Strukturelle und funktionelle Untersuchungen des Transducers HtrII aus *Natronomonas pharaonis* und von HtrII/Tar-Chimären

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nadine Mennes

aus Hamm (Westfalen)

Dortmund, 2006

Die vorliegende 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 Prof. Dr. M. Engelhard angefertigt.

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

Referent: Prof. Dr. Georg Büldt
Koreferent: Prof. Dr.Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2007

Die Neugier steht immer am Anfang eines Problems,
das gelöst werden will.

Galileo Galilei

Meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
2 Material und Methoden 14
2.1 Chemikalien 14
2.2 Instrumentation 15
2.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide 16
2.4 Antikörper 18
2.5 Molekularbiologische Methoden 19
2.5.1 Zellanzucht 19
2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA 20
2.5.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration 21
2.5.4 Restriktion von DNA 21
2.5.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten 21
2.5.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 21
2.5.7 Ligation von DNA-Fragmenten 22
2.5.8 Transformation von *E. coli* Zelllen durch Elektroporation und Hitzeschock 22
2.5.9 Polymerase-Kettenreaktion 23
2.5.10 Oligonukleotid Annealing 24
2.5.11 DNA-Sequenzierung 25
2.5.12 Herstellung von Glycerinstabs 25
2.6 Proteinchemische Methoden 26
2.6.1 Proteinexpression in *E. coli* 26
2.6.2 Zellaufschluss und Aufreinigung der Proteine 26
2.6.3 Kopplung von Spinproben 29
2.6.4 Isolierung polarer Lipide aus *H. salinarum* 30
2.6.5 Rekonstitution von Proteinen in PM-Lipide 30
2.6.6 Phosphorylierungs-Assay 31
2.7 Analytische Methoden 32
2.7.1 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese 32
2.7.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen 32
2.7.3 Immunologischer Nachweis nach Western Transfer 33
2.7.4 Massenspektrometrie 34
2.7.5 Analytische Gelfiltration 34

2.8 Biophysikalische Methoden 35
2.8.1 CD-Spektroskopie 35
2.8.2 Laserblitz-Absorptions-Spektrometrie 35
2.8.3 ESR-Spektroskopie 36
2.8.4 Isotherme Titrations Kalorimetrie 38
2.8.5 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) 39
2.8.6 Mikroskopische Untersuchungen zur Phototaxis 40
2.9 Sonstige Methoden 41
2.9.1 Sequenzanalyse und Erstellung von Plasmidkarten 41
3 Ergebnisse 42
3.1 Klonierung und Präparation der Proteine 42
3.1.1 Expression und Aufreinigung des *Np*HtrII 42
3.1.2 Aminosäureanalyse des *Np*HtrII 45
3.1.3 Klonierung zytoplasmatischer *Np*HtrII-Fragmente 47
3.1.4 Expression und Aufreinigung der zytoplasmatischen Fragmente 50
3.1.5 Mutagenese der *Np*HtrII-Cysteinmutanten 53
3.1.6 Expression und Aufreinigung der Cysteinmutanten 54
3.1.7 Auswahl der Fusionsschnittstellen für *Np*HtrII/MCP2-Chimären 55
3.1.8 Klonierung der Chimären 59
3.1.9 Expression und Aufreinigung der Chimären 61
3.1.10 Klonierung der Che-Proteine 63
3.1.11 Expression und Aufreinigung der Che-Proteine 63
3.1.12 Klonierung des *E. coli* Tar-Rezeptors 71
3.1.13 Expression und Aufreinigung des Aspartat-Rezeptors 72
3.1.14 Umklonierung der Chimären in den pTrc-99A Vektor für den *in vivo* Schwimmversuch 73
3.1.15 Testexpression im RP437wt Stamm 74
3.1.16 Umklonierung der Fusionsproteine und des *Np*SRII-Rezeptors auf einen Vektor 76
3.2 Untersuchungen zur *Np*HtrII Struktur und Rezeptor-Transducer-Bindung 77
3.2.1 Gelfiltrations-Analysen des *Np*HtrII 77
3.2.2 Circular Dichroismus Spektroskopie (CD) 85
3.2.3 Untersuchungen des Photozyklus des *Np*SRII/*Np*HtrII-Komplexes 87
3.2.4 Isotherme Titrations Kalorimetrie am *Np*SRII/*Np*HtrII-Komplex 88
3.2.5 Untersuchung zur Rückfaltung des zytoplasmatischen *Np*HtrII 93
3.2.6 FTIR-Messung des *Np*HtrII 94

3.3 Kristallisation von *Np*HtrII-Konstrukten 96
3.3.1 Vorbereitungen zur Kristallisation 96
3.4 ESR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung und Signaltransduktion 98
3.4.1 ESR-Untersuchungen am Transducer Molekül 98
3.4.2 ESR-Untersuchungen an den Fusionsproteinen 105
3.5 Untersuchungen zur Funktionalität der *Np*HtrII/MCP2 Chimären 113
3.5.1 *In vitro* Phosphorylierungs-Assay 113
3.5.2 *In vivo* Untersuchungen zur Funktionalität der Chimären im Organismus *E. coli* 119
3.5.3 Phototaxismessungen bzw. Schwimmversuch-Messungen 119
4 Diskussion 124
4.1 Struktur- und Bindungs-Charakterisierung des *Np*HtrII 125
4.2 Modell des *Np*HtrII, insbesondere der Linker-Region 132
4.3 Untersuchungen zur *Np*HtrII-Struktur und Weiterleitung des Signals 136
4.4 Funktionsuntersuchungen der Transducer-Chemorezeptor-Chimären 142
5 Zusammenfassung 146
6 Summary 148
7 Literaturverzeichnis 150
8 Abkürzungen 158
9 Anhang 161

1 Einleitung

Organismen müssen sich in ihrer Umgebung orientieren, Nahrung suchen, Gefahren ausweichen, Licht erkennen oder auf Stimuli der Fortpflanzung reagieren. Dafür müssen entsprechende Reize aus der Umgebung wahrgenommen, aufgenommen und verarbeitet werden. Diese Schritte beinhalten die Weiterleitung der Reize (Transduktion), die Analyse bzw. Interpretation und abschließend die Antwort auf das wahrgenommene Signal der Umwelt. Für diese Mechanismen stehen komplexe Netzwerke zur Verfügung, die sich im Laufe der Evolution an die jeweiligen Lebensbedingungen der einzelnen Organismen angepasst haben.

Am Beginn dieser Signaltransduktionskaskaden befinden sich meistens Rezeptoren, die als Sieben-Helix-Transmembran-Proteine bekannt sind. Für jeden Reiztyp, z.B. chemische oder mechanische Signale, existieren entsprechend ausgerüstete Rezeptoren. In höheren Organismen stellen diese Rhodopsin-ähnlichen Sieben-Helix-Rezeptoren oder auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) eine große Familie dar. Diese leiten Signale durch Interaktion mit Guanylnukleotid-bindenden Proteinen (Buck & Axel, 1991) weiter. Zu dieser Familie zählen Geruchs- und Geschmacks-Sensoren (Buck & Axel, 1991), Hormon- als auch Neuro-Transmitter (Birnbaumer *et al.*, 1990) und die Lichtrezeptoren (Hargrave & McDowell, 1992). Für die zuletzt genannte Funktion ist das Rhodopsin verantwortlich. Die Sieben-Helix-Transmembran-Proteine finden sich nicht nur in höheren Organismen, sondern durchziehen alle Bereiche des Lebens, wie Eukaryoten, Eubakterien und Archaebakterien. Lichtrezeptoren in Archaebakterien üben ihre Funktion durch archaebakterielle Rhodopsine aus, die Retinal als Chromophor gebunden haben.

Archaea gehören zytologisch zu den Prokaryoten. Sie weisen aber einige Strukturmerkmale auf, die sie von den Eubakterien unterscheiden. Es sind drei Gruppen der Archaebakterien bekannt, die durch phänotypische Merkmale unterschieden werden. Die Gruppe der chemolithotrophen methanogenen Bakterien, die zur Energiegewinnung Kohlenmonoxid zu Methan reduzieren (Balch et al.; 1979), die schwefelabhängigen, thermophilen bzw. thermoazidophilen und die halophilen Bakterien (Tindall & Trüper, 1986). Allen gemeinsam ist die Eigenschaft in extremen ökologischen Biotopen zu leben. Eine bisher gut untersuchte Familie ist die der *Halobacteriaceae,* zu der auch die beiden Organismen *Halobacterium salinarum* und *Natronomonas pharaonis* zählen (Skulachev, 1993). Beide leben an Orten mit hohem Salzgehalt und starker Sonneneinstrahlung, wie z.B. dem Toten Meer, den Salztümpeln der Westküsten und den Hochplateaus der USA oder der Salinen (Larsen, 1971) (siehe Abb. 1.1).

Abb. 1.1: Owens Lake in Kalifornien, USA besiedelt mit halophilen Archaebakterien (http://waynesword.palomar.edu/plsept98.htm).

Das Bakterium *H. salinarum* ist eine stäbchenförmige Zelle mit mono-, eher seltener bipolar insertierten Flagellen, die sich zu einer rechtsgängigen Helix zusammen lagern (Alam & Oesterhelt, 1984). Die Zelle ist nun in der Lage dieses Geißelbündel entweder im Uhrzeigersinn oder gegen den Uhrzeigersinn durch Rotation des in der Zellmembran verankerten Flagellenmotors zu drehen, so dass das Bakterium entweder geschoben oder gezogen wird (Alam & Oesterhelt, 1984). Eine Besonderheit ist die einfache Umkehrung der Flagellen ohne dass das Bündel wie bei *E. coli* in einzelne Geißeln zerfällt. Bei konstanten Lichtverhältnissen schwimmt das Bakterium ca. 10 Sekunden in eine Richtung bevor die Drehrichtung des Flagellenmotors gewechselt wird. Dadurch kommt es zu einem Vor- und Zurückschwimmen der Zelle. Durch die Brown'schen Molekularbewegungen erhält das Bakterium eine zufällige Richtungsänderung. Als Folge dessen kommt es zu ungerichteter Bewegung der Zelle („random walk") (Spudich & Bogomolni, 1988). Im Falle eines positiven Stimulus, wie z.B. orangenes Licht, ändert sich das Schwimmverhalten der Zelle. Die Schaltfrequenz der Umschaltungen des Flagellenmotors wird erniedrigt, so dass das Schwimmintervall verlängert wird und die Zelle in Richtung eines positiven Signals schwimmt. Wenn hingegen der positive Stimulus verschwindet oder ein negativer Reiz auftritt, vergrößert sich die Schaltfrequenz, was verkürzend auf das Schwimmintervall wirkt. Dieses führt schließlich zu einem Entfernen der Zelle vom schädlichen kürzerwelligen Licht. Eine Antwort auf die Stimuli erfolgt nur auf eine Änderung der Signalintensität und nicht auf deren absolute Größe (Spudich & Stoeckenius, 1979). Durch eine konstante Einwirkung des Stimulus kommt es zur Adaptation, wodurch das Bakterium in der Lage ist sich im Raum nur durch Reizgradienten gelenkt zu orientieren. Die Zelle ist durch dieses relativ einfache Bewegungsmuster befähigt, sich in ihrer Umgebung sehr effektiv zu bewegen und schnell optimale Bedingungen aufzusuchen (Spudich & Stoeckenius, 1979; Stoeckenius *et al.*, 1988). Die Bewegungsabläufe sind in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.

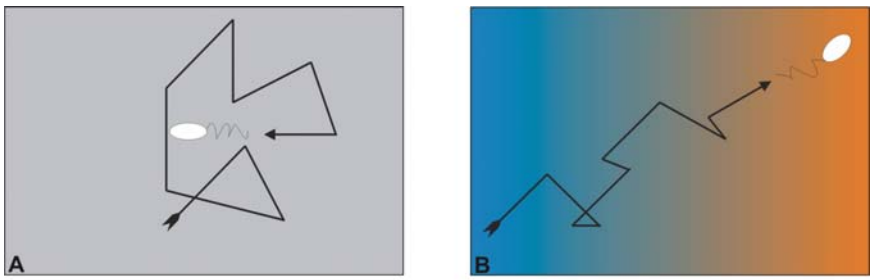


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Schwimmbewegungen einer *H. salinarium* Bakterienzelle.
A: Ungerichtete, statistische Bewegungen bei neutralen, konstanten Lichtverhältnissen.
B: Flucht der Zelle vor blauem Licht zum positiven Stimulus (orangenes Licht).

Die Untersuchung an phototaktischen Zellen ist weit verbreitet, da Licht ein sehr einfach zu handhabendes Medium ist, d. h. es ist exakt quantifizierbar, kann kontrolliert, verzögerungslos, sowie rückstandsfrei an- und abgeschaltet werden.

Das Schwimmverhalten der Bakterien repräsentiert ihre Fähigkeit zur Phototaxis, was auch an Anlehnung an die eukaryotischen Rhodopsine als primitiver Sehvorgang bezeichnet werden kann. Die halophilen Archaebakterien schützen sich zum einen durch Anwendung der Phototaxis vor schädlichem UV-Licht. Zum anderen kann es in ihren Lebensräumen vorkommen, dass eine ausreichende Menge an Sauerstoff nicht mehr gewährleistet ist, so dass die Bakterien ihre Energie nicht mehr durch oxidative Phosphorylierung gewinnen können. In *Halobacteriaceae* sind vier bakterielle Rhodopsine (Abb. 1.3), zwei Ionenpumpen und zwei Sensoren bzw. Lichtrezeptoren, für diese Funktionen verantwortlich. Es handelt sich bei diesen Proteinen um 7-Helix-transmembran Proteine, die den Chromophor Retinal (Vitamin A-Aldehyd) als prosthetische Gruppe über eine protonierte Schiff'sche Base (SB) kovalent an die ε-Aminogruppe eines konservierten Lysinrests auf der siebten transmembranen Helix (G) gebunden haben (Henderson & Schertler, 1990).

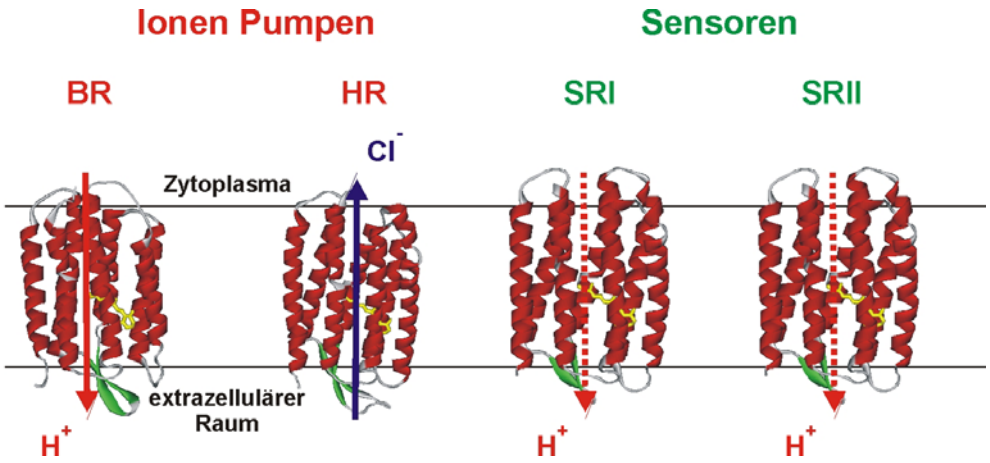


Abb. 1.3: Darstellung der vier archaebakteriellen Rhodopsine aus *H. salinarum* (Klare & Engelhard, 2004).

Mit Hilfe der beiden Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) sind die Bakterien in der Lage unter anaeroben Bedingungen ATP durch Nutzung von Lichtenergie zu erzeugen. Viele Untersuchungen haben sich mit den Pumpen im Archaebakterium *H. salinarum* beschäftigt. Neben den beiden Ionenpumpen besitzt das Bakterium zudem zwei sensorische Rhodopsine SRI und SRII (s. Abb. 1.3), welche die Zelle befähigen, für optimale Lichtbedingungen für die Funktion der Ionenpumpen BR und HR zu sorgen und schädliches kürzerwelliges Licht zu meiden. SRI übt eine duale Funktion aus. Es ist in einem Ein-Photon-Prozess für die photophile Antwort auf orangenes Licht der Bakterien verantwortlich und in einem Zwei-Photonen-Prozess übermittelt es eine photophobe Antwort der Bakterien auf blaues Licht. SRII hingegen ist nur für die photophobe Reaktion auf blau-grünes Licht verantwortlich (Bogomolni & Spudich, 1982; Spudich & Bogomolni, 1984).

