundlage hierfür wurden Fusionsproteine aus dem archaeobakteriellen Transducer (NpHtrII) und dem eubakteriellen Chemotaxis-Rezeptor (MCP2) kloniert, exprimiert und auf ihre Bindung zu dem archaeobakteriellen Rezeptor hin untersucht. Die Fusionsproteine wurden daraufhin in *E. coli* RP437 überexprimiert und auf die Fähigkeit zur Vermittlung von Phototaxis hin untersucht.

4.1 Die Rezeptor-Bindungs-Domäne des archaebakteriellen Transducers

Auf Grundlage der Kristallstruktur des NpSRII/NpHtrII₂₄₋₈₂ Komplexes (Gordeliy *et al.*, 2002) sind in der folgenden Abbildung die Schnittpositionen der verwendeten Transducer-Varianten zur Übersicht verdeutlicht.

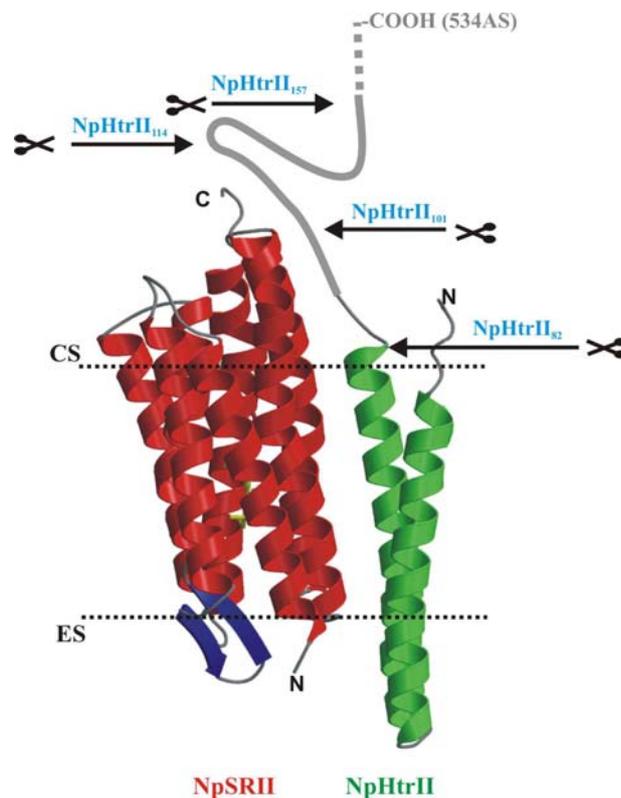


Abb. 4.1-1: Die Kristallstruktur von NpSRII und NpHtrII₂₄₋₈₂ (Gordeliy *et al.*, 2002). Die zyttoplasmatische Domäne wird durch den grau gezeichneten Abschnitt symbolisiert. Die Schnittpositionen der verkürzten Transducer sind durch Pfeile markiert.

Die Fragmente NpHtrII₁₅₇ und NpHtrII₁₁₄ tragen einen aus der Membran herausragenden zyttoplasmatischen Teil und sind hier von Interesse, da ihnen die Fähigkeit zugeschrieben werden kann, wie der komplette Transducer, eine intrinsische Protonenpumpaktivität des Rezeptors zu inhibieren (siehe Abb. 2.1-10, Schmies, 2000). Die intrinsische Protonenpumpaktivität konnte nicht nur für das NpSRII, sondern auch für das SRI nachgewiesen werden (Bogomolni *et al.*, 1994; Schmies, 2000). Die genaue Art der Wechselwirkung des Transducers mit dem Rezeptor ist dabei allerdings noch nicht eindeutig geklärt. Bogomolni *et al.* (1994) beobachten eine komplette Hemmung des Protonenpumpens durch die Bindung des HtrI. Weil zudem im SRI/HtrI-Komplex die Kinetik der SB-Reprotonierung (M-Zerfall) ihre pH-Abhängigkeit verliert, spekulieren Spudich und Mitarbeiter, dass HtrI den zyttoplasmatischen Protonenkanal blockiert

(Spudich und Spudich, 1993; Spudich, 1994). Haupts *et al.* (1996) beobachteten im Gegensatz dazu allerdings keine Inhibierung des Protonenpumpens, sondern eine Umkehr des auswärtsgerichteten Protonenstromes. Die Ergebnisse von Bogomolni konnten später durch Schmies bestätigt werden, der in Voltage Clamp-Messungen eine Inhibierung des Protonenstromes durch den kompletten Transducer, sowie durch die verkürzten Fragmente NpHtrII₁₅₉, NpHtrII₁₁₃ beobachten konnte (Schmies, 2000).

Dagegen wurde die Eigenschaft des Transducers den Protonenstrom des Rezeptors zu inhibieren durch eine Verkürzung auf 82 Aminosäuren zerstört (Schmies, 2000). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass dem Transducer-Fragment von AS 82-114 eine besondere Rolle bei der Interaktion von Rezeptor und Transducer zukommt. Setzt man eine Korrelation der Inhibierung der Pumpaktivität mit der Bindung an den Rezeptor voraus, wie es auch für das SRI spekuliert wird (Spudich und Spudich, 1993; Spudich, 1994), könnten die Transducer-Fragmente eine wichtige Rolle bei Untersuchungen zur RBD-T spielen. NpHtrII₈₂ beinhaltet lediglich den Bereich von AS 1 bis AS 82, d.h. die beiden transmembranen Domänen, nicht aber den zytoplasmatischen Teil. Bindungsstudien mit diesem Transducer-Fragment geben nicht nur Aufschluss darüber, ob eine fehlende Inhibierung mit einer fehlenden Bindung einhergeht, sondern zeigen auch, ob die beiden Transmembrandomänen alleine ausreichen, um eine Bindung an den Rezeptor zu vermitteln.

Zur weiteren Eingrenzung der RBD-T wurde das vierte Fragment NpHtrII₁₀₁ gewählt, welches ein kurzes Stück der Linker-Region des zytoplasmatischen Teiles trägt (siehe Abb. 2.1-8). Dieser Teil beinhaltet nach Sekundärstruktur-Vorhersagen (Wegener, 2000; Klare, 2002) eine amphiphatische α -Helix. Dieses amphiphatische Sequenzmotiv konnte auch für den Aspartatrezeptor, (Butler und Falke, 1998) und für andere Sensorproteine und Chemorezeptoren identifiziert werden (Williams und Stewart, 1999). Seine Rolle in der Komplexbildung oder der Signalweiterleitung ist aber bislang unklar.

Da bisher kein geeignetes Expressionssystem in *N. pharaonis* zur Verfügung steht, wurden die archaeobakteriellen Proteine in der vorliegenden Arbeit heterolog in *E. coli* exprimiert. Darüber hinaus ermöglicht die Expression in *E. coli* eine schnellere Zugänglichkeit für genetische Untersuchungen. Die Expression und die Reinigung von NpSR_{II} und NpHtrII₁₅₇, sowie der in dieser Arbeit konstruierten verkürzten Transducer und den hergestellten Mutanten beider Proteine, erfolgte nach den Methoden von Shimono *et al.* (1997) und Hohenfeld *et al.* (1999) (siehe 2.9.2). Das für den Rezeptor NpSR_{II} getrennt zugegebene Retinal wurde bei der Expression zusammen mit dem Opsin als Rhodopsin in die Membran eingebaut (Hohenfeld *et al.*, 1999). Der vollständige Transducer stand für die Untersuchungen nicht zur Verfügung, da es bei der Induktion und Proteinexpression zu

proteolytischer Degradation und starker Aggregation kam (Wegener, 2000). Auch Sudo und Kamo konnten das gesamte NpHtrII nicht erfolgreich präparieren (Sudo *et al.*, 2001a). Für die früher durchgeführten Untersuchungen am Rezeptor/Transducer-Komplex wurde daher der verkürzte Transducer NpHtrII₁₅₇ verwendet (Wegener, 2000), der auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde.

Vergleicht man die Präparation der verkürzten Transducer NpHtrII₁₁₄, NpHtrII₁₀₁ und NpHtrII₈₂ mit NpHtrII₁₅₇ oder NpSRII, ergeben sich keine Unterschiede in der Reinheit der Proteine, jedoch weichen die Ausbeuten deutlich voneinander ab. Für das NpSRII und seine Mutanten konnte eine Proteinmenge von 1 mg pro Liter Bakterienkultur isoliert werden, was in der gleichen Größenordnung liegt wie bei Hohenfeld *et al.* (1999) angegeben. Die Ausbeuten der Transducer-Fragmente NpHtrII₁₁₄ und NpHtrII₁₅₇ stimmten mit 3 mg/L Bakterienkultur mit den Ergebnissen für NpHtrII₁₅₇ von Wegener (2000) überein. Für die kürzeren Transducer NpHtrII₁₀₁ und NpHtrII₈₂ konnte jedoch maximal eine Ausbeute von 0,5 mg/L Bakterienkultur erzielt werden, was vermutlich auf die Bildung von „inclusion bodies“ zurückzuführen war, die sich auch durch die Zugabe höherer DDM-Konzentrationen nicht mehr auflösen ließen.

Um einen ersten Eindruck über die vorliegenden stöchiometrischen Verhältnisse der verkürzten Transducer zum Rezeptor zu gewinnen, wurde die Komplexbildung der verkürzten Transducer mit dem Rezeptor durch Blau-Native-Polyacrylamid-gelelektrophorese (BN-PAGE) analysiert. Die Ergebnisse der BN-PAGE's der Transducer NpHtrII₁₅₇ und NpHtrII₁₁₄ mit dem Rezeptor zeigen die Bildung oligomerer Formen. Diese Oligomerisierung ist reversibel, denn die beobachteten Dimere, Trimere und Tetramere werden durch die Bildung des NpSRII/NpHtrII-Komplexes aufgelöst. Im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 sind alle oligomeren Formen aufgelöst und die Komplexbande ist vorherrschend. Eine Verkürzung des Transducers auf 101 und 82 Aminosäuren zeigt ebenfalls eine Oligomerisierung der einzelnen Proteine, verhindert aber die Ausbildung eines Rezeptor/Transducer-Komplexes. Somit lassen die Daten neben einer 1:1 Stöchiometrie der bindenden Transducer-Fragmente auf eine besondere Rolle des Bereiches von AS 101 bis AS 114 schließen. Die erhaltenen Daten stehen im Einklang mit BN-Ergebnissen von Wegener, der die Ausbildung eines Rezeptor-Transducer-Komplexes bereits für den Transducer NpHtrII₁₅₇ zeigen konnte. Weiterhin konnte für das NpSRII und das NpHtrII₁₅₇ durch Gelfiltration eine Oligomerisierung festgestellt werden (Wegener, 2000), die durch DLS bestätigt werden konnte (Tudor Savopol, pers. Mitteilung). Die dabei gebildete Spezies zeigte ein Molekulargewicht, das mit dem eines 1:1 Komplexes in Einklang zu bringen war. Darüber hinaus konnte eine 1:1 Stöchiometrie im solubilisierten Zustand auch von Sudo *et al.* (2001a) gezeigt werden.

Durch Isotherme-Titrations-Kalorimetrie (ITC) konnten die erhaltenen Daten quantitativ untersucht werden. Ein großer Vorteil der ITC ist, dass keine Immobilisierung oder Markierung der Bindungspartner nötig ist, auf die z.B. bei Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Immobilisierung an einen Goldfilm; Khilko *et al.* (1993)) gar nicht, und bei der Sedimentationsgleichgewichts-Zentrifugation (Farbstoffmarkierung; (Fleming, 2000)) nur schwer verzichtet werden kann. Theoretisch ist es möglich die Bindung von jedem Liganden an jedes Makromolekül zu messen. Die Messungen können bei unterschiedlichen Temperaturen und unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt werden und man erhält nicht nur die Zahl der Bindungsstellen und den K_{ass} -Wert, sondern auch ΔH . Ein Nachteil dieser Methode liegt allerdings in dem hohen Proteingehalt der Probe, der für eine ITC-Messung nötig ist.