Die sensorischen Rhodopsine bilden in der Plasmamembran jeweils einen 2:2 Komplex mit einem entsprechenden „halobacterial transducer protein“, welches folglich als HtrI bzw. als HtrII gekennzeichnet wird (Abb. 1.4). Diese bestehen aus einem transmembranen Bereich und einem zytoplasmatischen Bereich.

Bei den Transducer-Molekülen gelang es Yao und Spudich (Yao & Spudich, 1992) den offenen Leserahmen (ORF) des als HtrI bezeichneten Proteins zu identifizieren. Einige Zeit danach wurden die ORFs der beiden Gene für das *Hs*SRII und für das *Np*SRII gefunden. Beide liegen zusammen mit ihrem homologen Transducer Protein in einem Operon und werden von einem Promotor als bicistronische mRNA kotranskribiert (Seidel *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996).

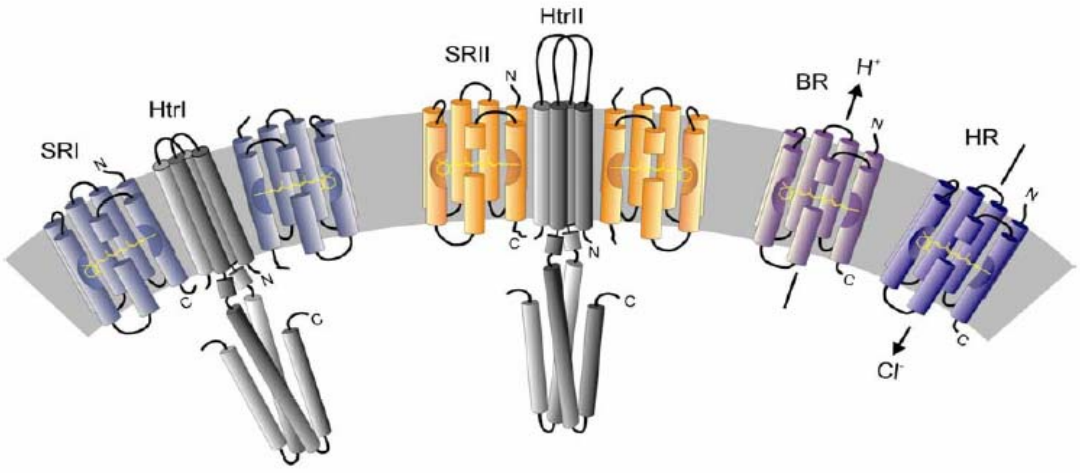


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der vier archaebakteriellen Rhodopsine aus *H. salinarum*. Das SRI und SRII kommt in einem 2:2 Komplex mit seinem entsprechenden Transducer-Molekül (HtrI und HtrII) vor (Chen & Spudich, 2002; Wegener *et al.*, 2001).

Der 2:2 Komplex für SRI/HtrI wurde 2002 (Chen & Spudich, 2002) proteinchemisch identifiziert. Für den SRII/HtrII Komplex gaben ESR-Messungen am transmembranen Bereich des Komplexes den ersten Hinweis auf einen 2:2 Komplex (Wegener, 2000; Wegener *et al.*, 2001), welcher später durch Röntgenstrukturdaten bestätigt werden konnte (Gordeliy *et al.*, 2002) (Abb. 1.5).

In der Kristallstruktur-Analyse des *Np*SRII/*Np*HtrII-Komplexes konnte jedoch nur der transmembrane Bereich des *Np*HtrII von Aminosäure 24 – 82 aufgelöst werden, so dass Strukturinformationen über die restlichen Bereiche noch fehlen. In der Abb. 1.5 ist die bisher bekannte Kristallstruktur dargestellt. Das *Np*SRII (rot) und *Np*HtrII (grün) sind in der Membran über die beiden transmembranen Helizes TM1 und TM2 des Transducers und die Helizes F und G des Rezeptors assoziiert. Im extrazellulären Raum ist vermutlich das evolutionäre „Überbleibsel“ der Ligandenbindungsdomäne des Transducers zu erkennen. Dieses stammt vielleicht aus einem Photo-Chemorezeptor, aus dem sich die Photorezeptoren entwickelt haben. Ein Hinweis für diese evolutionäre Abstammung erbringt der HtrII-Rezeptor aus *H. salinarum*, der noch eine Serin-Rezeptor Domäne besitzt (Hou *et al.*, 1998).

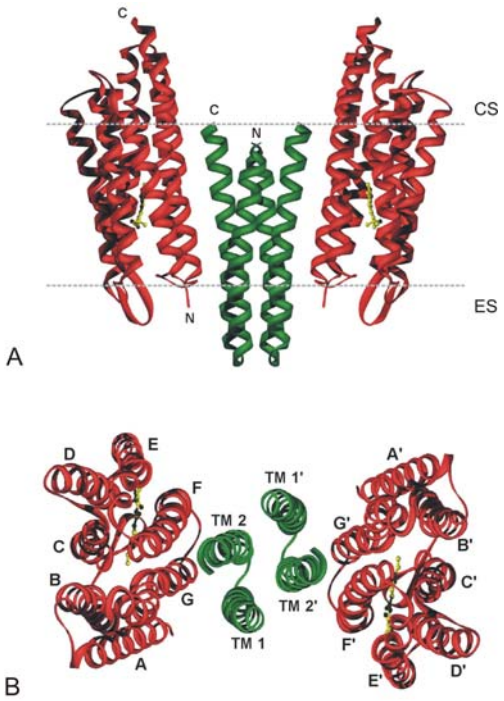


Abb. 1.5: Kristallstruktur aus Röntgenstrukturdaten des 2:2 Komplexes von *Np*SRII (rot) und *Np*HtrII (grün). Das Retinal ist in gelb dargestellt.
A: ES bedeutet extrazellulärer Raum und CS steht für zytoplasmatischer Raum. Der Komplex wird von der Seitenansicht gezeigt.
B: Blick von der zytoplasmatischen Seite.

Auf Grund großer Sequenz- und Struktur-Homologie zu den eubakteriellen Chemotaxis-Rezeptoren (= MCP (Methyl accepting proteins) -Rezeptoren) kann ein Modell der archaebakteriellen Transducer-Proteine aufgestellt werden (s. Abb. 1.7). Beide Proteinfamilien lassen sich in den extrazellulären Bereich, der die Ligandenbindungs-Domäne einschließt, in die Transmembran-Domäne mit zwei Helizes TM1 und TM2 und in den zytoplasmatischen Bereich einteilen. Der Letztere beinhaltet einen Linker-Bereich, der zwei HAMP-Domänen (Histidin-Kinase, Adenylatcyclase, Methly-akzeptierende Proteine, Phosphatase (Aravind & Ponting, 1999)) bei den Archaebakterien einschließt. Die Struktur einer HAMP-Domäne wird wiederum in drei Bereiche eingeteilt. Sie bestehen aus zwei amphiphatischen Sequenzen (AS1 und AS2), die durch eine Connector-Region miteinander verbunden sind (Abb. 1.6).

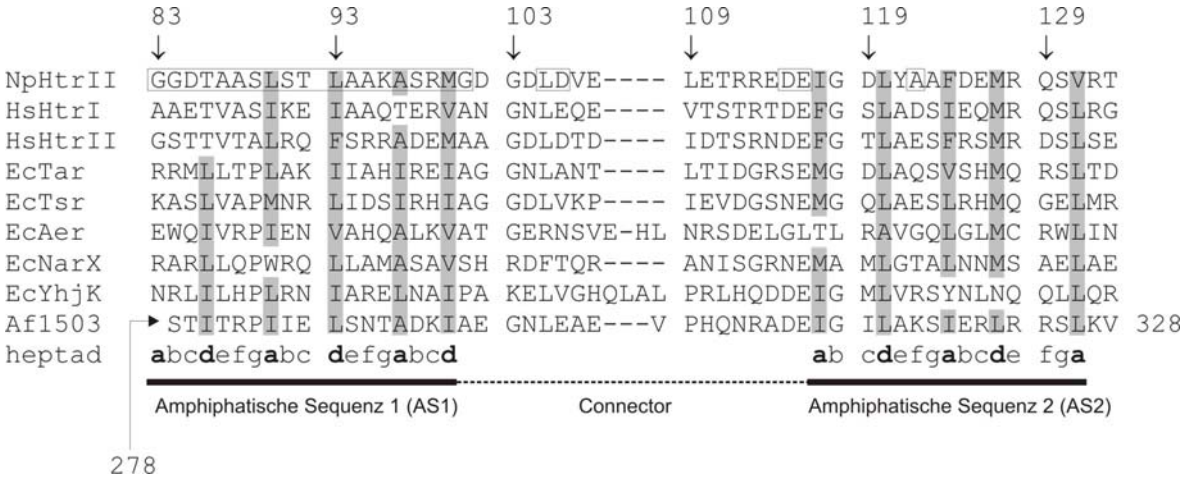


Abb.1.6: Sequenzvergleich der ersten HAMP-Domäne der archaebakteriellen Transducer *Np*HtrII, *Hs*HtrI und *Hs*HtrII mit den Rezeptoren Tar, Tsr, Aer und NarX aus *E. coli* und dem 1503 aus *Archaeoglobus fulgidus*. Zusätzlich wird das *E. coli* Protein YhjK verglichen.

Die Abbildung 1.6 veranschaulicht zudem die hohe Sequenzhomologie der HAMP-Domäne zwischen verschiedenen Proteinen der Archaebakterien und Eubakterien.

Auf die zwei HAMP-Domänen (bei *E.coli* 1 HAMP-Domäne) folgt eine Methylierungs-Domäne, die die Aktivität der Signaldomäne moduliert, indem sie eine wichtige Rolle bei der Adaptation des Systems spielt (siehe unten).

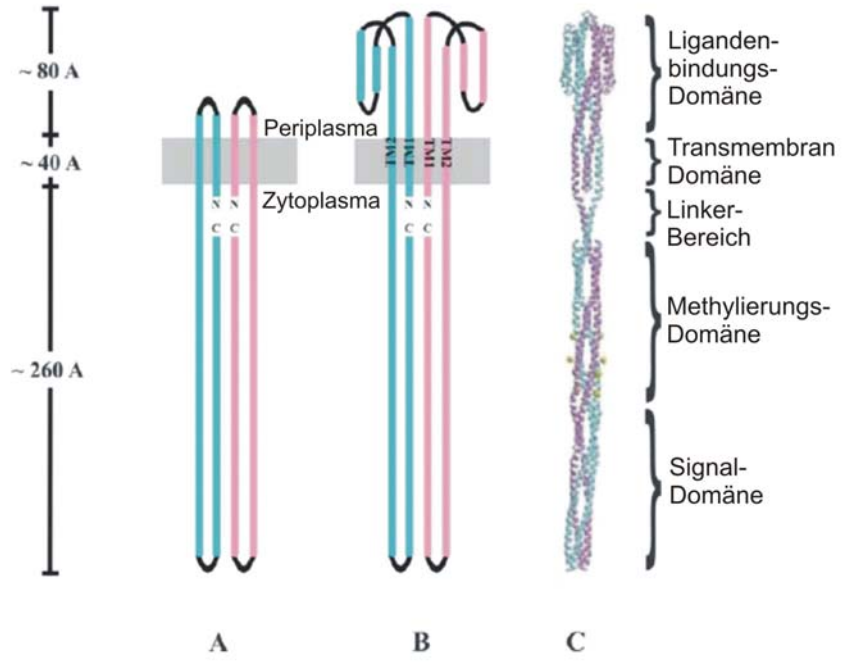


Abb. 1.7: Schematischer Strukturvergleich des *Np*HtII und des Serin- (Tsr) Rezeptors aus *E. coli*. nach Kim *et al.* (Kim *et al.*, 1999).
A: Dimer des *Np*HtrII.
B: Tsr-Dimer aus *E.coli* als schematische Darstellung.
C: Modell des Tsr-Rezeptors nach Kim *et al.* (Kim *et al.*, 1999).
Rechts: Domänenbezeichnung der Proteine bezüglich ihrer Funktionalität.

Die Chemotaxis-Rezeptoren Tar (Aspartat- und Maltose-Rezeptor) und Trg (Ribose- und Galaktose-Rezeptor) besitzen jeweils vier, der Tsr- (Serin-) Rezeptor fünf Methylierungsstellen (Kehry *et al.*, 1984). Die archaebakteriellen Transducer *Hs*HtrI und *Hs*HtrII weisen fünf Methylierungsstellen bzw. ein Methylierungspaar auf (Koch, 2005; Perazzona & Spudich, 1999).
Das Modell des Serin-Rezeptors von Kim *et al.* (Kim *et al.*, 1999) zeigt eine Länge des zytoplasmatischen Bereichs von ~ 260 Å. Dieses beruht auf der Kristallstruktur des zytoplasmatischen Teils des Chemotaxis-Rezeptors. Die Arbeiten von Weis *et al.* (Weis *et al.*, 2003) schlagen dagegen ein verkürztes Modell der Chemotaxis-Rezeptoren vor. Sie haben durch elektronenmikroskopische Aufnahmen des Serin-Rezeptors, der sich in isolierten Membranfraktionen von überexprimierten Zellen befand, eine ca. 20 % igeVerkürzung der zytoplasmatischen Domäne bestimmt. Dadurch wird eine kompaktere Anordnung der Polypeptide in der Linker-Region angenommen, die direkt an der Membran (s. Abb. 1.8) lokalisiert ist. Außerdem konnte die Kristallstruktur der Ligandenbindungs-Domäne des Tar-Rezeptors bestimmt werden (Bowie *et al.*, 1995; Milburn *et al.*, 1991).

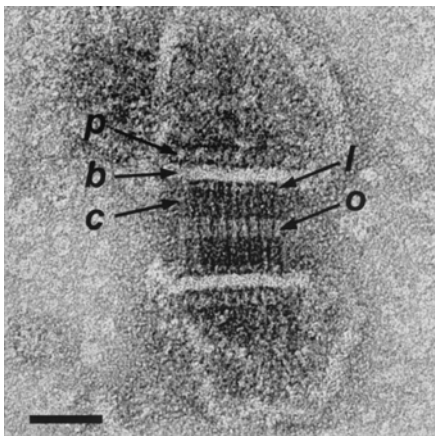


Abb. 1.8: Elektronenmikroskopische Aufnahme von isolierten Tsr Doppelmembranen. Ein Zwilling der Doppelmembran ist gekennzeichnet um die Topologie des Rezeptors zu verdeutlichen. p: periplasmatische Ligandenbindungs-Domäne; b: Membran Doppelschicht; c: zytoplasmatische Domäne; o: Überlappende Region; l: vermutlicher Linker-Bereich; Größe: 25 nm.

Im Allgemeinen wird heute davon ausgegangen, dass die Rezeptoren nicht als voneinander unabhängige Dimere in der Zelle vorkommen, sondern, dass sie in der Nähe der Flagellen größere Aggregate bilden. In einem Modell wird ein „Trimer of Dimer“ angenommen, die sich in einem Cluster organisieren (Ames *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Maddock & Shapiro, 1993). In diesen Clustern wurden auch CheA und CheW Proteine gefunden, was vermuten lässt, dass die Rezeptoren durch diese Che-Proteine in einem zweidimensionalen Gitter zusammengehalten werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteine im Verhältnis 6 Tsr:4 CheW:1 CheA in einem Komplex angeordnet sind (Levit *et al.*, 2002).

Durch die zusätzliche 2. HAMP-Domäne in den archaebakteriellen Transducern kommt die Frage auf, ob Unterschiede in der Signalweiterleitung zur Signaldomäne und der anschließenden Signaltransduktionskaskade im Vergleich zu den Chemorezeptoren vorliegen.

In der archaebakteriellen Phototaxis bewirkt eine Lichteinstrahlung eine Aktivierung der sensorischen Rhodopsine und Ionenpumpen, wodurch es zu einem sogenannten Photozyklus (s. Abb. 1.9) kommt.

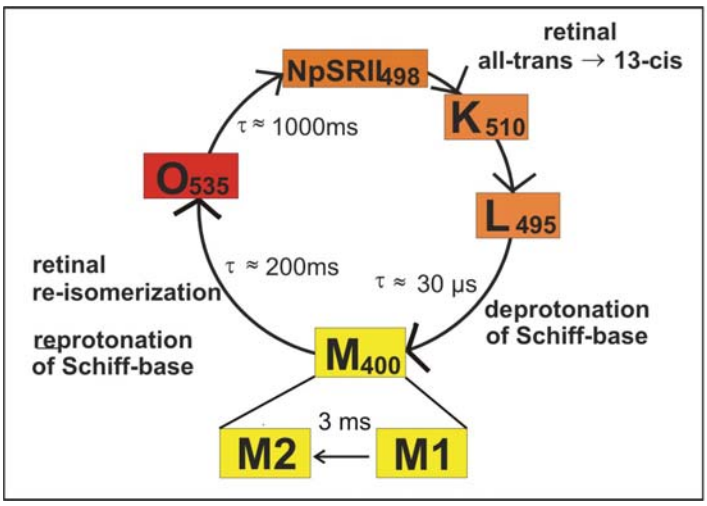


Abb. 1.9: Modell des Photozyklus des photophoben Rezeptors *Np*SRII aus *N. pharaonis* als Beispiel. Die Intermediate sind mit den Buchstaben K, L, M und O bezeichnet. Die Absorptionsmaxima sind als Indizes angegeben (Chizhov *et al.*, 1998).

Der Photozyklus ist charakterisiert durch verschiedene Intermediate des Proteins, die während des Zyklusses nacheinander entstehen und anschließend wieder in den Grundzustand des jeweiligen Proteins zurückkehren. Die Photozyklen der 4 archaebakteriellen Rhodopsine (SRI, HR und BR) wurden im Detail untersucht (zusammengefasst in (Engelhard *et al.*, 2003; Schäfer *et al.*, 1999; Spudich *et al.*, 2000)). *Np*SRII wurde von Chizhov *et al.* (Chizhov *et al.*, 1998) detailliert charakterisiert und ist schematisch in Abbildung 1.9 dargestellt. Die Absorption eines Photons führt zu einer Isomerisierung des Retinals im *all-trans* Grundzustand zur *13-cis* Konfiguration (K-Intermediat). Dieses verursacht wiederum eine Konformationsänderung des Proteins vom K- zum L-Zustand. Die Schiff'sche Base wird daraufhin deprotoniert und gibt ihr Proton an die Aminosäure Asp-75 ab, die im extrazellulären Protonenkanal lokalisiert ist, wodurch das M-Intermediat gebildet wird. Dieses Intermediat ist durch einen Übergang vom M1 in den M2-Zustand charakterisiert, der als Hauptschritt des Photozyklusses bezeichnet werden kann. In dieser Umwandlung erfolgt eine Konformationsänderung des Proteins, wodurch das Signal an den Transducer weitergegeben wird. Die nächsten Schritte beinhalten die Reprotonierung der Schiff'schen Base und die Reisomerisierung des Retinals (M → O). Schließlich relaxiert das Protein in den Grundzustand (O → *Np*SRII).

Eine zweite Charakteristik der bakteriellen Rhodopsine (mit Ausnahme vom HR) ist ihre Fähigkeit, während des Photozyklusses, Protonen über die Plasmamembran zu transportieren. Durch die hohe Effizienz des BR Protonen über die Membran aus dem Zytoplasma in den extrazellulären Raum zu befördern, entsteht ein Protonengradient. Dieser dient der Energiegewinnung durch ATP-Synthese (Marwan & Oesterhelt, 2000; Racker & Stoeckenius, 1974). Im Gegensatz zum BR pumpt HR durch Lichtaktivierung Chlorid-Ionen ins Zytoplasma der Zelle. Der so entstandene Chloridgradient spielt eine physiologische Rolle bei der

Energiegewinnung des Bakteriums (zusammengefasst in (Schäfer *et al.*, 1999)). Optimale Aktivität besitzen beide Ionenpumpen bei orangenem Licht der Wellenlänge λ_{max} = 570 nm.
Aus ESR-Daten (Klare *et al.*, 2004; Wegener *et al.*, 2000) wurde geschlossen, dass bei den sensorischen Rhodopsinen das Lichtsignal während des Übergangs von M_1 zu M_2 im Photozyklus auf die Transducer übertragen wird. Das daraus entwickelte Modell der Signalübertragung zwischen den Proteinen zeigt durch Lichtanregung im SRII und im BR eine auswärts gerichtete Bewegung der fünften Helix (Helix F) auf. Gleichzeitig wird die zweite transmembrane Transducer-Helix (TM2) in einer Rotationsbewegung von etwa 20° mitgenommen. Diese Konformationsänderung könnte zu der Aktivierung der zytoplasmatischen Signaltransduktions-Kaskade führen. Die Rückwärtsbewegung in den Grundzustand der beiden Proteine erfolgt dagegen entkoppelt. Die TM2-Helix des Transducers kehrt mit einer Zeitverzögerung von ca. 200 ms in den Grundzustand zurück. Für die Chemorezeptoren ist dagegen bei einem positiven Signal, z.B. die Bindung eines Aspartats an den Tar-Rezeptor, eine Kolbenbewegung um ca. 1,6 Å der TM2 in Richtung des Zytoplasmas postuliert, die sich gleichzeitig um 5° neigt (Chervitz & Falke, 1996; Falke & Hazelbauer, 2001).
Unabhängig von diesem speziellen Mechanismus führt die Konformationsänderung zu einer Aktivierung der Signaldomäne. Hier beginnt ein Zwei-Komponenten System, welches eine große Homologie zu der Chemotaxis der Eubakterien aufweist. Rudolph und Oesterhelt (Rudolph *et al.*, 1995; Rudolph & Oesterhelt, 1995;Rudolph & Oesterhelt, 1996) konnten dies nachweisen, indem sie die für die Chemotaxis notwendigen Che-analogen Proteine in *H. salinarum* deletierten. Die Bakterien waren dadurch nicht mehr in der Lage auf chemotaktische wie auch auf phototaktische Signale zu reagieren. Damit konnte bewiesen werden, dass in Archaebakterien das gleiche Zwei-Komponenten-System der Chemotaxis zur Durchführung der Phototaxis benutzt wird.
Ein Zwei-Komponenten-System ist dadurch gekennzeichnet, dass ein Signal von einer Histidin-Kinase aufgenommen wird, die das Signal in Form einer Übergabe eines Phosphat-Restes an einen „Respons Regulator“ weiterleitet. Dieses zweite Protein wird dadurch aktiviert und löst eine Antwort des Bakteriums auf den äußeren Reiz aus (s. Abb. 1.10).

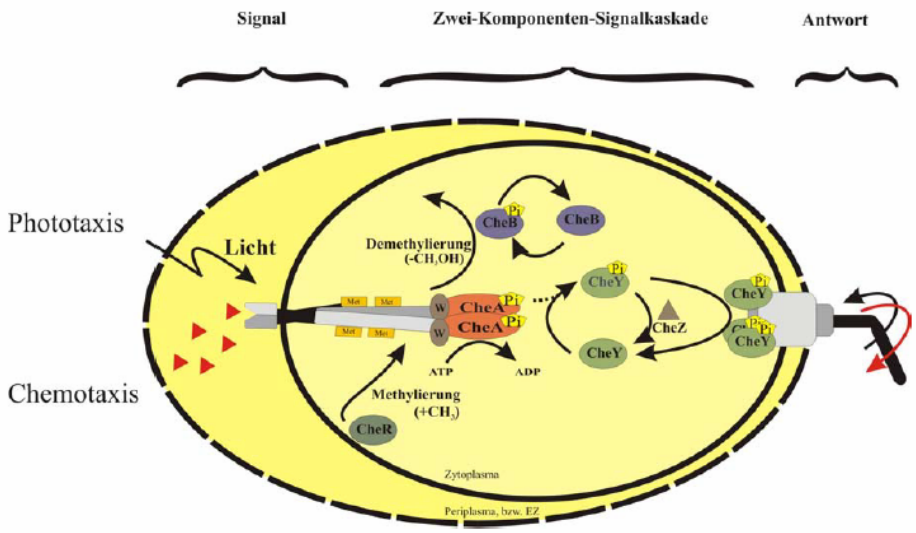


Abb. 1.10: Schematische Darstellung des Zwei-Komponenten-Systems der archaebakteriellen Phototaxis und der eubakteriellen Chemotaxis. Ein Signal wird von einem Rezeptor aufgenommen und an das Zellinnere weitergeleitet, wo es zu einer spezifischen Antwort des Systems kommt.

In den Archaebakterien und Eubakterien ist an die Signal-Domäne die Histidin-Kinase CheA als Dimer über das Adapterprotein CheW gebunden. CheA verfügt über eine Autophosphorylierungs-Aktivität, wodurch bei einem negativen Signal ein Histidin-Rest unter ATP Verbrauch an einer der Untereinheiten des CheA-Dimers phosphoryliert wird. Das Phosphat wird dann an einer der beiden Response-Regulatoren CheY (Aspartat-Kinase) oder CheB (Methyl-Esterase) weitergegeben. CheY-P diffundiert daraufhin durch das Zytoplasma zum Flagellenmotor. Hier interagiert es mit den FliM Proteinen im C-Ring des Flagellenmotors, die ca. 30 Bindungsstellen für das CheY-P haben, und bewirkt eine Erhöhung der Umschaltfrequenz des Flagellenmotors.

Im Fall eines positiven Reizes wird die Autophosphorylierungs-Aktivität des CheA herunter gesetzt, was zu einer geringeren Konzentration von Che-P führt. Zusätzlich wird das noch vorhandene CheY-P dephosphoryliert durch eine Autophosphatase-Aktivität und durch die Phosphatase CheC (in *E. coli*: CheZ), die in den Archaebakterien *H. salinarum* und *N. pharaonis* von Szurmant *et al.* identifiziert wurde (Szurmant *et al.*, 2004). Die geringere CheY-P Konzentration führt zu einer längeren Schaltfrequenz des Flagellenmotors. Damit kommt es zu einer kontinuierlichen Schwimmbewegung des Bakteriums.

Eine konstante Reizeinwirkung auf das Bakterium führt zur Adaptation der Zelle, die durch zwei Proteine, die Methyl-Esterase CheB und die Methyltransferase CheR, bewirkt wird. Von der Histidin-Kinase CheA phosphoryliertes CheB (CheB-P) kann dann eine Glutaminsäure bzw. die Carboxylmethylester an den Methylierungsstellen der Transducer bzw. Rezeptoren demethylieren. Dabei entsteht Methanol und freies γ-Carboxyl der Glutaminsäure. Durch diese

Demethylierung wird die Autophosphorylierungs-Aktivität des CheA herunter geregelt und es erfolgt eine Rückkehr zu kontinuierlichem Schwimmen.
Auf der anderen Seite wird durch ein starkes positives Signal (= geringe CheA-Aktivität) das Methylierungsniveau stark erhöht. Dieses wird durch die konstitutive Methyl-Transferase CheR verursacht. Sie methyliert den Rezeptor bzw. Transducer indem Methylgruppen von S-adenosylmethionin auf die γ-Carboxylgruppe eines bestimmten Glutaminsäurerestes der Methylierungsstellen übertragen werden. Die CheA-Aktivität wird durch diesen Mechanismus wieder erhöht.
Da sich die Konzentrationen des phosphorylierten CheB und des CheR in der Regel um einen ähnlichen Wert befinden, kann das Bakterium sich an seine Umgebung adaptieren. Dadurch ist es der Zelle ermöglicht, sich unabhängig von lokalen Konzentrationen eines Lock- bzw. Schreckstoffes in Richtung graduell besserer Bedingungen zu orientieren.
Die hohe strukturelle Homologie und physiologische Ähnlichkeit der archaebakteriellen und eubakteriellen Zwei-Komponenten-Systeme macht es wahrscheinlich, dass gleiche Mechanismen der Signaltransduktion benutzt werden, so dass die einzelnen Komponenten austauschbar sind.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist, die bisher gefundenen strukturellen Erkenntnisse über den archaebakteriellen Transducer HtrII aus dem Bakterium *Natronomonas pharaonis* zu bestätigen und weiterführend zu vervollständigen, um genauere Informationen über die Weiterleitung des Lichtsignals vom Rezeptor SRII über den transmembranen Teil des HtrII zur Signal-Domäne des Transducers zu erlangen und das Verständnis der transmembranen Signaltransduktion zu verbessern. Zu diesem Zweck soll zunächst das vollständige *Np*HtrII für weitergehende Untersuchungen durch heterologe Expression in *E. coli* zugänglich gemacht werden. Bisherige Studien wurden lediglich mit C-terminal verkürzten Konstrukten durchgeführt, denen die gesamte Methylierungs- und Signal-Domäne fehlt. Zur Charakterisierung des Proteins sollen im Weiteren sowohl Gelfiltrations-Analysen als auch CD-Spektroskopie angewendet werden. Zusätzlich werden Laserblitz-Absorptions-Spektrometrie Messungen und ITC-Messungen durchgeführt, um die Funktionalität des Konstruktes zu testen.
Zur Strukturaufklärung der fehlenden zytoplasmatischen Bereiche sollen zudem lösliche *Np*HtrII-Fragmente kloniert werden. Mit diesen zytoplasmatischen Fragmenten und mit dem *Np*HtrII sollen in Zusammenarbeit mit der Gruppe von G. Büldt (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) Kristallisationsversuche durchgeführt werden.
Im Weiteren soll die Methode der Elektronen-Resonanz-Spektroskopie zur Anwendung gebracht werden, um sowohl strukturelle Daten als auch Informationen über die Signalweiterleitung im zytoplasmatischen Bereich des Transducers, einschließlich der Interaktion mit der Histidin-Kinase CheA, zu erlangen.
Gleichzeitig sollen auf Grundlage der hohen Homologie und Ähnlichkeit zwischen der eubakteriellen Chemotaxis und der archaebakteriellen Phototaxis Phototransducer-Chemo-

rezeptoren-Chimären entwickelt werden, mit dem Ziel, *in vitro* Daten auf die physiologische Ebene zu verifizieren. Diese Homologie lässt erwarten, dass die Chimären aktiv sein könnten. Dies wurde z.B. von Spudich dokumentiert, der Chimäre Transducer, bestehend aus der archaebakteriellen Membrandomäne und der eubakteriellen zytoplasmatischen Domäne, in *E. coli* exprimiert hat und dies zu phototaktisch aktiven Zellen führt (Jung *et al.*, 2001; Trivedi & Spudich, 2003). Aus funktionellen Fusionsproteinen lassen sich eventuell neue Erkenntnisse gewinnen, die zur besseren Aufklärung der Vorgehensweisen dieser biologischen Systeme führen. Zusätzlich kann man die gefundenen Ergebnisse auf andere verwandte Systeme übertragen. Die Chimären sollen aus dem transmembranen Teil des *Np*HtrII fusioniert mit dem zytoplasmatischen Teil des Tar-Rezeptors aus *E. coli* bestehen. Um eine erste Charakterisierung der Fusionsproteine durchzuführen und um Einblicke in die Signaltransduktionskaskade zu erhalten, soll die Elektronen-Resonanz-Spektroskopie erneut eingesetzt werden. Des Weiteren soll die Funktionalität der Chimären mit Hilfe eines *in vitro* Phosphorylierungs-Assay sowie einem *in vivo* Schwimmversuch untersucht werden. Durch den Versuch Phototaxis in *E. coli* Zellen einzuführen könnte ein Zugang zur Physiologie der Zellen möglich sein.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind von p.A.-Qualität und werden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von folgenden Firmen bezogen: Baker (Groß-Gerau), BioRad (München), GIBCO BRL (Neu Isenburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim).
Für molekularbiologische Reaktionen werden Produkte von den Firmen Boehringer (Mannheim), New England Biolabs (NEB, Schwalbach), Pharmacia (Freiburg) und Promega (Mannheim) verwendet.
Zur Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Plasmiden werden Quiagen Kits (Hilden) verwendet. Zur DNA-Sequenzierung werden Reagenzien von Applied Biosystems, ABI (Foster City, CA94404, USA) bezogen. Restriktionsenzyme werden von New England Biolabs (Schwalbach), RNase A von Boehringer (Mannheim) und der 1 kb DNA-Molekulargewichtsmarker von der Firma Invitrogen (Groningen) bezogen.
Zur Zellanzucht werden Nährmedien von der Firma GIBCO BRL verwendet. Antibiotika, sowie all-*trans* Retinal stammen von der Firma Sigma.
Das zur Aufreinigung benutzte Ni^{2+}-NTA des Typs Superflow wird von Quiagen verwendet. N-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) wird von der Firma Calbiochem (Schwalbach am Taunus) bezogen.
Als Protein-Molekulargewichtstandard für SDS-Gele wird der LMW der Firma Amersham Bioscience (Freiburg) verwendet: Phosphorylase b (97 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Kohlenstoff-Anhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa) und α-Lactalbumin (14,4 kDa). Als Protein-Molekulargewichtstandard für Western Blots dient der Prestained Protein Marker, Broad Range (Premixed Format) der Firma New England Biolabs: MBP-ß-Galaktosidase (175 kDa), MBP-Paramyosin (83 kDa), Glutamin-Dehydrogenase (62 kDa), Aldolase (47,5 kDa), Triosephosphat Isomerase (32,5 kDa), ß-Lactoglobulin A (25 kDa), Lysozym (16,5 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa). Die PVDF-Membran stammt von Bio-Rad (München) und entsprechende Röntgenfilme werden von Kodak bezogen.
Der Spinlabel (MTSL) stammt von der Firma Toronto Research Chemicals (TRC, Toronto). Das radioaktive ATP wird von der Firma Amersham Bioscience (Freiburg) geliefert. Der Gelfiltrations-Standard LMW bzw. HMW wird ebenfalls von der Firma Amersham bezogen.