Das Resultat einer 1:1 Stöchiometrie und einer schwächeren, bzw. fehlenden Komplexbildung der Transducer NpHtrII₁₀₁ und NpHtrII₈₂ wird auch durch die ITC bestätigt. Der ermittelte Wert der Dissoziationskonstante liegt für den Komplex aus dem Rezeptor NpSRII und dem Transducer NpHtrII₁₅₇ bzw. NpHtrII₁₁₄ bei 160 nM bzw. 240 nM. Somit werden ältere Ergebnisse des K_D -Wertes für die Bindung von NpHtrII₁₅₇ mit NpSRII bestätigt (Wegener, 2000). Sudo und Mitarbeiter konnten für einen verkürzten Transducer NpHtrII₁₅₉ und den Rezeptor eine Dissoziationskonstante von 15 μM beobachten (Sudo *et al.*, 2002). Dazu titrierten die Autoren eine definierte Menge des verkürzten Transducers mit dem Rezeptor und ermittelten die Rate des M-Zerfalls in den verschiedenen molaren Verhältnissen. Auf den ersten Blick widerspricht die gefundene erheblich schwächere Bindung von Rezeptor und Transducer NpHtrII₁₅₉ dem hier ermittelten K_D -Wert von ~ 160 nM. Da die Autoren allerdings die Bindungsaffinität anhand von Vergleichen des M-Zerfalls ermittelten, handelte es sich nicht um den Grundzustand, sondern um das M-Intermediat des Rezeptors. Dies würde die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse unterstützen, da die stärkere Affinität der Proteine im Ausgangszustand eine Rückkehr des aktivierten M-Intermediates in den Ausgangszustand fördern könnten.

Weitere ITC-Experimente zeigen, dass die Bindung des kürzeren Transducers NpHtrII₁₀₁ mit der Dissoziationskonstanten von 10 μM signifikant schlechter ist und eine Bindung des Fragmentes NpHtrII₈₂ an den Rezeptor nicht stattzufinden scheint (siehe Abb. 3.3-1). Diese Ergebnisse stehen mit den Daten der BN-PAGE im Einklang, bei denen die kürzeren Transducer-Fragmente keine Komplexbande zeigten. Somit kann der zytoplasmatische Teil der Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers auf die ersten 114 AS eingegrenzt werden.

Im Vergleich sind die bereits beschriebenen Photostrom-Messungen zu sehen, die an mikroinjizierten Oocyten durchgeführt wurden. Diese Methode wurde von Schmies (2000) für elektrophysiologische Untersuchungen an Wechselwirkungen von Rhodopsinen mit ihren Transducer für die Photorezeptoren SRI und SRII genutzt. Parallel zu dieser Arbeit wurde der auf 101 Aminosäuren verkürzte Transducer mit NpSRII in Oocyten exprimiert und der Photostrom des Rezeptors gemessen (Mreyen *et. al.*, 2003). Dieses Fragment reichte nicht aus, um die intrinsische Protonenpump-Aktivität zu inhibieren. Die im Vergleich zu den längeren Transducern gefundene, schwächere Bindung des NpHtrII₁₀₁ an den Rezeptor könnte dafür verantwortlich sein und wird weiter unten diskutiert.

Da es nach jeder Zugabe des Rezeptors zum Transducer sehr lange bis zur Einstellung des Gleichgewichtes dauerte, musste die Intervalldauer der einzelnen Titrations auf 5 Minuten gesetzt werden. Die in den BN-PAGE's nachgewiesene Oligomerisierung von Transducer und Rezeptor spielt hierbei vermutlich eine große Rolle. Die gebildeten oligomeren Formen müssen erst aufgelöst werden, um die Voraussetzung der Komplexbildung zu schaffen. Im Gleichgewichtsfall würden diese dann in Konkurrenz zur Komplexbildung stehen, d.h. die reagierenden Monomerkonzentrationen wären kleiner als erwartet. Die ermittelte Dissoziationskonstante kann daher als obere Grenze angesehen werden. Die gleichen Einschränkungen können auch für die folgende thermodynamische Interpretation der Daten gemacht werden.

Die thermodynamische Charakterisierung von Membranproteinen gestaltet sich komplizierter als die löslicher Proteine. Popot und Engelman stellten ein Zwei-Stufen-Modell der Membranproteinfaltung vor (Engelman *et al.*, 1990). In einem ersten Prozess dringt die Polypeptidkette eines ungefalteten Proteins, getrieben durch den hydrophoben Effekt, in die Membran ein und bildet eine α -Helix aus. Das Protein befindet sich dann in einem experimentell nachgewiesenem Übergangszustand. Erst in einem zweiten Prozess assoziieren die α -Helizes des Proteins zu typischen Helix-Bündeln. Da der hydrophobe Effekt für diesen Übergang nicht von Bedeutung ist, ist die Änderung der Wärmekapazität gering. Folglich sind derzeit nur wenige Daten, die durch Sedimentations-Gleichgewichts-Zentrifugation erhalten wurden, verfügbar (Übersichtsartikel: (Fleming, 2000)).

Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Dimerisierung des Glycophorins A. Die Bildung der Homodimere in Anwesenheit des Detergenz C₈E₅ zeigte einen $K_D = 220$ nM. ΔG dieser Reaktion beträgt 38 KJ mol^{-1} (Fleming *et al.*, 1997). Engelman und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der K_D -Wert dieser Reaktion stark von dem benutzten Detergenz abhängig ist. Experimente, die in SDS-haltigem Puffer durchgeführt wurden, zeigten eine Zunahme des K_D -Wertes auf $2,7 \mu\text{M}$. Offensichtlich spielt das gewählte Detergenz eine außerordentliche Rolle für die Thermodynamik von Membranproteinen.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten ITC-Daten können als neuer Ansatz dienen, um die Thermodynamik von Membranproteinen zu untersuchen. Die Dissoziationskonstante im Bereich von 100 nM des Rezeptors an den verkürzten Transducer NpHtrII₁₅₇ ist vergleichbar mit dem Glycophorin A System (Fleming *et al.*, 1997) und auch mit Interaktionen zwischen löslichen Proteinen, wie dem Ras/RBD System (Sydor *et al.*, 1998). Die erhaltenen ΔG -Werte sind mit etwa 40 KJ mol⁻¹ analog zu denen des Glycophorin A Systems. Eine wesentliche Erleichterung bei der Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen NpSRII und NpHtrII in Detergenz ist, dass der Komplex in einer Detergensumgebung zu einem 1:1 Komplex assoziiert, während sich in einer Lipidumgebung ein 2:2 Komplex ausbildet (Wegener *et al.*, 2001a). Die Assoziation von NpSRII und NpHtrII zeigt eine höhere Assoziationskonstante als die der Heterodimere, da die nativen tetrameren Formen nur in der Membran aber nicht in der solubilisierten Form entstehen. Dieses Beispiel macht deutlich, dass es in Zukunft wichtig scheint thermodynamische Daten auch in der nativen Umgebung zu erhalten.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eine Bindung des NpHtrII₁₁₄, die durch eine Verkürzung auf 82 Aminosäuren zerstört wird. Das wirft die Frage auf, in wie weit der transmembrane Bereich in die Komplexbildung involviert ist. Die Kristallstruktur des Rezeptors alleine (Luecke *et al.*, 2001; Royant *et al.*, 2001) weicht nur minimal von der Kristallstruktur im Komplex mit seinem Transducer ab (Gordeliy *et al.*, 2002). Einen offensichtlichen Unterschied zeigt die Position der Aminosäure Y199 des Rezeptors. Der Vergleich des Tyrosins (AS-199) im Rezeptor alleine und im Komplex mit seinem Transducer, der eine Drehung des aromatischen Ringes um etwas 90° zeigt, könnte auf eine Rolle dieser Aminosäure in der Komplexbildung hindeuten (siehe Abb. 4.1-2).

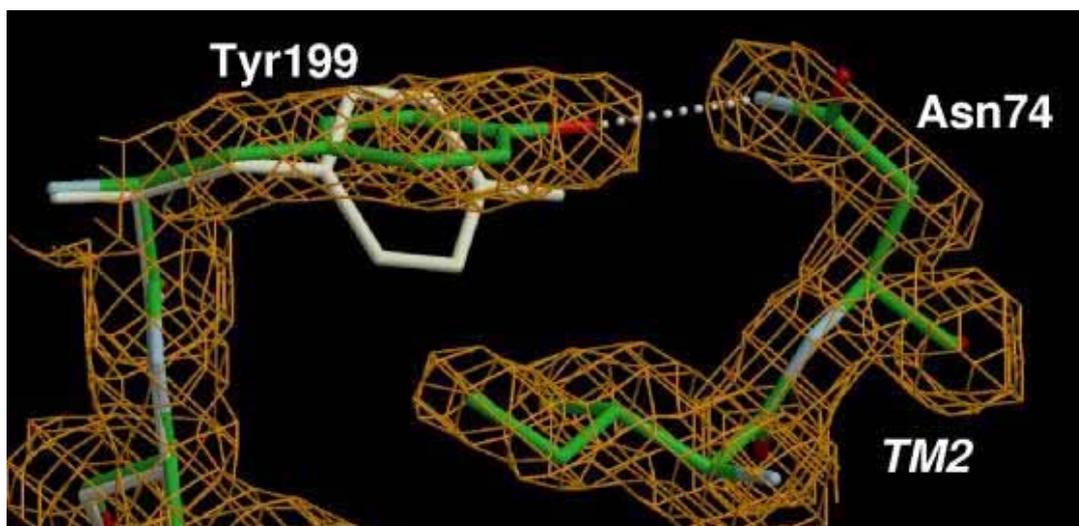


Abb. 4.1-2: Position des aromatischen Ringsystems der Aminosäure Tyrosin 199 des Rezeptors alleine (weiß) im Vergleich zu der im Komplex (grün) mit seinem Transducer (Abbildung freundlicherweise von G. Büldt zur Verfügung gestellt).

Die Kristallstruktur des Komplexes zeigt eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Y199^G und N74^{TM2}, die zwar zur allgemeinen Stabilität des Komplexes beitragen könnte, aber für die Komplexbildung nicht essentiell sein kann. Denn trotz eines Austausches des Tyrosins gegen ein Phenylalanin, wodurch die Möglichkeit zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu N74^{TM2} zerstört wird, wird eine Bindung von Rezeptor und Transducer nicht beeinflusst. Das wird durch die Dissoziationskonstante von 300 nM deutlich (Abb. 3.3-2). Es führt lediglich zu einer Abnahme der freien Energie um ~ 2 kJ/mol, was durch folgende Überlegungen erklärt werden könnte: Die Energie die nötig ist, um ein Peptid, welches keine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet, aus einem wässrigen Milieu in die Membran zu bringen beträgt ~ 25 kJ/mol. Dagegen beträgt die benötigte Energie im Falle einer sich ausbildenden Wasserstoffbrückenbindung nur ~ 2 kJ/mol (Chamberlain *et al.*, 2003). Die Deletion einer H-Brücken bildenden Gruppe einer AS führt somit zu einer Abnahme der freien Energie von ~ 2 kJ/mol. Weiterhin kann durch die Deletion der OH-Gruppe eine Änderung der Enthalpie um 5 kJ/mol beobachtet werden, während die Entropie ΔS bei 17,02 anstatt 23,4 kJ/mol liegt. Die Ergebnisse von Kamo und Mitarbeitern zeigten, dass der Austausch von Tyr199^G gegen Phenylalanin im M-Intermediat des Rezeptors einen erheblichen Effekt auf den K_D -Wert hat (Sudo *et al.*, 2002). Vermutlich spielt also die gefundene Wasserstoffbrückenbindung zwischen Y199 und N74 im aktivierten Zustand, nicht aber im Ausgangszustand, eine große Rolle.