2.2 Instrumentation

Die Zellanzucht der *E.coli* Bakterien erfolgt unter aeroben Bedingungen in den Schüttlern der Firma New Brunswick (Nürtingen). Die 15 L und 30 L Fermenter stammen von der Firma Biotech International (Melsungen).
Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen erfolgt durch Elektroporation mittels eines GenePulsers der Firma BioRad (Müber Nachtchen) in Elektroporationsküvetten (2 mm) der Firma Invitrogen (Leek).
Sedimentationen erfolgen in den Zentrifugen RC28S und RC5B der Firma Sorvall (Bad Homburg) in den Rotoren SS-34, F-28/36 und GS3 sowie in der Ultrazentrifuge Optima L-80 XP Ultrazentrifuge der Firma Beckmann in den Rotoren Ti-70 und Ti-45. Zellaufschlüsse werden mit einem Mikrofluidizer M-110S der Firma Microfluidics Corp. (Newton) oder einem Ultraschallgerät der Firma Heinemann (Schwäbisch Gmünd) durchgeführt.
Polymerase-Kettenreaktionen erfolgen in den Thermocyclern PCR-Express und PCR-Sprint der Firma Hybaid (Heidelberg). DNA-Sequenzierungen werden mit dem Sequenzierungsgerät Model 377 von Applied Biosystems oder von der Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt.
UV/Vis-Spektren werden mit den Spektrometern UV-2401 PC UV-Vis Recording Spectrophotometer (Shimadzu) sowie DU-640 von Beckmann aufgenommen. Für pH-Messungen wird das pH-Meter 766 Calimatic und die pH Elektrode Typ pH/pt 1000 der Firma Knick (Berlin) verwendet.
Polyacrylamid-Elektrophoresen erfolgen mit dem Mini-PROTEAN II-System der Firma BioRad. Zum Elektrotransfer auf Membranen wird das Fastblot B43 Gerät der Firma Biometra (Göttingen) verwendet.
Zum Ankonzentrieren von Proteinlösungen werden Centricons YM-50 und YM-10 von Amicon (Bedfort, USA) oder 50MWCO, 30MWCO 10MWCO und 5MWCO von Millipore (Bedford, USA) verwendet, wobei die Zentrifuge Allegra X-15R von Beckmann Coulter sowie die Zentrifuge 5810R von Eppendorf (Hamburg) benutzt wird.
Die Gelfiltrationschromatographie wird in einem Waters HPLC-System mit folgenden Geräten: 600S Controller, 717 plus Autosampler, 2487 Dual λ Absorbance Detector, durchgeführt. Die verwendete 10/300 GL Säule ist mit einem Superdex 200 Material gefüllt.
Circular-Dichroismus-Messungen werden mit einem J-715 Spectropolarimeter von Jasco (Tokio, Japan) ausgeführt. Phototaxismessungen werden mit dem umgebauten Mikroskop Orthoplan der Firma Leitz (Wetzlar) durchgeführt (Stoeckenius *et al.*, 1988).
Die hier nicht aufgezählten Geräte werden in den entsprechenden Methodenteilen erwähnt.

2.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue	F' Tn *10 proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*^{q} Δ*(lacZ)M15/recA1 andA1 gyrA96*(Nal^r) *Thi hsdR17* (r_k^- m_k^+) *supE44 relA1 lac* (Bullock *et al*., 1987)
E. coli Bl21(DE3)	F$^-$ *omp*T *[Ion] hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^+) λ(DE3) (Studier und Moffatt, 1986)
E. coli Rosetta (DE3)	F$^-$ *omp*T *gal* [*dcm*] [*lon*] *hsd*SB (rB-,mB-) λ(DE3) pRARE(CmR) (Novagen)
E. coli HCB721	Δ*tsr*(7021) *trg*::Tn*10* Δ(*cheA-cheY*)::*Xho*I(Tn*5*) (Conley *et al.*, 1989)
E. coli RP437	Wildtyp für Chemotaxis *Thr(Am)*-1 *leu B6 tonA31 lacY1 tsx-78 sup0 eda50 his-4 rfbD1 mgl-51 rpsL136 xyl-5 mtl-1 metF(Am)159 thi-1 ara-14* (Scharf *et al.,* 1998a)
E. coli UU1250	Derivat des RP437: Δtsr-7028 Δ(tar-tap) 5201 Δtrg-100 Δaer-1 (Ames *et al.*, 2002)
Natronomonas pharaonis SP1/28	hR$^{(+)}$, sR-II$^{(+)}$, Car$^{(+)}$ (Bivin und Stoeckenius, 1986)
E. coli RP437 mit pSM_CT_pTrcNpSRII_a pTrc_*Np*HtrIIwt_His	(Mennes, 2003)
E. coli RP437 mit pSM_CT_pTrcNpSRII_a pSM_Fus_HtrII MCP2_116_247	Zur Verfügung gestellt von S. Mreyen (MPI-Dortmund)
E. coli RP437 mit pSM_CT_pTrcNpSRII_a pSM_Fus_HtrII MCP2_123_254	Zur Verfügung gestellt von S. Mreyen (MPI-Dortmund)
E. coli BL21(DE3)+pArg pET19b-tev	Zur Verfügung gestellt von A.J. Scheidig (Alexandrov *et al.*, 1999; Brinkmann *et al.*, 1989)

Plasmide

pET27bmod	(Klostermeier *et al.*, 1998)
pET27bmod-npHtrII_His	Zur Verfügung gestellt von R. Seidel (MPI-Dortmund)
pTrc_HtrIIwt_His	(Mennes, 2003)
pRPS1	Zur Verfügung gestellt von R. Seidel (MPI-Dortmund)
pDV4	(Scharf *et al.*, 1998b)
pUCBM20	Boheringer Mannheim
pET27b$^+$	Novagen (Abingdon)
pTXB3_INT-N	Zur Verfügung gestellt von R. Seidel (MPI-Dortmund)
pRL22	Zur Verfügung gestellt von B. Scharf (Uni Regensburg)
pET27mod	
*Np*HtrIIMCP2_102-233	(Mennes, 2003)
pET27mod	
*Np*HtrIIMCP2_116-247	Zur Verfügung gestellt von S. Mreyen (MPI-Dortmund)
pET27mod	
*Np*HtrIIMCP2_223-266	Zur Verfügung gestellt von R. Seidel (MPI-Dortmund)
pTrc-99A	Pharmacia
pSM_CT_pTrcNpSRII_a	Zur Verfügung gestellt von S. Mreyen (MPI-Dortmund)
pACYC184	New England Biolabs

Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Die konstruierten Plasmide sind im Anhang aufgelistet.

Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

2.4 Antikörper

Anti-Histidin	Monoklonaler Anti-Polyhistidine Clone His-1 von Sigma.
Anti-mouse-IgG POD-Konjugat	Sekundärer Antikörper aus der Ziege, der mit Peroxidase gekoppelt ist, gegen Maus.
Anti-*Np*HtrII	Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, dessen Paratop gegen die AS 77-149 des Transducers *Np*HtrII gerichtet ist (Wegener, 2000).
Anti-Kaninchen-IgG POD-Konjugat	Sekundärer Antikörper aus der Ziege, der mit Peroxidase gekoppelt ist, gegen Kaninchen (Boehringer).

2.5 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders erwähnt werden molekularbiologische Methoden nach Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel (1987) angewendet.

2.5.1 Zellanzucht

Die Anzucht von *E. coli* Zellen zur Expression oder Plasmidpräparation erfolgt in LB-Medium (10 g Pepton(140)-Hydrolysat, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl ad 1000 ml, pH 7,2 - 7,5) in 5 ml Reagenzgläsern oder 25 – 5000 ml Erlenmeyer-Kolben mit Schikane (Volumenverhältnis Kultur : Kolben = 1:3 – 1:4). Die Inkubationstemperaturen betragen 37°C bei 150 – 170 Upm oder 30°C bei 120 – 150 Upm.
Die Zellanzucht zu Phototaxismessungen erfolgt in Trypton-Medium (1 % Trypton, 0,5 % NaCl). Außerdem werden „gute Schwimmer“ auf Schwarmplatten (1 % Trypton, 0,5 % NaCl, 0,3 % Agar) selektiert.
Zur Selektion der Bakterien werden gegebenenfalls die Antibiotika Tetracyklin (12,5 µg/ml) und/oder Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) und/oder Chloramphenicol (30 µg/ml) zugefügt.
Die Zelldichte wird mittels Trübungsmessung bei 578 nm (1 $OD_{578} \approx 2 \times 10^8$ Zellen/ml) ermittelt.
Größere Mengen *E. coli* Zellen werden in 15 L oder 30 L Fermentern der Firma Braun Biotech GmbH (Melsungen) gezogen.
Natronomonas pharaonis wird in 25 – 100 ml Erlenmeyer-Kolben ohne Schikane (Volumenverhältnis Kultur : Kolben = 1:3 – 1:4) bei 40°C und 120 Upm unter orangefarbenem Licht in einem synthetischen Minimalmedium (s. Tabelle 2.5.1) herangezogen.
Zur Herstellung von Agar-Platten wird 1,5 % Agar vor dem Autoklavieren zum synthetischen Minimalmedium zugefügt oder zur Selektion hochmotiler Bakterien 0,3 % Agar für Schwarmplatten.

Tabelle 2.5.1: Synthetisches Minimalmedium für *Natronomonas pharaonis*

Substanz	Endkonzentration / 1L	Substanz	Endkonzentration / 1L
NaCl	3,4 M	L-Glutaminsäure Na-Salz	24 mM
Na_2CO_3	175 mM	L-Alanin	0,4 mM
$MgSO_4$ x $7H_20$	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_2PO_4	2 mM	L-Threonin	0,4 mM
Na_2HPO_4	2 mM	L-Tyrosin	0,4 mM
$FeSO_4$ x $7H_2O$	5 µM	L-Valin	0,4 mM
$CaCl_2$ x $2H_2O$	3 µM	L-Arginin	0,4 mM
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	3 µM	Glycin	0,8 mM
$MnCl_2$ x $4H_2O$	4 µM	L-Methionin	0,4 mM
$CuSO_4$ x $5H_2O$	4 µM	Thiamin	15 µM
L-Cystein	2,9 mM	Folsäure	15 µM
L-Leucin	3,8 mM	Biotin	2 µM

pH-Wert 9,2 – 9,3 des Mediums mit 10 % Salzsäure.

2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA zur Restriktionskontrolle wird folgendermaßen durchgeführt: Die alkalische Lyse wird nach Birnboim und Doly (1979) ausgeführt. Nachdem die genomische DNA durch Zentrifugation abgetrennt wird, erfolgt eine Ethanol-Fällung der Plasmide. 2,5 Volumenäquivalente abs. EtOH werden zur Zelllösung zugefügt. Die Fällung erfolgt durch 15 minütige Zentrifugation bei 4°C. Das an Luft getrocknete Pellet wird in 30 µl Wasser mit 2 µl RNase A (1 mg/ml) aufgenommen.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA zur Sequenzierung und weiteren Klonierung wird ein Mini-Präparations Kit (QIAprep Spin Miniprep Kit) von Quiagen (Hilden) verwendet.

Größere Mengen an Plasmid-DNA werden mittels einer Anionenaustauscher-Säule des Perfectprep Plasmid Midi-Kits von Eppendorf (Hamburg) hergestellt.

2.5.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer DNA-Lösung erfolgt durch Absorptionsmessung bei 260 nm an einem BioPhotometer der Firma Eppendorf. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte bei gereinigter DNA bei ca. 2,1 liegen. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht 50 µg DNA pro ml. Bei kleineren Mengen DNA erfolgt eine Konzentrationsbestimmung durch Abschätzung der Bandenintensität im Vergleich zum Marker im Agarosegel (s. 2.5.5).

2.5.4 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgt in 15 µl Ansätzen (Kontrollrestriktionen) oder 50-100 µl Ansätzen (präparative Restriktion) für 1 – 5 h bei 37°C in dem vom Hersteller für das jeweilige Restriktionsenzym entsprechenden Puffer. Die Menge des Enzyms wird ebenfalls nach Angaben des Herstellers zugefügt.

2.5.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Analyse oder Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgt eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese. Die DNA-Proben werden dazu mit 3 x Probenpuffer (TBE-Puffer, 10 % Ficoll, 0,025 % Bromphenolblau und 0,025 % Xylencyanol) versetzt und auf ein 0,6 – 1,5 % iges Agarosegel aufgetragen. Für Gele und Laufpuffer wird TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,9 mM EDTA, pH 8,9) verwendet. Die Färbung der DNA erfolgt durch Zugabe von 0,6 mg/l Ethidiumbromid zum Puffer. Bei einer Spannung von 3 – 4,5 V/cm werden die DNA-Fragmente aufgetrennt. Als Marker dient ein 1 kb DNA-Standard. Zur Sichtbarmachung der Banden werden die Gele unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm photographiert.

2.5.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt mittels des Gel Extraktions Kits von Quiagen. Zuvor werden die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem Gel unter UV-Licht (366 nm) herausgeschnitten.

2.5.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgt in 20 µl Ansätzen. Diese enthalten neben H_2O und 1µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) die vom Hersteller empfohlene Menge Ligase-Puffer sowie die DNA-Fragmente in einem Verhältnis von 1:3 (Vektor : Insert). Die Inkubation des Ansatzes wird bei Raumtemperatur für 3 - 6 h durchgeführt. Anschließend werden 30 µl Wasser zugefügt und bei 4°C oder – 20°C (zur längeren Lagerung) bis zur Transformation gelagert.

2.5.8 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation und Hitzeschock

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen erfolgt durch Elektroporation mit Plasmid-DNA nach der Methode von Dower *et al.* (1988). Hierzu werden 2 - 10 ng supercoiled Plasmid oder 25 µl des Ligationsansatzes (s. 2.5.6) mit ca. 80 µl einer 10 %igen Glycerinkultur kompetenter Zellen ($OD_{578} \approx 120 – 160$) vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm überführt. Die Transformation erfolgt in einem GenePulser der Firma BioRad (München) durch einen Puls von 1,5 kV, 800 Ω, 25 µF und einer Zeitkonstanten zwischen 7 und 16 ms. Anschließend werden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C und 150 – 170 Upm inkubiert. Die weiterfolgende Inkubation erfolgt bei 37°C auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum.

Die Transformation von Plasmid-DNA in hitzekompetente *E. coli* Zellen erfolgt durch Hitzeschock bei 42°C für ca. 50 sec. Zuvor werden die Zellen mit der DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock erfolgt eine weitere Inkubation von 2 min auf Eis. Anschließend wird 0,5 ml NZY^+-broth Medium (siehe unten) zugefügt und die Zellen für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend erfolgt eine Ausplattierung auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum.