Aufgrund der Komplexizität der Assoziation, die durch Hydratations-/Dehydratationseffekte und Detergenz/Mizellen-Wechselwirkungen beeinflusst wird, sind weitere thermodynamische Studien nötig um eine genaue Interpretation dieser Daten zu ermöglichen. Generell kann der NpSR^{II}/NpHtr^{II}-Komplex unter der Voraussetzung gleicher Versuchsbedingungen aber sicherlich als Modellsystem zur Aufklärung von Interaktionen zwischen Membranprotein herangezogen werden.

Während der Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung von Y199 zu N74 keinen Einfluss auf die Komplexbildung hat, wird sie durch die Deletion des aromatischen Ringes des Tyrosins 199 verhindert (Y199^GA). Der Austausch eines gegenüberliegenden Phe28 der TM 2 des Transducers in ein Alanin führt ebenfalls zum Verlust der Bindungsfähigkeit, obwohl die Kristallstruktur keine direkten Hinweise auf eine essentielle Rolle bei der Bindung zeigt (Gordeliy *et al.*, 2002). Schon 1997 konnte durch Fleming *et al.* (1997) nachgewiesen werden, dass der Austausch einer sterisch anspruchsvollen Aminosäure wie Leucin oder Isoleucin gegen ein "kleines" Alanin die Bindungseigenschaft zweier Proteine drastisch verändert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aminosäuren Phe28^{TM1} und Tyr199^G nicht nur durch van-der-Waals-Kräfte zur Bindung beitragen, sondern vermutlich die Proteine zur Komplexbildung in die richtige Position lenken, bzw. dort halten.

Die ITC-Messungen zeigen, dass die Rezeptorbindungs-Domäne des Transducers maximal die ersten 114 Aminosäuren enthält. Unterstützt durch die Photostrommessungen kann dem Peptid von Aminosäure 101-114 eine essentielle Rolle in der Rezeptor-Transducer-Bindung zugeordnet werden. Die Sequenz des Peptids 101-114 ($^{101}\text{GDGDLDVELETRRE}^{114}$) enthält eine Reihe von geladenen Seitenketten. Insgesamt finden sich sechs negative und zwei positive Ladungen. Es wäre möglich, dass erstere an Wechselwirkungen mit positiv geladenen Arginin-Seitenketten auf der Oberfläche des Rezeptors beteiligt sind, die in deren Reichweite sein könnten (siehe Abb. 4.1-3 (Gordeliy *et al.*, 2002). In HsHtrII aus *H. salinarum* sind vier der sauren Reste und eine der basischen Gruppen konserviert (Zhang *et al.*, 1996a), allerdings zeigt die entsprechende Sequenz im Rezeptor SRI kein solch starkes Ladungsmuster (Blanck *et al.*, 1989). Auf den ersten Blick scheint es, als wären elektrostatische Interaktionen des Peptids $^{101}\text{GDGDLD}$ mit NpSRII, wie in Royant *et al.* (2001) vorgeschlagen, wahrscheinlich. Die hohe Ionenstärke in dem natürlichen Umfeld von *N. pharaonis* spricht allerdings dagegen, was auch durch Messungen zum Einfluss der Ionenstärke auf die Rezeptor/Transducer Bindung (Abb. 3.2-4 und 3.3.4) deutlich wird.

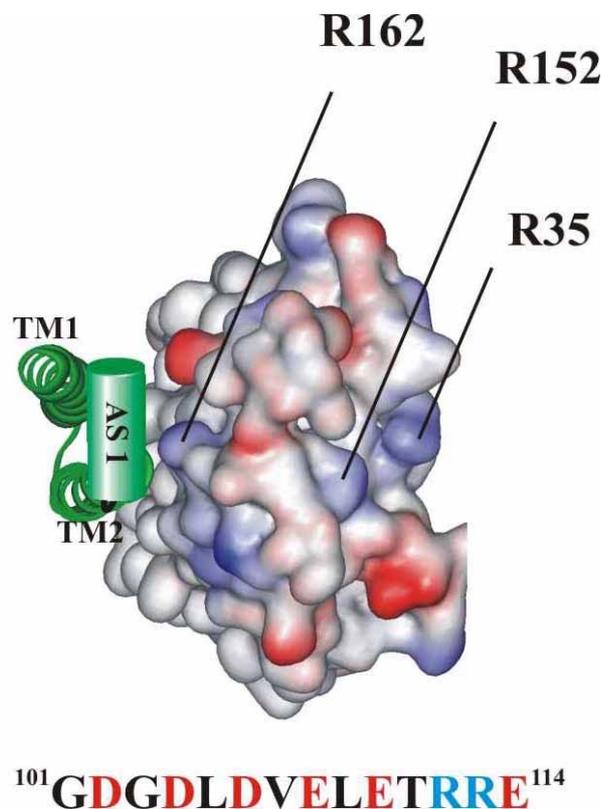


Abb. 4.1-3: Darstellung des Rezeptors NpSRII als Oberflächenmodell. Die positiv geladenen Arginin-Seitenketten des Rezeptors sind entsprechend markiert. Die Transducer-Helizes sind bis AS 101 im Komplex mit dem Rezeptor dargestellt. Die Sequenz des zytoplasmatischen Bereiches von AS 101-114 wurde zugefügt

Modell der Rezeptor-Bindungsdomäne

Aufgrund der erhaltenen Daten und der vorhandenen Kristallstruktur des NpHtrII/NpHtrII₁₁₄ Komplexes kann ein Modell der Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers erstellt werden, das in der folgenden Abbildung gezeigt und im Weiteren kurz erläutert wird:

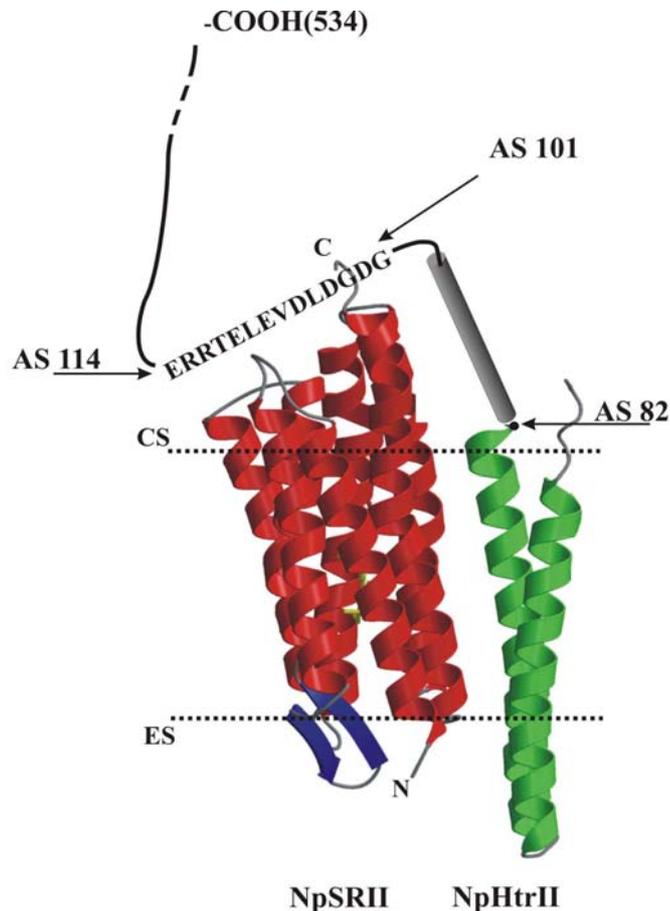


Abb. 4.1-4: Modell der Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers NpHtrII. Dargestellt ist die Kristallstruktur aus Gordeliy *et al.* (2002). Der schwarze Abschnitt bezeichnet die vermutete Lage zweier Bereiche der zytoplasmatischen Domäne.

Die Ergebnisse zeigen, dass für den Bereich des Transducers von 1-101 eine gewisse Bindungsfähigkeit zu beobachten ist. Eine Verlängerung auf 114 Aminosäuren führt allerdings zu einer erheblich stärkeren Bindung an den Rezeptor. NpHtrII₁₁₄ erhöht nicht nur die Bindungsfähigkeit, sondern kann auch den intrinsischen Photostrom des Rezeptors inhibieren, was durch das Fragment 1-101 nicht möglich ist. Somit kann die Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers in zwei Bereiche eingeteilt werden.

Für den Bereich von 82-101 kann eine Zunahme der Bindungsaffinität zum Rezeptor beschrieben werden. Dieser Bereich schließt die amphipatische Helix 1 (88-101) ein, die anhand von ESR-Daten nahe der Helix F liegt und zur Membran abknickt (Wegener *et al.*, 2001b; Klare, 2002). Abstandsmessungen zur Bestimmung der Orientierung der

amphiphatischen Helix 1 deuteten darauf hin, dass die AS 1 nicht parallel zur Membran angeordnet ist, sondern sich mit aufsteigender Sequenz von der Membran entfernt (Klare, 2002). Der Transducer NpHtrII₈₂ konnte in den durchgeführten ITC-Messungen keine Bindung an den Rezeptor vermitteln, was zum einen daran liegen könnte, dass ihm essentielle Bereiche zur Bindung fehlen, es könnte aber auch eine Falschfaltung des Proteins vorliegen. Untersuchungen von Wegener sprechen allerdings eher dafür, dass der N-terminale Bereich des Transducers mitverantwortlich ist für eine korrekte Insertion in die Membran, während der C-terminale Bereich für Modifikationen zugänglich ist (Wegener, 2000). Chamberlain und Mitarbeiter beschreiben in einer Zusammenfassung, dass für eine korrekte Insertion von Membranproteinen in die Membran meist die transmembranen Helizes zuständig sind (Chamberlain *et al.*, 2003). Für den Tsr-Rezeptor aus *E. coli* konnte nachgewiesen werden, dass die erste amphiphatische Sequenz für die Membrantopologie verantwortlich ist (Seligman und Manoil, 1994). ESR-Messungen oder eine GFP-Fusion könnten die Lokalisation des NpHtrII₈₂ in der Membran nachweisen. Aus ESR-Spektren lässt sich die Mobilität eines sogenannten Spinlabels an seinem Bindungsort schließen. Spinlabel sind durch ein ungepaartes Elektron an ein Protein verknüpft und signalisieren Informationen über die Mikroumgebung der Struktur, an die sie gebunden vorliegen. Somit ist es möglich eine Insertion eines Proteins in die Membran nachzuweisen. Gleiches gilt für die GFP-Fusion. Dabei wird auf molekularer Ebene eine Fusion des entsprechenden Gens mit dem Gen für das grün fluoreszierende Protein hergestellt. Nach Expression des Fusionsproteins ist es durch Fluoreszenzmikroskopie möglich die Lokalisation des Proteins zu bestimmen.