NZY^+ broth Medium: 10 g Trypton
5 g Hefe Extrakt
5 g NaCl
add 1L H_2O, pH 7,5
Nach dem Autoklavieren werden noch folgende sterilfiltrierte Substanzen zugefügt:
12,5 ml 1 M $MgCl_2$
12,5 ml 1 M $MgSO_4$
20 ml 20 % Glucose

2.5.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgt durch PCR (Mullis & Faloona, 1987). Der Standardansatz sieht folgendermaßen aus:
5 – 20 ng DNA Matrize
30 – 50 pmol der entsprechenden Primer
je 10 nmol der vier dNTP's
1 U Pfu-Polymerase
5 µl 10 x Polymerasepuffer
ad 50 µl mit H_2O
Die Pfu-Polymerase wird erst nach einem 2 - 5 minütigen Denaturierungsschritt und eventuell anschließender Kühlung der Proben auf Eis dem Ansatz zugefügt.
Die PCR-Programme der entsprechenden Versuchsteile sehen folgendermaßen aus:
Die Mutation des pTXB3_N_His_TEV mut NcoI beruht auf der „Overlap Extension"-Methode (Ho *et al.,* 1989), wobei in einer ersten PCR zwei DNA-Fragmente mit Hilfe je eines flankierenden und einem Mutationsprimer hergestellt werden. In einer anschließenden zweiten PCR-Runde werden beide DNA-Fragmente miteinander zu einem vollständigen Gen-Abschnitt verbunden. Das folgende PCR-Programm 1 wird verwendet:

96-98°C	2'-5'	→	Proben auf Eis, Zugabe der Polymerase
96-98°C	1'-2'		
96-98°C	15''-1'	}	x 20-25
53-63°C	30''		
72°C	75''-2'		
72°C	2'-4'	→	4°C

Die Amplifikation der zytoplasmatischen Fragmente des *Np*HtrII erfolgt ebenfalls mit dem PCR-Programm 1.
Die Cysteinmutanten werden mittels der „Overlap Extension"-Methode hergestellt (PCR-Programm1).
Das PCR-Programm 2 wird zur Amplifikation des *Np*HtrII-Teils der Chimären und des Tar-Teils verwendet:

96°C	4'-5'	⇒	hot start: Zugabe der Polymerase
96°C	40''	}	x 20-25
48°C/53°C	30''		
72°C	1'-2'		
72°C	3'	→	4°C

Zur Mutation der *Nde*I-Schnittstelle im Tar-Gen wird die „Overlap Extension"-Methode mit PCR-Pogramm 1 angewendet.

Der Tar-Teil der Chimären und die Ligations-PCR der „Overlap Extension"-Methode werden mit PCR-Programm 1 amplifiziert.
Die Amplifikation der Che-Proteine und der Chimären erfolgt mittels des PCR-Programms 2.
Für die Amplifizierung des Tar-Gen-Teils und für die Ligations-PCR der beiden Tar-Fragmente wird das PCR-Programm 1 angewendet.
Die Mutationen des pTrc-99A Vektors werden mit Hilfe des QuikChange site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene durchgeführt. Das PCR-Programm 3 zur Amplifizierung lautet folgendermaßen:

98°C	3'	⇒ Abkühlen der Proben auf Eis, dann Zugabe der Polymerase
98°C	30''	
98°C	30''	}
72°C	8'	} x 12
72°C	3'	→ 4°C

Das *Np*SRII-Gen wird mit dem PCR-Programm 4 amplifiziert:

96°C	3'	⇒ Abkühlen der Proben auf Eis, dann Zugabe der Polymerase
96°C	1'	
96°C	30''	}
45°C	30''	} x 8
72°C	75''	}
96°C	30''	}
58°C	30''	} x 12
72°C	75''	}
72°C	3'	→ 4°C

Nach der PCR-Amplifikation werden die DNA-Fragmente mittels eines Agarosegels (s. 2.5.5) aufgetrennt und anschließend aus der Agarose extrahiert (s. 2.5.6) oder mit Hilfe des PCR Purification Kits von Quiagen (Hilden) gereinigt.

2.5.10 Oligonukleotid Annealing

Die zu hybridisierenden Oligonukleotide werden in den Konzentrationen von 50 pmol/µl in Annealing-Puffer (5 mM NaCl, 2mM Tris pH 7,5) zusammengefügt und auf 96°C für 30 sec erhitzt. Danach werden die Proben aus dem Heizblock herausgenommen und langsam bei RT abgekühlt.

2.5.11 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wird ein Cycle-Sequencing mit fluoreszens-markierten Didesoxy-nukleotiden (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Dazu wird ein Reaktionsansatz von 20 µl Gesamtvolumen verwendet:
150 – 300 ng DNA, 4 µl Terminations-Mix (Big-Dye-Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit), 2 µl Sequenzierungs-Puffer, 3,2 pmol Primer ad H_2O
Anschließend erfolgt eine Amplifikation durch PCR mit folgendem PCR-Programm:

96°C 10 sec
55°C 5 sec } x 25
60°C 4 min

Das PCR-Produkt wird wie folgt aufgearbeitet: Zugabe von 1 µl 125 mM EDTA, 2 µl 3 M Na-Acetat und 50 µl abs. EtOH. Inkubation bei RT für 15 min und anschließende Zentrifugation (10 min, 10000 Upm, 4°C). Dann erfolgt ein Waschschritt mit 400 µl 70 % EtOH. Das getrocknete Pellet wird in einem DNA-Sequencer oder von der Firma AGOWA (Berlin) analysiert.

2.5.12 Herstellung von Glycerinstabs

Zur Herstellung von Glycerinstabs werden 2 – 3 ml Zellkultur bis zu einer OD von 0,6 – 0,8 inkubiert. Dann werden 750 µl der Zellkultur mit 250 µl 80 % Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert.

2.6 Proteinchemische Methoden

2.6.1 Proteinexpression in *E. coli*

Zur Expression von Proteinen werden die *E. coli* Stämme BL21(DE3) bzw. *E. coli* Rosetta (DE3) verwendet. Die Hauptkultur wird auf eine OD_{578} von ≈ 0,1 angeimpft. Die Inkubation erfolgt bei 37°C und 150 Upm bis die Zellkultur eine OD_{578} von 1,2 – 2,5 erreicht hat. Die Proteinexpression wird durch Zugabe von 0,5 mM – 1 M IPTG induziert und anschließend für weitere 2,5 – 3 h inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgt durch Zentrifugation bei 7000 Upm für 10 min bei 4°C. Ein Waschschritt folgt, bei dem die Zellen in Zellwaschpuffer (ZWP: 150 mM NaCl, 25 mM Natriumphosphat pH = 8,2 mM EDTA) aufgenommen und erneut durch Zentrifugation pelletiert werden. Das Pellet kann nun bei -80°C oder -20°C bis zur Aufreinigung gelagert werden.

2.6.2 Zellaufschluss und Aufreinigung der Proteine

Allgemeiner Zellaufschluss

Das Zellpellet wird in 1/100 des verwendeten Kulturvolumens ZWP (s. 2.6.1) unter Zugabe einer Spatelspitze DNaseA resuspendiert. Beim Aufschluss des *Np*HtrII und seiner Cysteinmutanten werden zusätzlich Protease Inhibitor Tabletten (Complete, Protease Inhibitor Tablets, EDTA free, Roche) zugefügt (1 Tablette für 50 ml Zelllösung). Der Aufschluss erfolgt dann im Mikrofluidizer, bei dem die Zellen mechanisch bei 800 bar zerstört werden. Durch Zentrifugation des Zelllysates bei 100.000 x g, 4°C für 1,5 h werden die zytoplasmatischen und periplasmatischen Komponenten (befinden sich im Überstand) von den Membrankomponenten, Zelltrümmern und der DNA getrennt. Bei Aufreinigung von Membranproteinen wird das Sediment in 1/100 des verwendeten Kulturvolumens Puffer A_{mem} (s. u.) homogenisiert und anschließend über Nacht bei 4°C langsam gerührt (Solubilisation). Die darauf folgende Zentrifugation bei 100.000 x g, 4°C, 1,5 h trennt das Solubilisat (solubilisierte Membranproteine) von den ungelösten Bestandteilen.

Ni-Affinitätschromatographie von His-getaggten Proteinen

Bei His-getaggten Proteinen wird das Solubilisat (Membranproteine) oder bei löslichen Proteinen das Zytoplasma auf eine mit Puffer B_{mem} bzw. B (s. u.) äquilibrierte Ni-NTA-Agarose-Matrix (Typ Superflow, Quiagen) aufgetragen. Beim Auftrag des *Np*HtrII und seiner Cysteinmutanten wird 15 mM Imidazol zum Solubilisat zugefügt, um unspezifische Bindungen zu vermindern. Die

Säule wird mit 15 Säulenvolumen (SV) Puffer C_{mem} bzw. C gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgt mittels Puffer D_{mem} bzw. D.

Puffer:	A_{mem}	300 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat (NaPi) pH = 8, 2 % DDM
	B_{mem}	300 mM NaCl, 50 mM NaPi pH = 8, 0,05 % DDM
	C_{mem}	300 mM NaCl, 50 mM NaPi pH = 8, 0,05 % DDM + 40 mM Imidazol
	D_{mem}	300 mM NaCl, 50 mM NaPi pH = 8, 0,05 % DDM + 200 mM Imidazol
	A-D	analog zu $A_{mem} – D_{mem}$ nur ohne DDM

Die N-terminal mit His-TEV-getaggten Proteine werden nach der Ni-Säule in 1 x TEV-Puffer (s. u.) über Nacht bei 4°C dialysiert. Im anschließenden TEV-Verdau, der unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt wird, wird der His-Tag vom Protein durch die TEV-Protease (1:50 (w/w) Protease : Protein eingesetzt) abgeschnitten. Die Abtrennung des Tags erfolgt durch eine zweite Ni-NTA-Säule, die mit Puffer B äquilibriert wird. Das zytoplasmatische Protein befindet sich im Durchfluss der Säule. Um das gesamte Protein von der Säule zu eluieren wird zusätzlich mit Puffer B oder TEV-Puffer nachgespült. Die Ni-Säule wird anschließend mit Puffer C (s. o.) gewaschen und die TEV-Protease mit Puffer D eluiert.

TEV-Puffer	50 mM Tris/HCl pH = 8,0; 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA pH = 8,0

Aufreinigung der TEV-Protease

Das Zellpellet der TEV-Protease wird in Puffer 1 (s. u.) resuspendiert und anschließend mit Hilfe des Mikrofluidizers aufgeschlossen. Die Zelltrümmer und die Membranen werden durch eine Zentrifugation bei 45.000 Upm und 4°C für 30 Minuten abgetrennt. Der entstandene Überstand wird auf eine mit Puffer P2 (s. u.) äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen. Die Säule wird mit 10 Säulenvolumen Puffer P3 (s. u.) gewaschen und die TEV-Protease wird mit Puffer P4 (s. u.) eluiert. Anschließend erfolgt noch eine Dialyse des Eluates über Nacht gegen Puffer P5 (s. u.).

Puffer P1:	50 mM NaPi, pH 8 300 mM NaCl 2 mM ß-Mercaptoethanol 1 mM PMSF
Puffer P2:	50 mM NaPi, pH 8 300 mM NaCl 2 mM ß-Mercaptoethanol
Puffer P3:	50 mM NaPi, pH 8 300 mM NaCl 2 mM ß-Mercaptoethanol 30 mM Imidazol
Puffer P4:	50 mM NaPi, pH 8 300 mM NaCl 2 mM ß-Mercaptoethanol 200 mM Imidazol
Puffer P5:	50 mM Tris, pH 7,5 100 mM NaCl 2 mM ß-Mercaptoethanol 1 mM EDTA 10 % Glycerol

Aufreinigung des CheA

Das CheA wird nach der Methode von Hess *et al.* (1991) (Hess *et al*., 1991) aufgereinigt. Das Zellpellet wird in TEDG20-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 2 mM DTE; 20 % (v/v) Glycerin) resuspendiert und im Mikrofluidizer (s. o.) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 28.000 Upm und 4°C für 1 h wird das Zytoplasma von den Zellbestandteilen getrennt. Das CheA wird durch die Zugabe von $(NH_4)_2SO_4$ und Inkubation für 5 Minuten auf Eis gefällt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation pelletiert. Dieses wird anschließend in TEDG20 resuspendiert und über Nacht bei 4°C gegen TEDG20-Puffer dialysiert, um Salze zu entfernen. Die Probe wird nun auf eine Affi-Gel Blue-Säule (100-200 mes, BioRad), äquilibriert mit TEDG (50 mM Tris, pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 2 mM DTE; 10 % (v/v) Glycerin), aufgetragen. Die Säule wird mit 2 – 3 SV gewaschen, bevor das CheA durch einen 0,25 – 1 M NaCl/TEDG Gradienten über 10 SV eluiert wird. Die CheA enthaltenen Fraktionen werden zusammengefasst und erneut durch die Zugabe von $(NH_4)_2SO_4$ gefällt. Das Pellet wird in TEDG resuspendiert und erneut auf eine mit TEDG äquilibrierte FPLC-Säule (Superdex 200, Amersham Bioscience) aufgetragen. Die Fraktionen mit CheA werden zusammen gefügt und gegen TKMD (50 mM Tris pH 7,5; 50 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DTT, 1 % Octylglucosid) Puffer dialysiert. Die CheA-Proben werden mit 10 % Glycerin eingefroren.

Aufreinigung der ungetaggten Chimären

Die ungetaggten Chimären werden analog zu den His-getaggten Proteinen aufgereinigt. Die Proteine befinden sich jedoch nach der Ni-Säule im Durchfluss. Zu diesem Durchfluss wird *Np*SRII-His in einem Mol-Verhältnis von 1:1 zugefügt und für ca. 2 h bei 4°C zur Bildung des Komplexes inkubiert. Anschließend erfolgt eine erneute Ni-Säule bei der der Komplex mit Puffer D_{mem} (s. o.) eluiert wird.

Aufreinigung des Tar-Rezeptors

Die Tar Aufreinigung erfolgt nach dem Protokoll von Borkovich *et al.* (Borkovich *et al*., 1989) und Chen und Koshland (Chen & Koshland, 1995). Alle Aufreinigungsschritte erfolgen bei 4°C. Die Zellen werden in Salz-freien-Puffer (100 mM NaPi, pH 7,0; 10 % Glycerol, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF) von 6 – 12 ml/Liter Kultur resuspendiert und im Mikrofluidizer aufgeschlossen. Anschließend wird eine Zentrifugation von 15 min bei 5000 x g durchgeführt. Diese wird so oft wiederholt bis kein sichtbares Pellet mehr erkennbar ist. Der Überstand wird dann erneut für 25 min im Ti 45 Rotor bei 38.000 Upm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird nun zweimal mit Hoch-Salz-Puffer (20 mM NaPi, pH 7,0; 2 M KCl, 10 % Glycerol, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF) gewaschen und einmal mit End-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,0; 10 % Glycerol, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM 1,10-phenanthroline). Die Membranen werden anschließend in 1 ml/Liter Kultur End-Puffer resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

Zur Isolierung des Tar-Rezeptors aus den *E. coli* Membranen wird das Detergenz Octyl-glycosid (OG) zu 1,4 % (w/v) zu den aufgetauten Membranen zugefügt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die solubilisierten Membranproteine werden durch Ultrazentrifugation bei 95.000 Upm für 10 min (TLA 100.4 Rotor, Beckmann) von den Membranen getrennt. Zum Überstand wird dann Ammoniumsulfat bis zu 20 % (w/v) zugefügt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation bei 5000 Upm und 10 min pelletiert. Dieses wird in 20 ml Zwittergent-Puffer (20 mM Tris-Cl, pH 7,5; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA; 0,1 mM PMSF; 0,4 % Zwittergent 3-12) resuspendiert. Dann werden die Proteine auf eine ω-Aminooctyl-Agarose Säule, die mit dem Zwittergent-Puffer äquilibriert ist, aufgetragen. Die Säule wird mit 3 SV des Zwittergent-Puffers gewaschen. Anschließend erfolgt die Elution der Proteine mit einem linearen Gradienten von 0 – 750 mM NaCl in 20-bed Volumen OG-Puffer (20 mM Tris-Cl, pH 7,5; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA; 0,1 mM PMSF; 1,2 % OG). Eine anschließende SDS-Gel Analyse (s. 2.7.1) identifiziert die einzelnen Fraktionen, die den Tar-Rezeptor enthalten. Diese werden zusammengefasst und mit einem Pufferaustausch gegen OG-Puffer ankonzentriert. Abschließend wird eine 1:2 Verdünnung mit 100 % Glycerin (w/v) durchgeführt und der Rezeptor bei -20°C gelagert.

2.6.3 Kopplung mit Spinproben

Für die Kopplung von Spinproben an eine Cystein-Seitenkette eines Proteins wird das Ni-Eluat (s. 2.6.2) mit 10 mM DTT für mind. 1 h inkubiert. Die Abtrennung des DTT über DEAE-Chromatographie erfolgt direkt vor der beabsichtigten Kopplung mit der Spinprobe. Dazu wird die Probe mit Puffer E_{mem} (s. u.) 1:4 verdünnt und auf eine mit Puffer E_{mem} äquilibrierte DEAE-Säule aufgetragen. Die Säule wird mit 10 – 15 SV Puffer F_{mem} gewaschen und mit Puffer G_{mem} eluiert. Um die reduzierenden Bedingungen beizubehalten wird die Chromatographie unter Argonatmosphäre durchgeführt.
Zur Kopplung wird nun zum DEAE-Eluat aus einer 100 mM Stammlösung der Spinprobe MTSL (in DMSO) 1/100 Volumenäquivalent zugegeben und der Reaktionsansatz über Nacht bei 4°C unter Lichtausschluss leicht geschwenkt. Zur Abtrennung überschüssigen Spinlabels erfolgt erneut eine DEAE-Säule (s. o.). Der Auftrag muss in diesem Fall mit Puffer E_{mem} 1:10 verdünnt werden.

Puffer:	E_{mem}	10 mM Tris pH = 8, 0,05 % DDM
	F_{mem}	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH = 8, 0,1 % DDM
	G_{mem}	500 mM NaCl, 10 mM Tris pH = 8, 0,1 % DDM

2.6.4 Isolierung polarer Lipide aus *H. salinarum*

Zur Isolierung der Lipide aus *H. salinarum* wird eine abgewandelte Version der Methode von Kates *et al.* (Kates *et al*., 1982) angewendet (Wegener, 2000). Statt ganzer Zellen wird nur die Purpurmembran verwendet. Diese (BR-Gehalt = 300 – 350 g) werden in 200 ml NaCl resuspendiert. Anschließend erfolgt eine Zugabe von 500 ml Methanol und 250 ml Chloroform. Diese Lösung wird über Nacht bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Dann wird die Suspension für 15 min bei 3800 x g in Metallröhrchen zentrifugiert und der gelbliche Überstand unter Stickstoffatmosphäre und Lichtausschluss abgenommen. Die Pellets werden erneut, wie oben beschrieben, extrahiert und aufgearbeitet. Alle so gewonnenen Überstände werden über ein Filterpapier (Whatman No.1), das 2 h in Methanol/Chloroform = 1:1 eingeweicht wird, abfiltriert. Nun erfolgt eine Zugabe von 500 ml H_2O und 500 ml Chloroform. Die Kolben werden gut geschüttelt und über Nacht im Dunkeln stehen gelassen, damit sich die beiden Phasen trennen können. Die Chloroformphase wird abgenommen und unter Lichtausschluss am Rotationsverdampfer bis zur Trocknung bei 30°C eingedampft. Der getrocknete Überstand wird in 12 ml Chloroform gelöst und erneut zentrifugiert (30 min, 24.000 x g, 0°C). Der Überstand wird abermals verdampft. Der nun entstandene Rückstand wird in 45 ml Aceton bei 0°C im Ultraschallbad gelöst. Danach erfolgt die Zugabe von 1 ml einer methanolischen Lösung von 10 % $MgCl_2$. Diese Lösung wird zentrifugiert (1000 x g, 0°C). Der Überstand wird nun so lange in 10 ml Aceton extrahiert bis er farblos bleibt. Der im Ölpumpenvakuum getrocknete Rückstand wird gewogen und in einer Konzentration von ca. 40 mg/ml Methanol/Chloroform = 1:1 gelöst. Durch eine feine Kanüle wird diese Suspension unter Argon und Lichtausschluss in eine 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0, die einen 20-fachen Volumenüberschuss an wässriger Lösung besitzt, eingespritzt. Durch eine Ultraschallbad-Behandlung wird diese Lösung homogenisiert und danach lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in der ursprünglichen Menge in Wasser resuspendiert, so dass die entstehende Suspension eine Konzentration von 2 mg/ml polare Lipide enthält. Diese werden bei -80°C gelagert.

2.6.5 Rekonstitution von Proteinen in PM-Lipide

Zur Rekonstitution in PM (Purpurmembran)-Lipide werden Proteinlösungen mit einem DDM-Gehalt von 0,05 % - 0,1 % verwendet. Diese werden beim HtrII und seiner Mutanten als erstes knapp unter die CMC von 0,007 % mit Puffer M (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8) verdünnt. Die PM-Lipide werden in einem Massenverhältnis von 1:1 (bezogen auf den verkürzten Transducer *Np*HtrII-157) bei den Chimären bzw. 2:1 beim *Np*HtrII und seiner Cysteinmutanten

eingesetzt. Nach Zugabe von einer Spatelspitze NaCl wird die Zellsuspension bei 4°C oder RT für 10 Minuten inkubiert. Danach werden Detergenzabsorber-Beads (BioRad) in einem 1/3 - 2/3 Volumenverhältnis zugefügt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C. Proben mit dem Protein *Np*SRII werden unter Lichtausschluss geschwenkt. Nach Abtrennung der BioBeads werden die Membranen bei 15.000 Upm in einer Tischzentrifuge sedimentiert und 4 x gewaschen. Das Pellet wird anschließend in dem gewünschten Puffer aufgenommen.

2.6.6 Phosporylierungs-Assay

Der Phosphorylierungs-Assay erfolgt ähnlich der Methode von Trivedi and Spudich (Trivedi & Spudich, 2003). Die Fusionsproteine im Komplex mit SRII werden in L-α-Posphatidylcholine, (PC) Dimyristoyl (C14:0) ($C_{36}H_{72}NO_8P$) Lipide in einem molaren Verhältnis zu SRII von 150:1 rekonstituiert.

Der Assay wird folgendermaßen durchgeführt: Pro Fusionsprotein werden mind. 6 Versuche (2 x 3 Versuche) durchgeführt. Pro Versuch werden 3 gleiche Ansätze verwendet, die mittels Filtern unterschiedlich belichtet werden. Der erste Ansatz wird in ein braunes Reaktionsgefäß pipettiert und mit Licht der Wellenlänge > 750 nm bestrahlt. Der zweite Ansatz wird mit Licht der Wellenlänge > 650 nm und der letzte Ansatz mit Licht im Wellenlängenbereich von 470 – 585 nm bestrahlt. In allen Ansätzen wird CheA, CheW, FP + SRII, TKMD-Puffer (s. 2.6.2) und ATP* (40.000 cpm/pmol: 0,025 mM) im Verhältnis 1:2:5 (CheA:CheW:FP+SRII) zugefügt.

Die Durchführung sieht folgendermaßen aus: Die Proben werden ohne ATP* für 5 min bei 25°C inkubiert. Dann werden 27 µl entnommen und zu 3 µl ATP* gegeben. Anschließend erfolgt die Belichtung bei den entsprechenden Wellenlänge für 30 sec. Durch Zugabe von 10 µl 4 x LSB (125 mM Tris pH 6,8; 8 % SDS, 40 % Glycerin, 20 % 2-Mercaptoethanol; 0,2 % Bromphenolblau) + 50 mM EDTA wird die Reaktion gestoppt und anschließend auf einem SDS-Gel (s. 2.7.1) analysiert. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Phospho-Imagers FLA-5000 (Fuji Film).

Die Durchführung der positiven Kontrolle (Tar-Rezeptor) erfolgt analog den Ansätzen der Chimären mit folgenden Änderungen. Anstelle des Lichtsignals wird zu einem Ansatz 1 mM Aspartat zugefügt. Es werden pro Versuch nur 2 Ansätze benötigt.

2.7 Analytische Methoden

2.7.1 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese

Die analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) wird nach der Methode von Schägger und Jagow (1987) durchgeführt. Für Proteine der Größe 10 kDa – 100 kDa wird ein 4 % Sammelgel, indem die Proteine konzentriert werden, und ein 12 % Trenngel, indem eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht stattfindet, verwendet. Als Apparatur wird eine Minigelkammer der Firma BioRad (Mini-PROTEAN II Cell) benutzt. Als Größenstandard wird ein LMW Marker (s. 2.1) verwendet. Vor dem Auftragen der Proteinproben werden diese mit einem 2 x SDS-Probenpuffer versetzt. Expressionsproben werden in SDS-Probenpuffer gelöst und mit Ultraschall, um die genomische DNA zu scheren, behandelt. Nach dem Laufen des Gels wird das Gel mit einer Coomassie Färbelösung für 10 – 20 min gefärbt und anschließend wird der Hintergrund mit einer Entfärber-Lösung wieder entfärbt, so dass die Proteinbaden sichtbar werden.

2 x SDS-Probenpuffer:
120 mM Tris/HCl pH 8,0
8,5 % SDS
35 % Glycerin
410 mM Monothioglycerol
0,05 % Bromphenolblau

Coomassie-Färbelösung:
10 % Essigsäure
50 % Ethanol
0,1 % Coomassie R250

Entfärberlösung:
10 % Essigsäure
5 % Ethanol

2.7.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des *Np*HtrII, seiner Mutanten und der zytoplasmatischen Fragmente erfolgt nach der Methode von Ehresmann *et al.* (Ehresmann *et al.*, 1973). Hierbei wird die Absorption bei 228,5 nm und 234,5 nm gemessen. Die Konzentration wird nach folgender empirischer Formel berechnet:

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

Bei bestimmten Puffern ist die Absorptionsmessung nicht möglich, da die Puffer schon in diesem Bereich absorbieren. Zur Proteinbestimmung wird hier der „Bicinchoninic Acid“ (BC) Assay von

Pierce verwendet. Zu 100 µl Proteinlösung wird 2 ml des BC Assay Reagenzes (gemixt mit Puffer A : Puffer B im Verhältnis 50 Teile A + 1 Teil B) zugefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wird auf Grund der hohen optischen Absorption des entstehenden Cu^{+}-Komplexes bei 562 nm gemessen. Die Konzentration kann dann an Hand einer Referenz-Kurve mit BSA in mg/ml abgelesen werden.
Alternativ kann zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Bradford-Tests (Bradford, 1976) verwendet werden.
Die Bestimmung des *Np*SRII erfolgt durch Absorptionsmessung des Retinal-Chromophors bei 498 nm. Der Extinktionskoeffizient beträgt $\varepsilon_{498} = 40000$ cm $*M^{-1}$. Die Konzentration des Proteins kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetztes bestimmt werden.
Die Reinheit des Rezeptors kann durch den Quotienten A_{280} (Absorption der aromatischen Aminosäuren) / A_{498} (Absorption des Chromophors) überprüft werden. Ein Wert von $A_{280} / A_{498} = 1{,}3$ entspricht einer Reinheit > 95 %.

2.7.3 Immunologischer Nachweis nach Western Transfer

Nach Auftrennung der Proteine über eine SDS-Page (s. 2.7.1), werden sie nach dem Semi-dry Verfahren mit dem Puffersystem von Schägger und Jagow (1987) (Schägger & Jagow, 1987) auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert. Die Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgt anschließend durch Inkubation in TBS-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0 (HCl)) mit Blocking solution des BM Chemiluminescene Western Blotting Kits von Boehringer (Mannheim) im Verhältnis 20:1 über Nacht bei 4°C. Als nächstes erfolgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Anti-His, 1:5000 in TBS) für 2 h. Die Membran wird dann 3 x mit TBST-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0 (HCl), 0,1 % Tween) für mind. 10 min gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Anti-Maus IgG-POD-Konjugat, 1:5000 in TBST) wird für 2 h mit der Membran inkubiert. Es folgen weitere drei Waschschritte mit TBST für jeweils mind. 15 min. Die Detektion erfolgt durch Beträufeln des Blots mit 1 ml der Chemiluminescence-Lösung von Boehringer. Nach 1 min wird die Membran mit einem Filterpapier abgetupft. Durch Auflegen eines Röntgenfilms werden die Banden detektiert. Die Expositionsdauer ist abhängig von der jeweiligen Probe. Sie wird so gewählt, dass das intensivste Signal eine vollständige Schwarzfärbung erreicht.

2.7.4 Massenspektrometrie

Matrix assisted laser desorption ionisation (Maldi)

Für die Maldi-Spektrometrie werden die Proben mit der Matrix α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid in Acetonitril (2:1) vermischt und auf eine Maldi-Platte aufgetragen. Dann erfolgt die Messung mit einem Voyager-DE Pro MALDI-Massenspektrometer der Firma Perseptive Biosystems (Weiterstadt).

Elektrospray Ionisation (ESI)

ESI-Spektren werden an einem LCQ Advantage Max (Finnigan) gemessen. Die Proben werden entweder mit TCA oder mit Aceton gefällt.

Bei der TCA-Fällung werden 10 % TCA zur Probe im Volumenverhältis 1:1 zugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. In einem anschließenden Zentrifugationsschritt wird die ausgefallene Probe pelletiert. Es folgt ein Waschschritt mit 70 % EtOH. Das Pellet wird in 50 % Acetonitril in H_2O + 0,1 % TFA aufgenommen und gemessen.

Bei der Aceton-Fällung wird Aceton zur Probe zugefügt und analog zur TCA-Fällung weiterbehandelt.

2.7.5 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration erfolgt an einem Waters HPLC Gerät. Als Säule wird eine Superdex 200 10/300 GL Säule verwendet. Die Flussrate des ITC-Puffers (150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 0,05 % DM) beträgt 0,5 ml/min. Eine Detektion der Proteine erfolgt bei 280 nm und bei 500 nm (für SRII Proben).

Als Größenstandard werden die LMW und HMW von Amersham benutzt:

LMW: Ribonuklease A (13,7 kDa, SR: 1,6), Chymotrypsinogen A (25,0 kDa, SR: 2,1), Ovalbumin (43,0 kDa, SR: 3,1), Albumin (67,0 kDa, SR: 3,6).

HMW: Aldolase (158 kDa, SR: 4,8), Catalase (232 kDa, SR: 5,2), Ferritin (440 kDa, SR: 6,1), Thyroglobulin (669 kDa, SR: 8,5).

2.8 Biophysikalische Methoden

2.8.1 CD-Spektroskopie

Die Circular-Dichroismus-Messungen werden mit einem J-715 Spectropolarimeter von Jasco (Tokio, Japan) ausgeführt. Die Proteinproben befinden sich in einer 0,1 mm Küvette. Die Temperatur während der Messung wird mittels eines Thermostaten konstant gehalten.
Die Proben sind entweder in folgendem Puffer: 25 mM NaPi, 0,05 % DDM oder in Puffer der 25 mM NaPi, 1 M NaF, 0,05 % DDM enthält. Die Puffer werden als Basislinie gescannt, welche dann vom Protein-Spektrum subtrahiert werden. Die Daten werden in einem Bereich von 260 nm bis 190 nm mit einer Schrittweite von 1 nm gescannt (100 nm/min). Nach Qualität des Signals werden 10 - 20 Spektren aufaddiert.
Die Ergebnisse werden von der gemessenen Absorption in molare Elliptizität ($[\Theta]mrw/10^3 deg*cm^3/dmol$) konvertiert. Beides wird mit Hilfe des Programms „Spectra Manager“ Version 1.53 (Jasco) durchgeführt. Die Sekundärstruktur Voraussagen erfolgen mittels den Algorithmen CCA (Toniolo & Bonora, 1975), ContinII und CDSSTR aus dem Programm Packet CDPro (Sreerama & Woody, 2000) mit einer Referenz von 56 Proteinen, die 13 Membranproteine einschließt (SMP56, Referenz kann auf der CDPro Webseite gefunden werden: http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html).