Der zweite Bereich von 101-114 trägt erheblich zur Komplexbildung bei, indem er die Bindungsfähigkeit um den Faktor 100 erhöht. Zudem ist dieser Bereich in der Lage den intrinsischen Photostrom des Rezeptors zu inhibieren, wie es auch für den kompletten Transducer beschrieben wurde (Schmies, 2000). Geht man von einer möglichen Interaktion der negativ geladenen Reste des Transducerpeptids ¹⁰¹GDGDL DVELETRRE¹¹⁴ mit den positiv geladenen Resten des Rezeptors aus, so spricht dies für eine sterische Inhibierung des Protonenkanals, da diese positiven Reste in der Nähe des Kanals liegen. Der Vergleich zu den Photostrommessungen lässt daher vermuten, dass das Transducer-Fragment NpHtrII₁₀₁ zwar noch in der Lage ist an den Rezeptor zu binden, aber nicht lang genug ist, um über eine sterische Hinderung die intrinsische Protonenpumpaktivität des Rezeptors zu inhibieren. Eine Konformationsänderung während des Photozyklus, die zur Inhibierung des Protonenstromes führen könnte, kann letztlich nicht ganz ausgeschlossen werden, da die bislang vorliegenden Kristallstruktur-Daten lediglich die Struktur des Ausgangszustandes zeigen (Gordeliy *et al.*, 2002; Royant *et al.*, 2001; Luecke *et al.*, 2001), nicht aber die der Intermediate. Allerdings sollte in diesem Fall eine Inhibierung des Protonenstromes nach Anregung des Rezeptors alleine nachweisbar sein. Zudem spricht die Inhibierung des

Photostromes nach Bindung des Transducers, die keine Strukturveränderung des Rezeptors bewirkt, für einen sterischen Effekt. Die Auflösung von Kristallstrukturen der verschiedenen Photozyklus-Intermediate könnte darüber in der Zukunft Aufschluss geben. Der Einfluss des Retinals auf die Komplexbildung, bzw. auf die Rezeptorstruktur wurde bisher nicht untersucht. In Analogie zum Bakteriorhodopsin lässt sich allerdings vermuten, dass das Retinal keinen direkten Einfluss auf die Rezeptorstruktur hat. Bakteriorhodopsin lässt sich vom Retinal trennen, baut es allerdings nach erneuter Zugabe wieder ein (Oesterhelt, 1998).

ITC-Messungen mit verschiedenen Mutanten zeigen, dass nicht nur der zytoplasmatische Teil des Transducers für eine Bindung an den Rezeptor essentiell ist, sondern auch der transmembrane Bereich einen Anteil daran hat. Denn obwohl der transmembrane Bereich alleine nicht an den Rezeptor bindet, zerstört die Deletion der aromatischen Ringsysteme der Aminosäuren Y199^G oder F28^{TM1} die Komplexbildungsfähigkeit. Damit beinhaltet die Rezeptorbindungs-Domäne des Transducers die transmembranen Helizes TM 1 und TM 2, sowie den Bereich von AS82 – AS114. Da die in der Kristallstruktur gefundene Wasserstoffbrücken-Bindung als nicht essentiell für die Komplexbildung angesehen werden kann, könnten die transmembranen Bereiche für die korrekte Lokalisation der Proteine in der Membran verantwortlich sein und somit zur Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers beitragen. Möglich wäre ein synergistischer Effekt, bei dem sowohl der transmembrane (1-82) als auch der zytoplasmatische Bereich von 83-114 für eine Bindung erforderlich ist. So könnte beispielsweise die durch die Helix F des Rezeptors induzierte Schraubenbewegung der TM 2 große Auswirkungen auf den Bereich von AS 101-114 des Transducers haben, denn durch eine Drehung der Helix 82-100 würde sich die Position dieses Bereiches zum Rezeptor stark verändern. Somit könnte der Bereich von AS 101-114 als Verstärkungsglied fungieren, der ein erhaltenes Signal amplifiziert und weiterleitet. Für die Zukunft wären hier sicherlich weitere ITC-Messungen interessant, die mit einem Peptid durchgeführt werden, das die AS 82-114 des Transducers trägt. Somit könnte geklärt werden, ob der zytoplasmatische Bereich tatsächlich erst nach einer erfolgreichen Lokalisation der transmembranen Bereiche beider Proteine an den Rezeptor bindet, oder ein im Zytoplasma lösliches C-terminales Peptid für eine Bindung ausreichen würde. Ein Vergleich mit früheren Ergebnissen, hauptsächlich Untersuchungen an SRI/HtrI aus *H. salinarum* (Jung und Spudich, 1996; Krahl *et al.*, 1994; Perazzona *et al.*, 1996) zeigt, dass die Rezeptor-Bindungsdomäne des HsHtrI einen größeren Bereich einschließt als die des NpHtrII. Für den Transducer HsHtrI konnte ein Fragment von AS1-147 bestimmt werden, das minimal nötig ist um einen nicht pH-abhängigen Photozyklus des Rezeptors zu erreichen. Dabei spielen einige Aminosäuren eine wesentliche Rolle in der Signalweiterleitung (Jung und Spudich, 1996), was in Zukunft noch genauer untersucht werden sollte.

4.2 Phototaxis in *Escherichia coli*

Durch die große Homologie von Chemotaxis und Phototaxis, sowohl bezüglich der beteiligten Proteine als auch der Art der Signaltransduktionskaskade sollten Fusionsproteine aus dem archaebakteriellen Transducer und dem eubakteriellen Chemorezeptor in der Lage sein Phototaxis in *E. coli* zu vermitteln. Die neu gewonnenen Erkenntnisse über die Rezeptor-Bindungsdomäne des archaebakteriellen Transducers und Sequenzvergleiche mit Chemorezeptoren machten es möglich die richtigen Fusionsstellen für die Konstruktion dieser Fusionsproteine zu bestimmen.

In der Tat konnten Spudich und Mitarbeiter eine erfolgreiche Präparation des Fusionsproteins NpsRII-NpHtrII-StTar, einem gekoppelten Produkt aus Rezeptor NpsRII, Transducer NpHtrII und Tar-Rezeptor aus *Salmonella*, und NpsRII-NpHtrII-EcTsr, einem gekoppelten Produkt aus Rezeptor NpsRII, Transducer NpHtrII und Tsr-Rezeptor aus *E. coli* zeigen (Jung *et al.*, 2001a). Die Autoren konnten zudem, durch die Expression dieser Fusionsproteine in *E. coli*, eine, allerdings nur sehr schwache, Reaktion auf einen photochemischen Reiz nachweisen. Durch eine direkte Kopplung von allen drei Proteinen konnte jedoch keine Aussage über die Bindung des Photorezeptors zum Transducer/Chemorezeptor-Fusionsprotein gemacht werden. Da die in dieser Arbeit ermittelte Bindungskonstante von Rezeptor und Transducer mit 150 – 200 nM sehr hoch ist, war es möglich auf eine direkte Verknüpfung von Rezeptor und Transducer zu verzichten. Für Untersuchungen der Signalweiterleitung zwischen Rezeptor und Transducer unter nativeren Bedingungen wurden beide Proteine daher getrennt exprimiert. Durch die ermittelte RBD-T konnte der zytoplasmatische Bereich bestimmt werden, der minimal für eine Bindung des Transducers an den Rezeptor notwendig ist. Somit sollten die transmembranen Helizes und der ermittelte zytoplasmatische Teil der RBD-T in der Lage sein, ein vom Rezeptor erhaltenes Signal funktionell an einen fusionierten cytoplasmatischen Teil eines Chemorezeptors aus *E. coli* zu übertragen.

Durch PCR wurden drei Fusionsproteine aus dem archaebakteriellen Transducer (NpHtrII) und dem eubakteriellen Aspartat-Rezeptor (MCP2) hergestellt, die an unterschiedlichen Positionen im Linkerbereich fusioniert wurden.

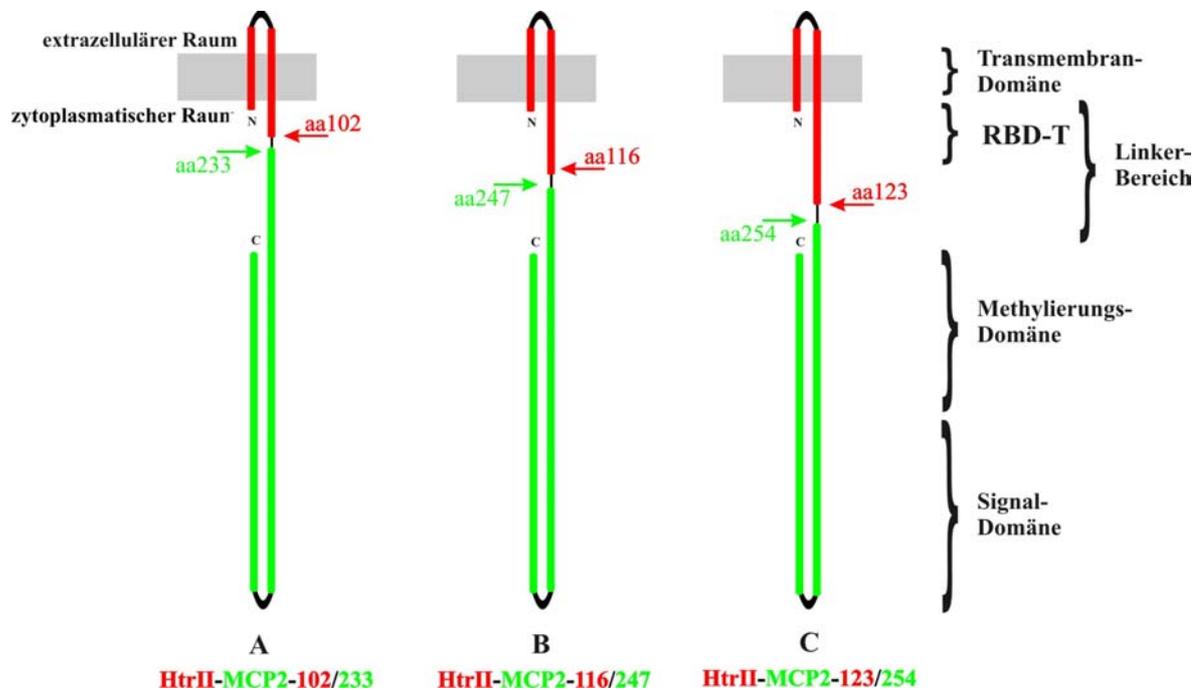


Abb. 4.2-1: Übersicht über die konstruierten Fusionsproteine aus dem archaebakteriellen Transducer (gelb) und dem eubakteriellen Chemorezeptor (grün). Die Einteilung der einzelnen Bereiche eines Transducers sind rechts dargestellt. Durch die erhaltene Kenntnisse über die RBD-T ist dieser Bereich zusätzlich eingefügt. Die Proteine wurden im Linkerbereich fusioniert. Die entsprechende Primär- und Sekundärsequenz ist in weiter unten im Text verdeutlicht.

Durch Sequenzvergleiche der Transducersequenzen archaebakterieller und eubakterieller Proteine (siehe Abb. 3.4-1) wird ein sich wiederholendes Sequenzmotiv aus sieben Aminosäureresten deutlich $(abcdefg)_n$, die ein amphiphatisches coiled coil ausbilden (LeMoual und Koshland, Jr., 1996). In dieser Heptade werden die Positionen a und d regelmäßig mit hydrophoben Seitenketten besetzt, während sich in e und g polare und geladene Aminosäuren finden lassen. In den Fusionsproteinen NpHtrII-MCP2-116/247 und NpHtrII-MCP2-123/254 wurde diese konservierte Folge von Aminosäuren beibehalten. Beide Transducer beinhalten die komplette RBD (siehe Abb. 4.2-2)

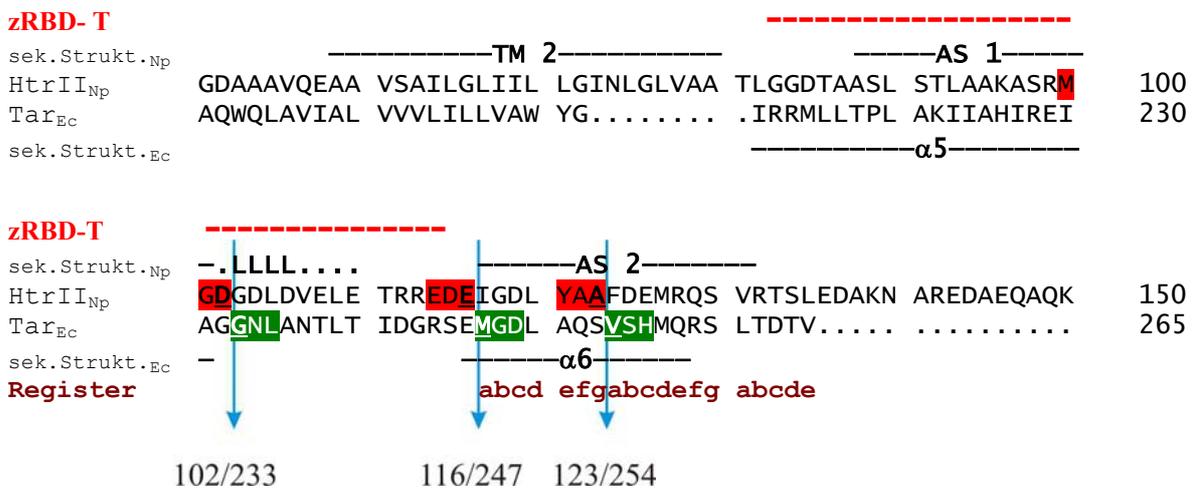


Abb. 4.2-2: Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich der Abb. 3.4-1 zur Verdeutlichung der Aminosäuresequenz der Fusionsproteine. Auf die Homologien der einzelnen AS und die Eigenschaft ihrer Seitenketten wird hier nicht eingegangen. Die gelb und grün unterlegten Aminosäuren verdeutlichen die Sequenz der Fusionstellen und entsprechen farblich der Abb. 4.2-1. L = Loop-Region, $(abcdefg)_n$ = Heptadenmuster (LeMoual und Koshland, Jr., 1996). zRBD = zytoplasmatischer Teil der RBD-T.

Für das Fusionsprotein NpHtrII-MCP2-102/233 wurde die amphiphatische Sequenz 1 (AS1), die an dieser Stelle in eine Loopregion übergeht, mit der entsprechenden Loopregion des MCP2-Rezeptors fusioniert. Dem Transducer fehlt in diesem Fall ein erheblicher Teil der zRBD. Er trägt lediglich den Bereich, der in den durchgeführten ITC-Messungen dieser Arbeit als minimal notwendig für eine Bindung nachgewiesen wurde. Es war daher von großem Interesse zu sehen, ob der Bereich bis 101 noch in der Lage ist ein photochemisches Signal des Rezeptors weiterzuleiten.

Die Expression der Fusionsproteine erfolgte durch Koexpression mit dem Rezeptor NpSRII in *E. coli* und die Präparation der Proteine durch Ni-Affinitätschromatographie nach den Methoden von Shimono *et al.* (1997) und Hohenfeld *et al.* (1999). Die erfolgreiche chromatographische Koaufrreinigung des Fusionsproteins zeigt, dass das

Fusionsprotein an den Rezeptor bindet, da nur der Rezeptor einen HisTag trägt. Der Western Blot in Abb. 3.4-6 macht deutlich das es sich bei der im SDS-Gel gefundenen potentiellen Fusionsprotein-Bande definitiv um das Fusionsprotein handelt.

Eine Veränderung des Methylierungslevels, das in der Chemotaxis durch Ligandenbindung und in der Phototaxis durch Signalweiterleitung von Photorezeptoren auf Transducer bewirkt wird, kann u.a. durch freigesetztes Methanol im Zellüberstand gemessen werden (Methode 2.9.4). Über den Methylierungsmechanismus in *N. pharaonis* ist bisher nichts bekannt. Der Methylierungsmechanismus aus *Halobakterium salinarum* zeigt dagegen einige interessante Aspekte (Perazzona und Spudich, 1999). Die für die Eubakterien gefundene Konsensussequenz der Methylierung konnten die Autoren auch auf HsHtrI und HsHtrII ausweiten. Beim Vergleich mit NpHtrII wird auch hier eine solche Konsensussequenz deutlich, die die Aminosäuren ²⁷⁰ATTEEVAAS²⁷⁸ beinhaltet (siehe Abb. 3.4-1). Ein für Eubakterien gefundenes Pentapeptid NWETF (Wu *et al.*, 1996), das als Bindungsstelle für CheR dient, ist in der Sequenz der archaebakteriellen Proteine HsHtrI und HsHtrII nicht vorhanden (Perazzona und Spudich, 1999) Auch für NpHtrII kann dieses Motiv nicht bestätigt werden (siehe Abb. 3.4-1). Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass das Maß der Methylierung von HsHtrI durch Licht nicht beeinflusst wird, während HsHtrII eine Abnahme der Methylierung nach Blaulichtreiz und eine Zunahme der Methylierung nach Wegnahme dieses Reizes zeigte. Hier ist anzumerken, dass HsHtrII nicht nur ein Phototransducer sondern auch ein Chemorezeptor ist, der sich durch eine umfangreiche extrazelluläre Domäne auszeichnet und eine sehr viel geringere Anzahl an Methylierungsstellen hat (Hou *et al.*, 1998; Perazzona und Spudich, 1999). Das HsHtrI zeigt eine physiologische Antwort auf Licht und auch eine Adaptation, obwohl die Methylierung am Transducer gleich bleibt. Eine Deletion der Methylierungsstellen von HsHtrII hat keinen Einfluss auf die Reaktion auf Licht oder die Adaptation (Perazzona und Spudich, 1999). Eine Messung des freien Methanols zeigt jedoch das generell in der Zelle eine Methylierung/Demethylierung stattfindet, die mit der Zugabe von negativen oder positiven Reizen korreliert. Im Gegensatz zur Chemotaxis in *E. coli* benötigt die Adaptation der Phototaxis keine Veränderung der Methylierung des Transducers durch den das Signal vermittelt wurde (Perazzona und Spudich, 1999). Die Autoren postulieren daher, dass das Methylierungssystem der Archaebakterien weitaus komplexer ist als bisher angenommen, da Methylierungen nicht nur Transducerabhängig erfolgen, sondern weitere Komponenten involviert sind. Da sich im vorliegenden Fall die Methylierungsstellen aber im eubakteriellen Teil des Fusionsproteins befinden, sollte eine Methylierung der Fusionsproteine unter der Voraussetzung einer korrekten Signalweiterleitung analog zur Chemotaxis-Methylierung ablaufen.

In dieser Arbeit konnte sowohl durch die Selektion auf Schwarmplatten (siehe Abb. 3.4-8), als auch durch Messung von freiem Methanol im Überstand (Abb. 3.4-14) eine funktionelle Chemotaxis nachgewiesen werden. Somit sind alle an der Signalweiterleitung in der Chemotaxis beteiligten Komponenten funktionell vorhanden. Legt man die Homologie zur Phototaxis zu Grunde, sollten auch hier alle notwendigen Komponenten vorhanden sein. Eine Stimulation der Zellen mit Licht statt mit Serin führt allerdings zu keiner Veränderung im Methylierungslevel der Zellen (Abb. 3.4-15). Es scheint daher für die Zukunft sinnvoll die Unterschiede der beiden Methylierungssysteme genauer aufzuklären.

Die unterschiedliche Motilität der Bakterien erschwerte die durchgeführten Phototaxis-Messungen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die schädigende Wirkung von IPTG auf die Zellen sein. Im Lichtmikroskop konnte tatsächlich eine Schädigung der Zellen durch mangelnde Zellteilungsfähigkeit nachgewiesen werden. Teilweise zeigten die Zellen ein Zehnfaches ihrer normalen Größe, wodurch sie zudem stark in ihrer Bewegungsfähigkeit eingeschränkt waren. Wie von Spudich vermutet, kann auch das zur Expression des Rezeptors notwendige Retinal die Zellen schädigen (Jung *et al.*, 2001a). Im Fall des Retinals könnte man in Zukunft auf einen Stamm zurückgreifen, der endogen Retinal produziert, so dass kein Überschuss an Retinal die Zelle schädigt (von Lintig *et al.*, 2000). Weiterhin zeigten die Zellen auf dem Objektträger bereits nach 10 Minuten eine Abnahme der Motilität. Für *N. pharaonis* konnte im Gegensatz zu *H. salinarum* (Hartmann *et al.*, 1980) ebenfalls ein Verlust der Motilität unter anaeroben Bedingungen festgestellt werden (Scharf *et al.*, 1992), der sich durch eine Luftblase unter dem Deckglas beheben ließ (Scharf und Wolff, 1994b). Im vorliegenden Fall führte dies nicht zur Verbesserung der Motilität. Die Reproduzierbarkeit der durchgeführten Phototaxis-Messungen war dadurch stark eingeschränkt. Im Falle einer Expression bei der nur wenige Zellen einen Defekt in der Zellteilung zeigten und alle Zellen sehr motil waren konnten die gezeigten Photoreaktionen beobachtet werden. Anzumerken ist hier allerdings, dass die ausbleibende Reaktion im Falle der nicht induzierten Zellen oder der Chimäre NpHtrII/MCP2-102/233 unabhängig von der Bewegungsfähigkeit, d.h. auch bei hoch motilen Zellen, zu beobachten war.

Während die Belichtung mit blau-grünem Licht unter den beschriebenen Gegebenheiten eine Reaktion bei den Chimären NpHtrII/MCP2-116/247 und NpHtrII/MCP2-123/254 hervorrief, führte die Wegnahme des Lichtes (als positiver Reiz) zu keiner Reaktion. Möglicherweise spielte die abnehmende Motilität der Zellen auf dem Objektträger hierbei eine Rolle. Tatsächlich zeigten 90 % der Zellen nach einer Messung unter einem Lichtmikroskop eine stark eingeschränkte Aktivität. Das könnte bedeuten, dass die Zellen nicht mehr in der Lage waren in den zuvor bestrahlten Bereich zurückzuwandern. Unter

der Annahme einer tatsächlichen Reaktion auf Licht lassen sich die Ergebnisse allerdings sehr gut mit den erhaltenen Daten zur RBD-T und bereits veröffentlichten Daten vergleichen.