2.8.2 Laserblitz-Absorptions-Spektrometrie

Für die transienten Absorptionsänderungen wird eine rechnergesteuerte Messvorrichtung nach Chizhov *et al.* (Chizhov *et al.*, 1996) verwendet.
Bei der Messung handelt es sich um eine zeitaufgelöste Absorptionsmessung. Die gespeicherten Absorptionsdaten umspannen einen Zeitraum des Photozyklus von 100 ns nach der Probenanregung bis zur Rückbildung des Grundzustandes. Die Messdaten werden auf eine logarithmische Zeitskala (250 Datenpunkte) nach der Methode von Müller und Plesser (Müller & Plesser, 1991) reduziert. Anhand des Fehlers des Grundsignals wird die Standardabweichung abgeschätzt. Eine Auswertung der Daten erfolgt durch das Programm MEXFIT (Müller & Plesser, 1991).

2.8.3 ESR-Spektroskopie

Theoretischer Hintergrund

Die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) beruht auf der resonanten Absorption von Mikrowellenstrahlung (hier: λ = 3 cm) durch paramagnetische Substanzen. So genannte Spinlabel (Spin-Sonden) werden dabei als paramagnetische Substanzen benutzt. Es handelt sich bei diesen Labeln um stabile organische Radikale, die kovalent an das zu untersuchende Molekül gebunden sind.

Bringt man eine Probe mit nicht gepaarten Elektronenspins (verfügen über ein permantes magnetisches Moment) in ein Magnetfeld, so kommt es zu einer Aufspaltung der entarteten Energiezustände, was als Zeeman-Effekt bezeichnet wird. Durch die Bestrahlung mit elektromagnetischer Strahlung (Mikrowellenstrahlung), deren Energie der Aufspaltung der Zeeman-Niveaus entspricht, kommt es zur Absorption. Nach der Absorption wird die ursprüngliche Besetzungsverteilung der Energieniveaus durch Relaxation wieder hergestellt.

Die Wechselwirkung der Elektronen mit den magnetischen Momenten mit benachbarten Atomkernen erzeugt auch eine Aufspaltung der Resonanzlinie, was als Hyperfeinwechselwirkung bezeichnet wird.

Als Beispiel zeigt die Abbildung 2.8.1 die Hyperfeinaufspaltung der Zeeman-Niveaus des Stickstoffes (auch in dem hier verwendeten Spin-Label vorhanden) durch Wechselwirkung mit dem Kernspin.

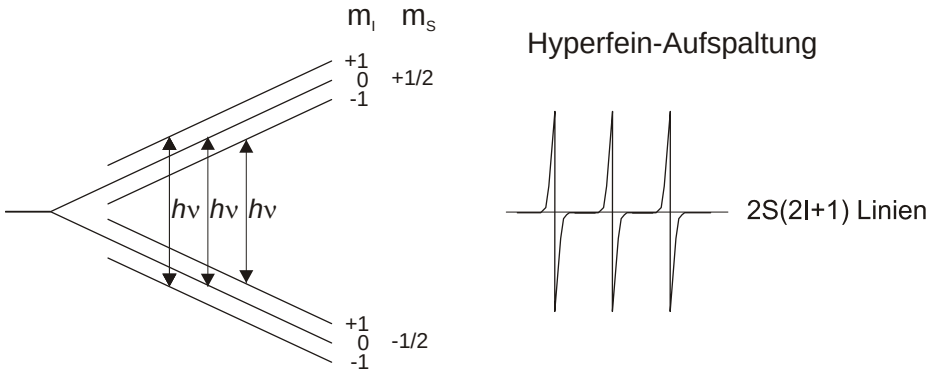


Abb. 2.8.1: Hyperfeinaufspaltung der Zeeman-Niveaus durch Wechselwirkung mit dem Kernspin am Beispiel des Stickstoffes (^{14}N) mit I = 1. Das resultierende Linienspektrum des freien Spin-Labels zeigt die drei Hyperfeinlinien gemäß (2I + 1) = 3.

Es werden die drei Energiezustände der Elektronenspins gezeigt, welche den drei beobachtbaren Linien im ESR-Spektrum entsprechen.

Spin-Sonden

Wie bereits erwähnt dienen als Spin-Sonden stabile organische Radikale. Das in dieser Arbeit verwendete Molekül ist das MTS-Spin-Label ((1-Oxyl-2,2,5,5-tetrametylpyrrolin-3-methyl-metan-thiosulfonat). Dieses wird über eine kovalente Bindung in Form einer Disulfid-Brücke an eine Cystein-Seitenkette des Proteins gebunden, ein Prozess der als „site directed spin labeling“ (SDSL) (Hubbell & Altenbach, 1994) bezeichnet wird. Das Cystein wird, falls nicht vorhanden, durch ortsspezifische Mutagenese in das Protein eingeführt. In der Abbildung 2.8.2 ist das Verfahren der SDSL schematisch dargestellt:

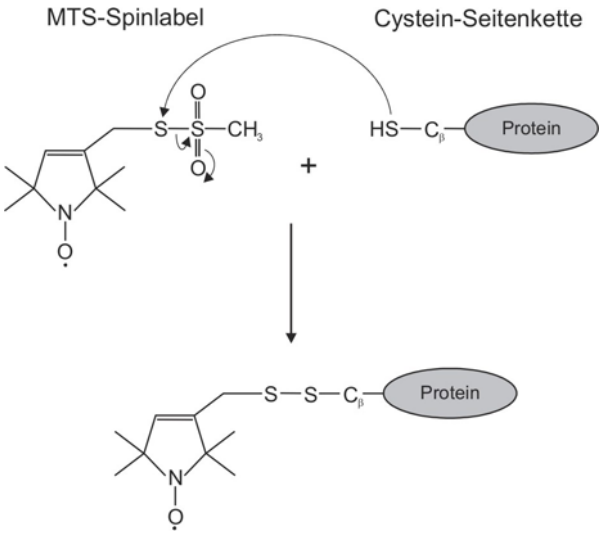


Abb. 2.8.2: Schematische Darstellung der Kopplungsreaktion des MTS-Labels an die Cysteinseitenkette des Proteins.

Messaufbau

Zur Messung der ESR-Spektren werden selbstgebaute (Prof. Dr. H.-J. Steinoff, Universität Osnabrück) X-Band-Spektrometer sowie das Gerät MiniScope 200 der Firma MagneTech (Berlin) benutzt. Die Messungen erfolgen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-J. Steinhoff.

Messmöglichkeiten des ESR

Mit der ESR-Spektroskopie können verschiedene Bereiche eines Proteins untersucht werden. In Abbildung 2.8.3 sind die einzelnen Methoden graphisch dargestellt.

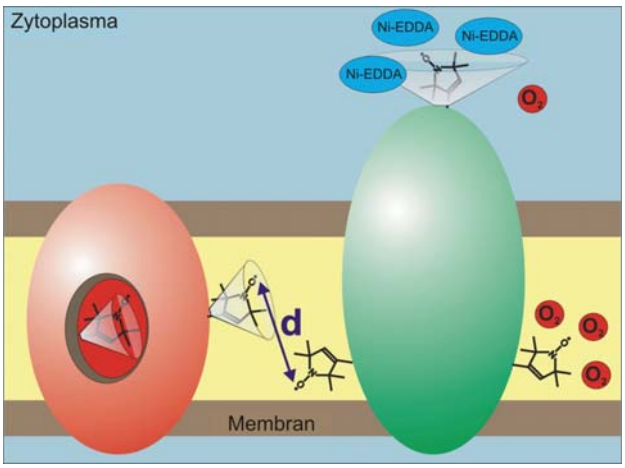


Abb. 2.8.3: Schematische Darstellung der Messmöglichkeiten der ESR-Spektroskopie.

Die erste Möglichkeit der ESR-Spektroskopie ist die Messung der Spin-Label Mobilität (angedeutet durch die Kegel). Der Spin-Label ist mobiler, wenn er im Zytoplasma lokalisiert ist, als im Inneren eines Proteins oder in der Lipid-Doppelschicht. Ein weiterer Parameter, der bestimmt werden kann, ist die Zugänglichkeit des Labels gegenüber frei diffundierenden paramagnetischen Molekülen („Quencher"), in diesem Fall Sauerstoff und Ni-EDDA (Nickel-Ethylendiamindiessigsäure). Molekularer Sauerstoff zeigt hohe Löslichkeit und Diffusionsfähigkeit in Lipid-Doppelschichten, während Ni-EDDA fast nur in wässrigem Medium zu finden ist. Im Protein-Inneren sind beide Moleküle kaum vertreten. Durch Bestimmung der Kollisionsfrequenz des Spinlabels mit diesen Molekülen kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob sich die Nitroxid-Seitenkette im Protein-Inneren, in der wässrigen Phase oder in der Lipid-Membran befindet. Weitere Messungen ermöglichen die Bestimmung von Interspin-Abständen im Bereich von etwa 8 Å bis 20 Å mit einer Genauigkeit von 1 – 2 Å. Als letzter Punkt können transiente strukturelle Veränderungen gemessen werden, wenn eines dieser oben genannten Parameter über die Zeit beobachtet wird. In dieser Arbeit werden die Veränderungen durch Licht induziert und das entstehende M-Intermediat des Rezeptors während der Messung eingefangen.

2.8.4 Isotherme Titrations Kalorimetrie

Die Isotherme Titrations Kalorimetrie (ITC) wird mit Hilfe eines VP-ITC MicroCalorimeter (MicroCal, USA) durchgeführt. Mittels ITC Messungen kann die Thermodynamik einer Bindungsreaktion untersucht werden. Enthalpie (ΔH) und Entropie (ΔS) sowie die Bindungsstärke und Stöchiometrie einer Reaktion können direkt bestimmt werden.

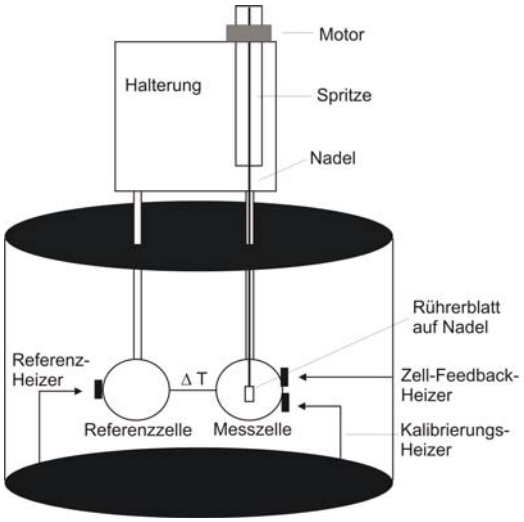


Abb. 2.8.4: Schematischer Aufbau des ITC-Gerätes.

Die Abbildung 2.8.4 zeigt den schematischen Aufbau des ITC Gerätes. Zwei identische Kammern, die Messzelle und die Referenzzelle, sind in einem adiabatischen Mantel eingehüllt, um sie vor Wärmeaustausch zu schützen. Eine geringe, kontinuierliche Energiemenge wird ständig durch den Referenz-Heizer zugeführt. Ein thermosensitiver Stromkreis misst jede Temperaturänderung zwischen der Referenzzelle und der Messzelle. Je nach Reaktion (exotherm oder endotherm) wird der Zell-Feedback-Heizer seine Energie steigern oder herabsetzen, um die Temperatur in der Messzelle mit der Referenz Zelle konstant zu halten. Der Energieverbrauch ist die messbare Größe in einem ITC-Experiment und ist somit eine direkte Messung der Wärme, die an der Bindung der beiden Proteine beteiligt ist.
Die Protein-Proben werden vor der ITC-Messung in ITC-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 0,05 % DDM) oder in ITC_{4M}-Puffer (4 M NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 0,05 % DDM) dialysiert und anschließend gegebenenfalls ankonzentriert. Das *Np*SRII-His, welches sich in der Spritze befindet, hat eine 6 – 10 fach höhere Konzentration im Gegensatz zum *Np*HtrII-His (in der Messzelle). 250 µl *Np*SRII werden dann zu 1,4 ml *Np*HtrII in 5 – 20 µl Schritten (Intervallzeit: 4 Minuten) titriert. Die Titrationen erfolgen bei 45°C. In Kontroll-Experimenten wird Puffer gegen *Np*HtrII titriert und *Np*SRII wird in Puffer titriert. Die Daten werden anschließend mit dem Programm Origin-ITC ausgewertet.

2.8.5 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR)

Die Fourier-Transform-Infarotspektroskopie Messungen werden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von F. Siebert (Universität Freiburg) durchgeführt.

2.8.6 Mikroskopische Untersuchungen zur Phototaxis

Als Vorbereitung zu den Phototaxis-Messungen werden die Zellen nach Anzucht auf eine OD_{578} von 0,3 - 0,5 und anschließender Induktion mit 1 M IPTG und 10 µM Retinal nach unterschiedlichen Zeiten geerntet und in Motilitätsmedium (10 mM KPi pH 7,0, 0,1 mM EDTA, 0,067 M NaCl, 1 µM Methionin, 0,01 M Laktat pH 7,0) aufgenommen. Dann wird ein ca. 2 – 4 µl großer Zelltropfen auf ein mit EtOH gereinigtem Objektträger in die Mitte von zwei Deckgläschen gebracht. Ein weiteres Deckgläschen, welches auf die unteren beiden als eine Art Brücke aufgelegt wird, dient zur Abdeckung der Zellen.
Die mikroskopischen Untersuchungen zur Phototaxis werden in der von Stoeckenius *et al.* (Stoeckenius *et al.*, 1988) beschriebenen Apparatur durchgeführt.

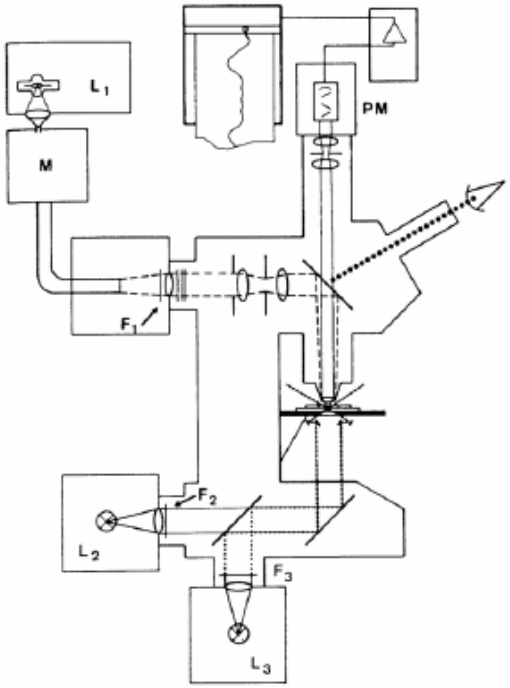


Abb. 2.8.5: Schema der Phototaxis-Apparatur nach Stoeckenius *et al.* (1988)
L1: photochemisch wirksame Lichtquelle (150W XBO-Lampe); L2: gemessene Lichtquelle; L3: Hintergrundlicht; M: Monochromator; F1: UV-Filter; F2: Infrarot-Filter; F3: Interferenzfilter für Hintergrundlicht; PM: Photomultiplier.

Als Lichtquelle für die in der Abbildung 2.8.5 beschriebenen Apparatur dient eine 150 Watt XBO-Lampe, der ein Monochromator nachgeschaltet ist. Die Lichtstrahlen werden durch diesen in das Innere des Mikroskops geleitet und dienen dort als Standardlichtquelle. Die XBO-Lichtquelle (L1) kann das zu beobachtende Präparat durch Einstellung der Blende in einem 170 µm breitem Feld in der Mitte mit phototaktisch wirksamen Licht ausleuchten. Gleichzeitig kann der Spot durch die Lichtquelle L2 von unten durch den Dunkelfeldkondensator bestrahlt werden. Um nur Licht bestimmter Wellenlänge durchzulassen, die die Messung nicht stören, wird

ein Schott RG 750 Filter auf die Lichtquelle L2 platziert, der nur Licht der Wellenlänge > 750 nm passieren lässt.
In diesem kleinen Spot wird die Zelldichte durch Dunkelfeldmikroskopie gemessen. Ein Spezialkondensor sorgt in diesem Fall dafür, dass direkt auf das Objektiv fallende Licht ausgefiltert wird und nur Streulicht auf den als Detektor angeschlossenen Photomultiplier fällt. Dieser verstärkt das Lichtsignal und wandelt es in die der Zelldichte proportionalen Messspannung um, welche direkt von einem Schreiber aufgezeichnet wird. Gleichzeitig werden die Daten auf einem PC in einer institutseigenen Software Lab32 gespeichert. Die Daten können später mit dem Programm Origin 7G ausgewertet werden.
Die Messungen werden, falls nicht gesondert vermerkt, folgendermaßen durchgeführt: Als Erstes wird eine 5 minütige Basislinie, bei der die Zellen mit Licht > 750 nm bestrahlt werden, gemessen. Danach werden sie 5 Minuten dem phototaktischen Licht, d.h. blau-grünem Licht der Wellenlänge 498 nm, ausgesetzt. Anschließend erfolgen weitere 5 Minuten bei Licht der Wellenlänge > 750 nm.
Als positive Kontrolle dienen *Natronomonas pharaonis* Kulturen, da sie zur Phototaxis fähig sind. Als negative Kontrolle werden Zellen des *E.coli* RP437wt Stammes und des UU1250 Stammes verwendet. Beide *E. coli* Stämme sollten keine Reaktion auf das Licht zeigen, da sie die Fähigkeit zur Phototaxis nicht besitzen.