Untersuchungen an Fusionsproteinen aus zwei verschiedenen archaeobakteriellen Transducern HsHtrI und HsHtrII aus *H. salinarum* zeigten, dass es möglich ist den zytoplasmatischen Bereich von HsHtrI durch HsHtrII zu ersetzen (Zhang *et al.*, 1999). Eine große Anzahl von identischen Aminosäuren im Vergleich zu anderen Transducern (auch Chemotaxis-Rezeptoren) in der für eine Bindung essentiellen Linker-Region macht vermutlich einen solchen Austausch möglich. Dieser Region, die von Hoff und Mitarbeitern in Archaeobakterien als „Stimulus-weiterleitende-Domäne“ und in Eubakterien als „Linker-Region“ bezeichnet wird, wird daher eine besondere Rolle zugeordnet (Hoff *et al.*, 1997). Sie kann auch in eubakteriellen Fusionsproteinen aus Tar und EnvZ sowie Tsr und EnvZ für die Signalweiterleitung verantwortlich gemacht werden (Baumgartner und Hazelbauer, 1994). Die *E. coli* Chimäre, die die Fusion NpHtrII/MCP2-102/233 exprimiert, enthält nur einen Teil der RBD-T und zeigt eine deutlich schwächere Bindung zum Rezeptor. Sowohl ITC-Messungen mit dem NpHtrII₁₀₁ als auch die Koexpression von NpHtrII/MCP2-102/233 und dem NpSRII zeigen eine (wenn auch schwache) Bindung beider Proteine. Die Weiterleitung eines erhaltenen Lichtsignals ist allerdings unter den hier durchgeführten Bedingungen nicht nachzuweisen. Vermutlich kann also die komplette zytoplasmatische Domäne des HsHtrII durch die des HsHtrI ersetzt werden, nicht aber die von NpHtrII durch die des Aspartat-Rezeptors. Der in dieser Arbeit bestimmte zytoplasmatische Teil der Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers (RBD-T) könnte somit im Rahmen einer Bindung für die Signalweiterleitung verantwortlich sein. Interessant wären daher für die Zukunft Mutationsstudien, die die phototaktische Antwort nach eingeführten Punktmutationen in der Stimulus-weiterleitenden Domäne zeigen. Anders sieht die phototaktische Antwort der Chimären NpHtrII/MCP2-116/247 und NpHtrII/MCP2-123/254 aus. Beide tragen die komplette RBD-T. Diese scheint hier eine physiologische Antwort auf den Reiz zu vermitteln, obwohl nicht geklärt ist, ob diese Domäne direkt für die Signalweiterleitung verantwortlich ist oder ob ihre durch ITC-Messungen nachgewiesene bessere Bindung an den Rezeptor dafür verantwortlich ist. Ein Grund für das stärkere Signal der NpHtrII/MCP2-123/254 Chimäre könnte die Stimulus-weiterleitende-Domäne sein, die hier fast vollständig aus dem archaeobakteriellen Transducer besteht. Dies würde auch die fehlenden bis sehr schwachen Signale erklären, die Spudich durch die Fusion NpsRII/NpHtrII/EcTsr oder StTar erhielt. Nur eins von drei Konstrukten enthielt die RBD-T und keins die komplette Stimulus-weiterleitende Domäne (Jung *et al.*, 2001).

5 Zusammenfassung

Das sensorische Rhodopsin II (NpSRII) vermittelt im Komplex mit seinem Transducer (NpHtrII) die photophobe Reaktion des Archaeobakteriums *Natronobacterium pharaonis* auf blau-grünes Licht. Dabei verursacht ein eintreffender Lichtreiz eine Konformationsänderung des sensorischen Rhodopsins II. Dieses Signal wird an den Transducer weitergeleitet der daraufhin eine, der eubakteriellen Chemotaxis analoge, Signal-Transduktionskaskade aktiviert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers charakterisiert und ein Modellsystem der archaeobakteriellen Phototaxis in dem Eubakterium *E. coli* entwickelt werden.

Zur Charakterisierung der Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers wurden vier verkürzte Transducer-Varianten heterolog in *E. coli* exprimiert und präparativ dargestellt. Die Bindung dieser Transducer-Varianten an das sensorische Rhodopsin II wurde durch gelelektrophoretische und kalorimetrische Experimente näher untersucht. Durch Isotherme-Titrations-Kalorimetrie konnten die Assoziationskonstanten und die Enthalpie-Werte der Komplexbildung ermittelt werden. Es wurde gezeigt, dass eine verkürzte Transducer-Variante, die die Aminosäuren (AS) 1–114 trägt, mit einer Assoziationskonstanten von $4,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ und einem Enthalpie-Wert von $-17,6 \text{ kJ/mol}$, eine den längeren Transducer-Varianten entsprechende Bindung an das sensorische Rhodopsin II vermittelt. Die Affinität beider Proteine zueinander erwies sich in weiteren Untersuchungen als unabhängig von der umgebenden Ionenstärke oder dem pH-Wert. Eine weitere Verkürzung des Transducers auf 101 Aminosäuren führte mit einer Assoziationskonstanten von $0,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ zu einer erheblich schwächeren Bindung, die völlig zerstört wurde, wenn das Protein bis auf seine beiden transmembranen Helizes verkürzt wurde (AS 1-82).

Zur weiteren Charakterisierung der Rezeptor-Bindungsdomäne des Transducers wurden Mutationen in die transmembranen Bereichen des sensorischen Rhodopsins II und des Transducers eingeführt und die Komplexbildung kalorimetrisch analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine fehlende Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Tyrosin in Position 199 (Y199) des Rezeptors und dem Asparagin in Position 74 des Transducers die Komplexbildung nicht beeinflusst, während die aromatischen Ringsysteme der Aminosäuren Y199 des sensorischen Rhodopsins und F28 des Transducers essentiell sind. Aufgrund der erhaltenen Daten konnte ein Modell zur Rezeptor-Bindungsdomäne aufgestellt werden, bei dem neben der ermittelten essentiellen Rolle der transmembranen Domänen dem Peptid von Aminosäure 101-114 des Transducers eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung mit der zytoplasmatischen Oberfläche des sensorischen Rhodopsins II zukommt.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte, aufgrund der bestehenden Homologie der Komponenten der Phototaxis zu den Komponenten der Chemotaxis, die Phototaxis in *E. coli* etabliert werden. Angesichts der deutlichen Homologie der zytoplasmatischen Domänen des archaeobakteriellen Transducers und des eubakteriellen Chemorezeptors MCP 2, wurden drei Fusionsproteine aus dem N-terminalen Teil des Transducers und dem C-terminalen Teil des Chemorezeptors konstruiert. Durch die erfolgreiche Koaufrreinigung des sensorischen Rhodopsins und der Fusionsproteine konnte erstmals gezeigt werden, dass die Fusionsproteine *in-vitro* eine Bindung mit dem Rezeptor eingehen. Vorläufige Ergebnisse zeigten zudem, dass die Chimäre, bestehend aus dem archaeobakteriellen Transducer von Aminosäure 1-123 und dem eubakteriellen Chemorezeptor von Aminosäure 254-553, bei einer Überexpression in *E. coli* eine photophobe Antwort auf blau-grünes Licht vermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass ein phototaktisches System in *E. coli* entwickelt werden kann, was die Möglichkeit eröffnet, die Signaltransduktion von Zwei-Komponenten-Systemen physiologisch und biophysikalisch zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Alam, M. und Oesterhelt, D. (1984) Morphology, function and isolation of halobacterial flagella. *J. Mol. Biol.* **176**, 459-475.
- Alam, M. und Hazelbauer, G.L. (1991) Structural Features of Methyl-Accepting Taxis Proteins Conserved between Archaeobacteria and Eubacteria Revealed by Antigenic Cross-Reaction. *J. Bacteriol.* **173**, 5837-5842.
- Ames, P. und 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. und Parkinson, J.S. (2002) Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *E. coli*. *PNAS* **99**, 7060-7065.
- Ausubel, F.M. (1987) Current protocols in molecular biology. *Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience New York*.
- Barnakov, A.N., Barnakova, L.A. und Hazelbauer, G.L. (1999) Efficient adaptional demethylation of chemoreceptors requires the same enzyme-docking site as efficient methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10667-10672.
- Baumgartner, W. und Hazelbauer, G.L. (1994) Transmembrane signaling by a hybrid protein. *J. Bacteriol.* **176**, 1157-1163.
- Bibikov, S.I., Grishanin, R.N., Marwan, W., Oesterhelt, D. und Skulachev, V.P. (1991) The proton pump bacteriorhodopsin is a photoreceptor for signal transduction in *Halobacterium halobium*. *FEBS Letters* **295**, 223-226.
- Birnbaumer, L., Yatani, A., VanDongen, A.M., Graf, R., Codina, J., Okabe, K., Mattera, R. und Brown, A.M. (1990) G protein coupling of receptors to ionic channels and other effector systems. *Soc. Gen. Physiol Ser.* **45**, 169-183.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bivin, D.B. und Stoeckenius, W. (1986) Photoactive retinal pigments in haloalkaliphilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **132 (Pt 8)**, 2167-2177.
- Blanck, A. und Oesterhelt, D. (1987) The halo-opsin gene. II. Sequence, primary structure of halorhodopsin and comparison with bacteriorhodopsin. *EMBO J.* **6**, 265-273.

- Blanck, A., Oesterhelt, D., Ferrando, E., Schegk, E.S. und Lottspeich, F. (1989) Primary structure of sensory rhodopsin I, a prokaryotic photoreceptor. *EMBO J.* **8**, 3963-3971.
- Bogomolni, R.A. und Spudich, J.L. (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6250-6254.
- Bogomolni, R.A. und Spudich, J.L. (1987) The photochemical Reactions of bacterial Sensory Rhodopsin I: Flash Photolysis Study in the One Microsecond to Eight Second Time Window. *Biophys. J.* **52**, 1071-1075.
- Bogomolni, R.A., Stoeckenius, W., Szundi, I., Perozo, E., Olson, K.D. und Spudich, J.L. (1994) Removal of transducer HtrI allows electrogenic proton translocation by sensory rhodopsin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10188-10192.
- Boyd, A. und Simon, I. (1980) Multiple electrophoretic forms of methyl-accepting chemotaxis proteins generated by stimulus-elicited methylation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **143**, 809-815.
- Buck, L. und Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-187.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.N. (1987) XL1-blue a high efficiency plasmid transforming rec-A *Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-377.
- Butler, S.L. und Falke, J.J. (1998) Cysteine and Disulfide Scanning Reveals Two Amphiphilic Helices in the Linker Region of the Aspartate Chemoreceptor. *Biochemistry* **37**, 10746-10756.
- Cadene, M. und Chait, B.T. (2000) A Robust, Detergent-Friendly Method for Mass Spectrometric Analysis of Integral Membrane Proteins. *Anal. Chem.* **72**, 5655-5658.
- Chamberlain, A.K., Faham, S., Yohannan, S. und Bowie, J.U. (2003) Construction Of Helix-Bundle Membrane Proteins. *Advances in Protein Chemistry, membrane Proteins* **63**, 19-43.
- Chen, X. und Spudich, J.L. (2002) Demonstration of a 2:2 Stoichiometry in the Functional SRI-HtrI Signaling Complex in Halobacterium Membranes by Gene Fusion Analysis. *Biochemistry* **41**, 3891-3896.

- Chervitz, S.A. und Falke, J.J. (1996) Molecular mechanism of transmembrane signaling by the aspartate receptor: A model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2545-2550.
- Chizhov, I., Chernavskii, D.S., Engelhard, M., Mueller, K.H., Zubov, B.V. und Hess, B. (1996) Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.* **71**, 2329-2345.
- Chizhov, I. und Engelhard, M. (2001) Temperature and Halide Dependence of the Photocycle of Halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*. *Biophys. J.* **81**, 1600-1612.
- Chizhov, I., Schmies, G., Seidel, R.P., Sydor, J.R., Lüttenberg, B. und Engelhard, M. (1998) The Photophobic Receptor from *Natronobacterium pharaonis*: Temperature and pH Dependencies of the Photocycle of Sensory Rhodopsin II. *Biophys. J.* **75**, 999-1009.
- Chizhov, I., Schmies, G., Seidel, R., Sydor, J.R., Lüttenberg, B. und Engelhard, M. (1998) The photophobic receptor from *Natronobacterium pharaonis*: Temperature and pH dependencies of the photocycle of sensory rhodopsin II. *Biophys. J.* **75**, 999-1009.
- Ehresmann, B., Imbault, P. und Weil, J.H. (1973) Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal. Biochem.* **54**, 454-463.
- Engelman, D.M., Adair, B.D., Hunt J.F., Kahn, T.W., and Popot, J.-L. (1990). Bacteriorhodopsin Folding in Membranes: A Two-Stage Process. In *Current Topics in Membranes and Transport*, Volume 36, Academic Press, Inc.), pp. 71-78.
- Falke, J.J., Bass, R.B., Butler, S.L., Chervitz, S.A. und Danielson, M.A. (1997) The Two-Component Signaling Pathway of Bacterial Chemotaxis: A Molecular view of Signal Transduction by Receptors, Kinases, and Adaption Enzymes. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **13**, 457-512.
- Falke, J.J. und Hazelbauer, G.L. (2001) Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *TIBS* **26**, 257-265.
- Fleming, K.G. (2000) Probing Stability of Helical Transmembrane Proteins. *Methods in Enzymology* **323**.
- Fleming, K.G., Ackermann, A.L. und Engelman Donald M. (1997) The effect of point mutations on the free energy of transmembrane alpha-helix dimerization. *JMB* **272**, 266-275.

- Francis, N.R., Irikura, V.M., Yamaguchi, S., DeRosier, D.J. und Macnab, R.M. (1992) Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 6304-6308.
- Gordeliy, V.I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R., Büldt, G., Savopol, T., Scheidig, A.J., Klare, J.P. und Engelhard, M. (2002) Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex. *Nature* **419**, 484-487.
- Hargrave, P.A. und McDowell, J.H. (1992) Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB* **6**, 2323-2331.
- Hartmann, R., Sickinger, H.D. und Oesterhelt, D. (1980) Anaerobic growth of halobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3821-3825.
- Hazelbauer, G.L. und Engstrom, P. (1989) Multiple forms of methyl-accepting chemotaxis proteins distinguished by a factor in addition to multiple methylation. *PNAS* **86**, 1448-1452.
- Hildebrand, E. und Dencher, N.A. (1975) Two photosystems controlling behavioural responses in *Halobacterium*. *Nature* **257**, 46-49.
- Hoff, W.D., Jung, K.H. und Spudich, J.L. (1997) Molecular mechanism of photosignaling by archaeal sensory rhodopsins [review]. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 223-258.
- Hohenfeld, I.P., Wegener, A.A. und Engelhard, M. (1999) Purification of Histidine tagged bacteriorhodopsin, *pharaonis* halorhodopsin and *pharaonis* sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **442**, 198-202.
- Holloway, P.W. (1973) A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal. Biochem.* **53**, 304-308.
- Hou, S.B., Brooun, A., Yu, H.S., Freitas, T. und Alam, M. (1998) Sensory rhodopsin II transducer HtrII is also responsible for serine chemotaxis in the archaeon *halobacterium salinarum*. *Journal of Bacteriology* **180**, 1600-1602.
- Hufnagel, P., Schweiger, U., Eckerskorn, C. und Oesterhelt, D. (1996) Electrospray ionization mass spectrometry of genetically and chemically modified bacteriorhodopsins. *Anal. Biochem.* **243**, 46-54.

- Jung, K.H., Spudich, E.N., Trivedi, V.D. und Spudich, J.L. (2001) An archaeal photosignal-transducing module mediates phototaxis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 6365-6371.
- Jung, K.H. und Spudich, J.L. (1998) Suppressor mutation analysis of the sensory rhodopsin I - transducer complex - insights into the color-sensing mechanism. *J. Bacteriol.* **180**, 2033-2042.
- Jung, K.-H. und Spudich, J.L. (1996) Protonable residues at the cytoplasmic end of transmembrane helix-2 in the signal transducer HtrI control photochemistry and function of sensory rhodopsin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6557-6561.
- Kates, M., Kushwaha, S.C. und Sprott, G.D. (1982) *Methods in Enzymology* **88**, 98-111.
- Kates, M. (1982). Techniques of Lipidology; Isolation, Analysis and Identification of Lipids. *American Elsevier Publishing Co., New York*.
- Kehry, M.R., Thomas, G.D. und Dahlquist, F.W. (1984) Stimulus-induced Changes in Methylsterase Activity during Chemotaxis in *Escherichia coli*. *The Journal of biological Chemistry*.
- Kim, K.K., Yokota, H. und Kim, S.-H. (1999) Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature* **400**, 787-792.
- Kim, S.-H., Wang, W. und Kyeong, K.K. (2002) Dynamic and clustering model of bacterial chemotaxis receptors: Structural basis for signaling and high sensitivity. *PNAS* **99**, 11611-11615.
- Klare, J.P. (2002) Strukturelle und funktionelle Untersuchungen des photophoben Rezeptor/Transducer-Komplexes aus *N. pharaonis*. *Dissertation, Universität Dortmund*.
- Klare, J.P., Schmies, G., Chizhov, I., Shimono, K., Kamo, N. und Engelhard, M. (2002) Probing the proton channel and the retinal binding site of *Natronobacterium pharaonis* sensory rhodopsin II. *Biophys. J.* **82**, 2156-2164.
- Klostermeier, D., Seidel, R.P. und Reinstein, J. (1998) Functional Properties of the Molecular Chaperone DnaK from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* **279**, 841-853.
- Krah, M., Marwan, W. und Oesterhelt, D. (1994) A cytoplasmic domain is required for the funktional interaction of SRI and HtrI in archaeal signal transduction. *FEBS Lett.* **353**, 301-304.

- Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K. und Aizawa, S. (1992) Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **226**, 433-446.
- Ladbury, J.E. und Chowdhry, B.Z. (1998) Biocalorimetry: applications of calorimetry in the biological sciences. *J. Wiley Chichester*.
- LeMoual, H. und Koshland, D.E., Jr. (1996) Molecular Evolution of the C-terminal Cytoplasmic Domain of a Superfamily of Bacterial Receptors Involved in Taxis. *J. Mol. Biol.* **261**, 568-585.
- Levit, N., Grebe, T.W. und Stock, J. (2002) Organization of the Receptor-Kinase Signaling Array That Regulates *Escherichia coli* Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **277**, 36748-36754.
- Luecke, H., Schobert, B., Lanyi, J.K., Spudich, E.N. und Spudich, J.L. (2001) Crystal Structure of Sensory Rhodopsin II at 2.4 Å: Insights into Color Tuning and Transducer Interaction. *Science* **293**, 11062977-1503.
- Maddock, J.R. und Shapiro, L. (1993) Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* **259**, 1717-1723.
- Marwan, W. und Oesterhelt, D. (1990). Signal transduction in *Halobacterium halobium*. In *Biology of the Chemotactic Response Society for General Microbiology Symposium Vol. 46*, J.P.Armitage and J.M.Lackie, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 219-239.
- Matsubo-Yagi, A. und Mukohata, Y. (1980) ATP synthesis linked to light-dependent proton uptake in a red mutant strain of *Halobacterium* lacking bacteriorhodopsin. *Arch. Biochem. Biophys.* **199**, 297-303.
- Milburn, M.V., Privé, G.G., Milligan, D.L., Scott, W.G., Yeh, J., Jancarik, J., Koshland, D.E. und Kim, S.-H. (1991) Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science* **254**, 1342-1347.
- Morgan, J.E., Baumgartner, W. und Hazelbauer, G.L. (1993) Proteins Antigenically Related to Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins of *Escherichia coli* Detected in a Wide Range of Bacterial Species. *J. Bacteriol.* **175**, 133-144.
- Oesterhelt, D. (1998) The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 489-500

- Oesterhelt, D. und Marwan, W. (1990) Biology of chemical Response. *Cambridge* **46**, 220-239.
- Oesterhelt, D. und Marwan, W. (1995) Wie Archaea sehen und schmecken. *Biospektrum* **1**, 11-16.
- Perazzona, B., Spudich, E.M. und Spudich, J.L. (1996) Deletion Mapping of the Sites on the HtrI Transducer for Sensory Rhodopsin I Interaction. *Journal of Bacteriology* **178**, 6475-6478.
- Perazzona, B. und Spudich, J.L. (1999) Identification of Methylation Sites and Effects of Phototaxis Stimuli on Transducer Methylation in *Halobacterium salinarum*. *J. Bacteriol.* **181**, 5676-5683.
- Rigaud, J.L., Mosser, G., Lacapere, J.J., Olofsson, A., Levy, D. und Ranck, J.L. (1997) Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. *J. Struct. Biol.* **118**, 226-235.
- Royant, A., Nollert, P., Edman, K., Neutze, R., Landau, E.M., Pebay-Peyroula, E. und Navarro, J. (2001) X-ray structure of sensory rhodopsin II at 2.1-Å resolution. *PNAS* **98**, 10131-10136.
- Rudolph, J. und Oesterhelt, D. (1995) Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J.* **14**, 667-673.
- Rudolph, J. und Oesterhelt, D. (1996) Deletion Analysis of the *che* Operon in the Archaeon *Halobacterium salinarium*. *J. Mol. Biol.* **258**, 548-554.
- Sambrook, J., Maniatis, T. und Fritsch, E.F. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harb. Lab. Press.*
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467.
- Sasaki, J. und Spudich, J.L. (1998) The Transducer Protein HtrII Modulates the Lifetimes of Sensory Rhodopsin II Photointermediates. *Biophys. J.* **75**, 2435-2440.
- Schamel, W.A. und Schamel, K.R. (2001) Die Blaue Native Gelelektrophorese zur Untersuchung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen. *Immunologie Aktuell.*
- Scharf, B. und Wolff, E.K. (1994) Phototactic behaviour of the archaebacterial *Natronobacterium pharaonis*. *FEBS Letters* **340**, 114-116.

- Scharf, B.E., Fahrner, K.A. und Berg, H.C. (1998a) CheZ has no effect on flagellar motors activated by CheY^{13DK106YW}. *Journal of Bacteriology* **180**, 5123-5128.
- Scharf, B.E., Fahrner, K.A., Turner, L. und Berg, H.C. (1998b) Control of direction of flagellar rotation in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 201-206.
- Scharf, B., Pevec, B., Hess, B. und Engelhard, M. (1992) Biochemical and photochemical properties of the photophobic receptors from *Halobacterium halobium* and *Natronobacterium pharaonis*. *Eur. J. Biochem.* **206**, 359-366.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.
- Schäfer, G., Engelhard, M. und Müller, V. (1999) Bioenergetics of the Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 570-620.
- Schimz, A. (1981) Methylation of membrane proteins is involved in chemosensory and photosensory behaviour of *Halobacterium halobium*. *FEBS Lett.* **125**, 205-207.
- Schmies, G. (2000) Spektroskopische und elektrophysiologische Untersuchung der beiden archaebakteriellen Photorezeptor/Transducer-Komplexe. *Dissertation, Universität Dortmund*
- Schmies, G., Chizhov, I. und Engelhard, M. (2000) Functional expression of His-tagged sensory rhodopsin I in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **466**, 67-69.
- Schmies, G., Engelhard, M., Wood, P.G., Nagel, G. und Bamberg, E. (2001) Electrophysiological characterization of specific interactions between bacterial sensory rhodopsins and their transducers. *PNAS* **98**, 1555-1559.
- Schmies, G., Lüttenberg, B., Chizhov, I., Engelhard, M., Becker, A. und Bamberg, E. (2000c) Sensory Rhodopsin II from Haloalkaliphilic *Natronobacterium pharaonis*: Light-Activated Proton Transfer Reactions. *Biophys. J.* **78**, 967-976.
- Scopes, R.K. (1974) Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal. Biochem.* **59**, 277-282.

- Seidel, R.P., Scharf, B., Gautel, M., Kleine, K., Oesterhelt, D. und Engelhard, M. (1995) The primary structure of sensory rhodopsin II: A member of an additional retinal protein subgroup is coexpressed with its transducer, the halobacterial transducer of rhodopsin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3036-3040.
- Seligman, L. und Manoil, C. (1994) An amphipathic sequence determinant of membrane protein topology. *J. Biol. Chem.* **269**, 19888-19896.
- Shigekawa, K. und Dower, W.J. (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques* **6**, 742-751.
- Shimono, K., Iwamoto, M., Sumi, M. und Kamo, N. (1997) Functional expression of *pharaonis* phoborhodopsin in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **420**, 54-56.
- Spudich, E.N. und Spudich, J.L. (1993) The photochemical reactions of sensory rhodopsin I are altered by its transducer. *J. Biol. Chem.* **268**, 16095-16097
- Spudich, E.N., Hasselbacher, C.A. und Spudich, J.L. (1988) Methyl-accepting protein associated with bacterial sensory rhodopsin I. *J. Bacteriol.* **170**, 4280-4285.
- Spudich, J.L. (1998) Variations on a molecular switch. *Mol. Microbiol.* **28**, 1051-1058.
- Spudich, J.L. (1994) Protein-Protein Interaction Converts a Proton Pump into a Sensory Receptor. *Cell* **79**, 747-750.
- Spudich, J.L. und Bogomolni, R.A. (1984) Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature* **312**, 509-513.
- Spudich, J.L. und Bogomolni, R.A. (1988) Sensory Rhodopsins of Halobacteria. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 193-215.
- Spudich, J.L. und Stoeckenius, W. (1979) Photosensory and Chemosensory Behaviour of *Halobacterium Halobium*. *Photobiochemistry and Photobiophysics* **1**, 43-53.
- Stoeckenius, W., Wolff, E.K. und Hess, B. (1988) A Rapid Population Method for Action Spectra Applied to *Halobacterium halobium*. *Journal of Bacteriology* **170**, 2790-2795.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.

- Sudo, Y., Iwamoto, M., Shimono, K. und Kamo, N. (2001a) Pharaonis phoborhodopsin binds to its cognate truncated transducer even in the presence of a detergent with a 1 : 1 stoichiometry. *Photochemistry and Photobiology* **74**, 489-494.
- Sudo, Y., Iwamoto, M., Shimono, K., Sumi, M. und Kamo, N. (2001b) Photo-Induced Proton Transport of *Pharaonis* Phoborhodopsin (Sensory Rhodopsin II) Is Ceased by Association with the Transducer. *Biophys. J.* **80**, 916-922.
- Sydor, J.R., Engelhard, M., Wittinghofer, A., Goody, R.S. und Herrmann, C. (1998) Transient Kinetic Studies on the Interaction of Ras and the Ras-Binding Domain of c-Raf-1 Reveal Rapid Equilibration of the Complex. *Biochemistry* **37**, 14292-14299.
- Terwillinger, T.C., Wang, J.Y. und Koshland, D.E. (1986) Surface structure recognized for covalent modification of the aspartat receptor in chemotaxis. *PNAS* **83**, 6707-6710.
- von Lintig, J. und Vogt, K. (2000) Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *J. Biol. Chem.* **275**, 11915-11920
- Wallace, R.B., Johnson, M.J., Suggs, S.V., Miyoshi, K., Bhatt, R. und Itakura, K. (1981) A set of synthetic oligodeoxyribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR322. *Gene* **16**, 21-26.
- Wegener, A.A. (2000) Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaebakteriellen Lichtrezeptors pSRII mit seinem Transducerprotein pHtrII. *Dissertation, Universität Dortmund.*
- Wegener, A.A., Chizhov, I., Engelhard, M. und Steinhoff, H.-J. (2001a) Time-resolved Detection of Transient Movement of Helix F in Spin-labelled Pharaonis Sensory Rhodopsin II. *J. Mol. Biol.* **301**, 881-891.
- Wegener, A.A., Klare, J.P., Engelhard, M. und Steinhoff, H.J. (2001b) Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis. *EMBO J.* **20**, 5312-5319.
- Williams, S.B. und 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. *Molecular Microbiology* **33**, 1093-1102.

- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. und Lin, L.N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131-137.
- Wu, J., Li, J., Li, G., Long, D.G. und Weis, R.M. (1996) The receptor binding site for the methyltransferase of bacterial chemotaxis is distinct from the sites of methylation. *Biochemistry* **35**, 4984-4993.
- Yao, V.J. und Spudich, J.L. (1992) Primary structure of an archaebacterial transducer, a methyl-accepting protein associated with sensory rhodopsin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11915-11919.
- Yeh, J.I., Biemann, H.P., Privé, G.G., Pandit, J., Koshland, D.E. und Kim, S.H. (1996) High-resolution structures of the ligand binding domain of the wild-type bacterial aspartate receptor. *J. Mol. Biol.* **262**, 186-201.
- Zhang, W.S., Brooun, A., Mueller, M.M. und Alam, M. (1996a) The primary structures of the archaeon *halobacterium salinarium* blue light receptor sensory rhodopsin II and its transducer, a methyl-accepting protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8230-8235.
- Zhang, W., Brooun, A., McCandless, J., Banda, P. und Alam, M. (1996b) Signal transduction in the Archaeon *Halobacterium salinarium* is processed through three subfamilies of 13 soluble nad membrane-bound transducer proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4649-4654.
- Zhang, X.-N., Zhu, J. und Spudich, J.L. (1999) The specificity of interaction of archaeal transducers with their cognate rhodopsins is determined by their transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 857-862.

7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
AS1	Amphiphatische Sequenz 1
AS2	Amphiphatische Sequenz 2
bp	Basenpaar
BR	Bakteriorhodopsin
CheA	Chemotaxisprotein A, Histidinkinase
CheB	Chemotaxisprotein B, Methylsterase
CheR	Chemotaxisprotein R, Methyltransferase
CheW	Chemotaxisprotein W, Adapterprotein
CheY	Chemotaxisprotein Y, Aspartatkinase
CheZ	Chemotaxisprotein Z, Phosphatase
CPM	counts per minute, Strahlung pro Minute
DDM	N-Dodecyl- β -D-maltosid
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisierung
G-Protein	trimeres GTP-bindendes Regulatorprotein
HR	Halorhodopsin
<i>H. salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i> (zuvor <i>H. halobium</i>)
Htr	halobakterieller Transducer des Rhodopsins
HsHtrII	halobakterieller Transducer des Rhodopsins aus <i>H. salinarum</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Lauria Bertani medium
M	Molekülmasse
MCP	methyl accepting chemotaxis protein
NaCl	Natriumchlorid
<i>N. pharaonis</i>	<i>Natronobacterium pharaonis</i>
NpHtrII	halobakterieller Transducer des Rhodopsins aus <i>N. pharaonis</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
NpHtrII	<i>N. pharaonis</i> Transducer des sensorischen Rhodopsins II
NpSRII	<i>N. pharaonis</i> sensorisches Rhodopsin II
rbs	ribosomale Bindungsstelle
RBD-T	Rezeptor Bindungsdomäne des Transducers NpHtrII
mRNA	Boten-RNA
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SB	Schiff'sche Base
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TFE	Trifluorethanol
TM	Transmembrane Helix
Upm	Umdrehungen pro Minute
VÄ	Volumen-Äquivalent
<i>wt</i>	Wildtyp
λ	Wellenlänge des Lichtes

Für die 20 natürlichen Aminosäuren wurde der Dreibuchstaben- oder Einbuchstabencode nach IUPAC-IUB-Vereinbarung (1969) verwendet.

8 Anhang

Publikationen:

Silke Hippler-Mreyen, Johann P. Klare, Ansgar Wegener, Ralf Seidel, Christian Herrmann, Georg Schmies, Georg Nagel, Ernst Bamberg, Martin Engelhard (2003),
Probing the sensory rhodopsin II binding domain of its cognate transducer by calorimetry and electrophysiology,
JMB, im Druck

Laura Rivas, Silke Hippler-Mreyen, Martin Engelhard, Peter Hildebrandt (2003)
Electric-Field Dependence of the Photocycle of Photosensory
Rhodopsin II from *Natronobacterium pharaonis*
Biophys. J. **84**, 3864-3873

Silke Dlugai, Silke Hippler, Roman Wieczorke, Eckard Boles (2001)
Glucose-dependent and -independent signalling functions of the yeast glucose
sensor Snf3.
FEBS Lett 2001 Sep **21**; 505(3): 389-92

Ein herzliches Dankeschön...

...an Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Engelhard, für die Aufnahme in seiner Gruppe, die sehr interessante Aufgabenstellung und die immerwährende Unterstützung während der gesamten Arbeit.

...an Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst, der sich freundlicherweise für die „vorgeschriebene“ Betreuung aus Düsseldorf zur Verfügung stellte und mir bei Fragen und Problemen immer sehr hilfreich zur Seite stand (obwohl ich eine „Externe“ bin)

...an Herrn Prof. Dr. G. Büldt, für die bereitwillige Übernahme des Korreferats

...an Herrn Prof. Dr. R.S. Goody, für die Aufnahme in seine Abteilung am MPI in Dortmund

...an Frau Priv.-Doz. Dr. Birgitta Wöhrl, die einfach unersetzlich ist und immer eine großartige Hilfe (nicht nur) bei molekularbiologischen und „chemotaktischen“ Problemen war, auch nach ihrer „Mitgliedschaft“ im MPI

...an Miria Schumacher, Martina Wischnewski, Marion Hülseweh, Anke Reulen und Annika Göppner, für die stetige Hilfe in den Wirren des Laboralltags

...an die gesamte AG Engelhard (inklusive den Ehemaligen und dem Nachwuchs Nadine), Sandra und insbesondere meiner Tischnachbarin Britta, für das gute Arbeitsklima im Labor und Büro

...an Tudor Savopol, ohne den das „Ausdenken“ von Formeln und das Verstehen von improvisierten Mikroskop-Apparaturen nicht ganz so leicht gewesen wäre

...an die Cocktail-Runde, für die seit dem Studium bestehende Freundschaft und Unterstützung

...an Thomas Christiansen, dem diese Arbeit gewidmet ist, obwohl er nicht mehr die Möglichkeit hatte daran Anteil zu nehmen, dafür das es ihn gab

...an Tim Laussmann, der mittlerweile viel mehr als ein ehemaliger Arbeitskollege geworden ist, für das Korrekturlesen dieser Arbeit, für die Unterstützung in schwierigen Situationen und natürlich für die ausführlichen Erzählungen über seinen Freund in Australien

...an meine Eltern, ohne deren Liebe und Unterstützung mein Studium und diese Arbeit niemals möglich gewesen wären, für ihren unglaublichen Stolz, ihre finanzielle Unterstützung und die eingerahmten Poster im Flur

...an Tim's Freund aus Australien, meinem Mann Marcus, ohne den nichts so schön wäre wie es ist, für alles

Lebenslauf

Name:	Silke Mreyen (geb. Hippler)
Geboren:	07.06.1971 in Mönchengladbach
Eltern:	Brigitte und Robert Hippler
Familienstand:	seit 2002 verheiratet mit Marcus Mreyen
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
29.05.1990	Abitur am Stadt. Math.-Naturwissenschaftlichen u. Neusprachlichen Gymnasium Mönchengladbach
08/1990-06/1993	Ausbildung zur Chemielaborantin, Firma Hebro Chemie GmbH Mönchengladbach / Firma Convent Knabber-Gebäck GmbH & Co.Kg, Werk Wevelinghoven
07/1993-09/1993	Tätigkeit als Chemielaborantin, Firma Convent Knabber-Gebäck GmbH & Co.Kg, Werk Wevelinghoven
10/1993	Aufnahme des Studiums der Biologie an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
10/1995	Diplomvorprüfung
01/1998-12/1998	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Thema: Molekulargenetische Untersuchungen zur Funktion von Glukosesensoren und Glukosetransportern in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ,
12/1998	Diplomvergabe
01/1999 – 10/2000	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
11/2000	Beginn der Dissertation am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund, Abteilung physikalische Biochemie, Thema: Funktionelle Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaeobakteriellen Photorezeptors mit seinem Transducer durch heterologe Expression in <i>E.coli</i>

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

Dortmund, den 10.06. 2003