2.9 Sonstige Methoden

2.9.1 Sequenzanalyse und Erstellung von Plasmidkarten

Sequenzanalysen werden mit Hilfe des Chromas-Programms (Technelysium Pty Ltd (Tewantin, Qld, AU)) durchgeführt und dann per Hand ausgewertet.
Die Erstellung von Plasmidkarten erfolgt mit dem Programm Clone Manager 6.0 (Science and Educational Software (Cary, USA)).

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Präparation der Proteine

Im Folgenden werden zunächst alle Klonierungsstrategien und die anschließenden Aufreinigungsprotokolle der in dieser Arbeit verwendeten Proteine beschrieben.

3.1.1 Expression und Aufreinigung des *Np*HtrII

Es wird ein Expressions- und Aufreinigungsprotokoll entwickelt, mit dem das HtrII aus *Natronomonas pharaonis* heterolog in *E. coli* Zellen exprimiert und mit hoher Reinheit für weitere Versuche erhalten werden kann.
Für die Expression des *Np*HtrII wird das von Studier und Moffat (Studier & Moffat, 1986) entwickelte pET-System verwendet. In diesem System wird die Gen-Transkription durch einen zweistufigen Mechanismus reguliert. Das Gen für den Transducer steht unter der Kontrolle der Promotorregion des Bakteriophagen T7 in dem Expressionsvektor pET27bmod (Abb. 3.1.1). Außerdem besitzt der Vektor die üblichen Elemente wie einen *ori*, den Replikationsursprung, eine Ribosomenbindestelle und das Gen für eine Kanamycin-Resistenz.

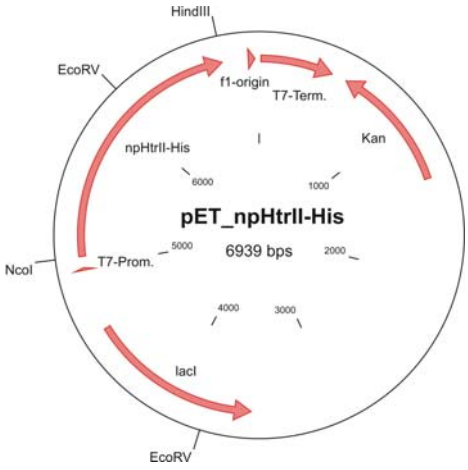


Abb. 3.1.1: Plasmidkarte des pET27bmod_npHtrII-His.

Der T7-Promotor des Vektors wird nur von der T7-RNA-Polymerase erkannt und nicht von den *E. coli* eigenen Polymerasen, wodurch ein kontrollierbares System entsteht. Die T7-RNA-Polymerase wird durch den verwendeten *E. coli* Expressionsstamm mitgebracht und durch Basalexpression exprimiert. Um eine Transkription des Zielgens zu verhindern, wird der T7-

Promotor der Polymerase durch einen *lac* Repressor blockiert. Eine Induktion mit Isopropylthiogalactosid (IPTG) führt zum Ablösen des Repressors und zur Expression der Polymerase und damit des Zielgens.

Als Expressionsstamm wird der *E. coli* Rosetta (DE3) verwendet. Dieser trägt auf einem Plasmid Gene, die für in *E. coli* seltene Transfer-RNAs (tRNAs) codieren (AGA, AGG, AUA, CUA, CCC, GGA).

Das *Np*HtrII-His-Gen wurde von R. Seidel (Seidel *et al*., 1995) durch PCR amplifiziert und mit Hilfe der eingeführten Restriktionsschnittstellen, am 5'-Ende eine *Nco*I-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Hind*III-Schnittstelle, in den pET-Vektor ligiert. Zudem wurde ein aus 7 Histidin-Resten bestehender Tag am C-Terminus des Proteins eingeführt.

Die Expression des *Np*HtrII erfolgt wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben. Zur Expressionskontrolle werden sowohl vor der Induktion, als auch nach der Induktion mit IPTG bis zur Ernte 1 ml Zellkultur-Proben entnommen, die nach Pelletation in 2 x SDS-Probenpuffer (s. 2.7.1) lysiert werden. Eine Analyse der Proben auf einem SDS-Gel (s. 2.7.1) zeigt keine überexprimierte Protein-Bande. Das *Np*HtrII liegt demnach nur in geringen Konzentrationen in der Zelle vor.

Nach der Expression erfolgt eine Aufarbeitung des Zellpellets nach Kapitel 2.6.2. Diese Arbeitsschritte werden auf einem SDS-Gel analysiert (s. Abb. 3.1.1). Die Spur 1 des SDS-Gels A zeigt die Zytoplasma-Fraktion der Aufreinigung, die alle löslichen Bestandteile des Zelllysates beinhaltet. Spur 2 enthält die ungelösten Bestandteile nach Solubilisation der Membranproteine. Das Solubilisat mit den gelösten Membranproteinen, einschließlich des *Np*HtrII, wird in der Spur 3 gezeigt.

Anschließend kann das Protein mittels Nickel-Ionen-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Crowe *et al*., 1994). Jedoch kommt es nicht zu einer kompletten Abtrennung des gewünschten Proteins von den restlichen Proteinen des Zelllysates, da diese wahrscheinlich interne Histidine besitzen, die ebenfalls an die Ni-Matrix binden. Um diese Fremdproteine zu entfernen wird der Bindungkompetitor Imidazol eingesetzt. Durch geringe Konzentrationen an Imidazol von 20 – 30 mM können diese verdrängt werden. Das *Np*HtrII wird anschließend durch eine Imidazolkonzentration von 200 mM von der Säule eluiert. Die einzelnen Proben werden auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 3.1.2).

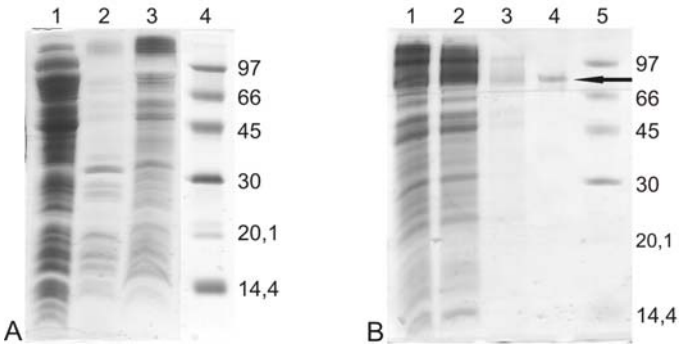


Abb. 3.1.2: SDS-PAGE der Aufarbeitung und anschließender Aufreinigung des *Np*HtrII-His aus *E. coli* Rosetta (DE3). A: 1: Zytoplasma, 2: ungelöste Bestandteile, 3: Solubilisat. B: 1: Solubilisat, 2: Ni-Durchfluss, 3: Ni-Waschen, 4: Ni-Eluat, 5: LMW-Standard; der Pfeil markiert die Bande des aufgereinigten *Np*HtrII.

Das Solubilisat wird erneut auf das Gel B auftragen (Spur 1). Die anschließenden Spuren 2 - 4 (Gel B) veranschaulichen die einzelnen Aufreinigungsschritte der Affinitätschromatographie mit dem Durchfluss (Spur 2), der Wasch-Fraktion (Spur 3) und dem Eluat (Spur 4), welches das aufgereinigte *Np*HtrII beinhaltet. Hier ist neben der *Np*HtrII-Bande noch eine zweite Bande erkennbar, wobei es sich vermutlich um eine Verunreinigung handelt. Der Transducer wird durch eine Abschätzung vom Gel mit einer Reinheit von über 90 % erhalten. Zu beobachten ist allerdings, dass das *Np*HtrII, durch Western Blot nachgewiesen (s. u.), mit einer Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 80 kDa (Pfeil) erscheint. Dieser Wert stimmt nicht mit der berechneten molaren Masse von 57,91 kDa überein. Bereits für andere halobakterielle Transducer-Proteine ist dieses Verhalten beobachtet worden (Alam & Hazelbauer, 1991). Auch Wegener (Wegener, 2000) und Hippler-Mreyen (Hippler-Mreyen, 2003b) stellten diese Besonderheit bei verkürzten Transducer-Fragmenten fest. Der Grund könnte vielleicht in der großen Zahl saurer Aminosäuren (*Np*HtrII: pI = 4,3) liegen, durch die eine homogene Bindung des negativ geladenen SDS durch elektrostatische Abstoßung behindert wird.
Der Western Blot (s. 2.7.3) mit einem anti-Histidin-Antikörper ist in der Abbildung 3.1.3 dargestellt.

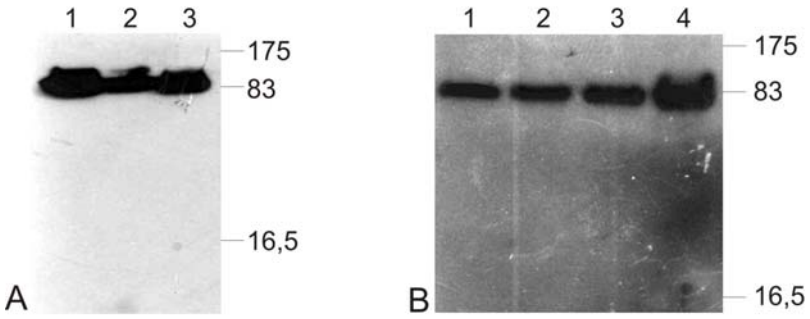


Abb. 3.1.3: Western Blots der beiden SDS-Gele (Abb. 3.1.2) mit einem Anti-His-Antikörper. A: 1: Zytoplasma, 2: Pellet, 3: Solubilisat. B: 1: Solubilisat, 2: Ni-Durchfluss, 3: Ni-Waschen, 4: Ni-Eluat. Jeweils rechts neben dem Blot ist ein Teil des Prestained Protein Markers aufgetragen.

Die beiden Western Blots zeigen in den Spuren die analogen Proben zu den beiden SDS-Gelen (s. Abb. 3.1.2). Es ist zu erkennen, dass alle Fraktionen das *Np*HtrII enthalten. Das positive Signal im Zytoplasma kommt dadurch zustande, dass nicht alle Kopien in die Membran eingebaut werden. Das Pellet enthält noch Protein auf Grund unzureichender Solubilisation. Das Vorkommen des Transducers im Durchfluss, als auch in der Wasch-Fraktion der Ni-NTA Aufreinigung könnte in der Konformation des *Np*HtrII begründet liegen. Der His-Tag am C-Terminus könnte nicht ausreichend zugänglich sein, so dass die volle Bindungsaffinität nicht ausgeschöpft werden kann. Zusätzlich wird dem Auftrag schon eine Imidazolkonzentration von 15 mM zugefügt, wodurch es zu einer geringen Besetzung der Ni-Ionen mit Imidazol kommt und so die Bindungsstellen für den Transducer teilweise schon besetzt sind.
Die Ausbeute des *Np*HtrII, mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie berechnet (s. 2.7.2), beträgt 0,6 – 0,9 mg pro 1 L Zellkultur.
Auf Grund des Vorkommens erheblicher Mengen nicht degradierten Proteins im Zytoplasma, wird das *Np*HtrII aus dieser Fraktion aufgereinigt. Dadurch könnte die Ausbeute erhöht und eventuell Arbeitsschritte eingespart werden. Die Aufreinigung erfolgt analog zur Aufreinigung des Solubilisats mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Das Ni-Eluat wird auf einem SDS-Gel analysiert (s. Abb. 3.1.4). Es kann ebenfalls relativ reines Transducer Protein isoliert werden. Jedoch ist auch hier eine zweite Bande unterhalb des *Np*HtrII sichtbar, bei der es sich wahrscheinlich um die gleiche Verunreinigungsbande wie bei dem aus der Membran aufgereinigtem *Np*HtrII handelt, da der entsprechende Western Blot nur eine Bande aufweist.

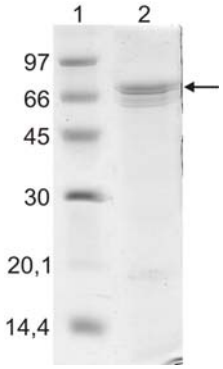


Abb. 3.1.4: SDS-Gel der Ni-Eluat Probe der Zytoplasma Aufreinigung (Spur 2).
Spur 1: LMW-Standard. Der Pfeil markiert das aufgereinigte Protein.

3.1.2 Aminosäureanalyse des *Np*HtrII

Zur weiteren Identifikation und zur weiteren Bestimmung der Konzentration des Transducers wird eine Aminosäureanalyse durchgeführt. Für diese wird das aus dem Zytoplasma aufgereinigte *Np*HtrII im Verhältnis 1:20 in 20 mM Ammoniumacetat pH 6,5 verdünnt und anschließend

lyophilisiert. Die Analyse wird von der Firma ARS (Universität Bern, Schweiz) durchgeführt. Das Ergebnis ist in der Tabelle 3.1.1 dargestellt.

Auswertung der Analyse				
Name	Menge der Injektion (pmol)	AS Soll-Wert	Mol AS pro Mol Protein	Abweichung
Asp/Asn	738,4	69	58,4	-10,6
Glu/Gln	1083	97	85,7	-11,3
Ser	393,9	36	31,2	-4,8
Gly	583	30	46,1	16,1
His	138,1	8	10,9	2,9
Arg	381,9	27	30,2	3,2
Thr	495,8	46	39,2	-6,8
Ala	977,5	90	77,3	-12,7
Pro	0	2	0	-2
Tyr	91,1	3	7,2	4,2
Val	506,2	39	40,1	1,1
Met	177	15	14	-1
C-C	24,3	1	1,9	0,9
Ile	356,4	27	28,2	1,2
Leu	498,4	35	39,4	4,4
Phe	181,6	10	14,4	4,4
Lys	248,6	9	19,7	10,7
Total	6875,2	544	544	5,8

Eingesprizte Proteinmenge:	12,64	pmol
Hydrolysierte Proteinmenge:	31,60	pmol
Theoretische Proteinmenge 100%:	1735,65	pmol
Masse für Auswertung:	57615,37	Da
Gehalt:	**1,82**	**%**

Tabelle 3.1.1: Ergebnis der Aminosäureanalyse von *Np*HtrII aus dem Zytoplasma. (C-C = Disulfid-Brücken-Bindungen)

Die experimentell bestimmten Stoffmengen der jeweiligen Aminosäuren (Spalte 1, C-C entspricht einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen) sind in Spalte 2 angegeben. Dazu wurden die erhaltenen Daten (Flächenintegrale des HPLC-Chromatogramms) mit einem entsprechenden Standard verglichen. Die Summe ergibt eine Gesamtstoffmenge von 6875,2 pmol Aminosäuren. Aus diesem Wert wird die eingespritze Stoffmenge an Protein mittels Division durch die Aminosäureanzahl des *Np*HtrII (Spalte 3, Summe) berechnet. Im nächsten Schritt wird die Anzahl der jeweiligen Aminosäuren im Protein bestimmt, indem jeweils die experimentellen Werte (Spalte 2) durch die eingesetzte Proteinmenge dividiert werden. In der letzten Spalte wird die Abweichung der zuvor berechneten Anzahl an Aminosäuren pro Mol Protein von dem Soll-Wert laut Aminosäure-Sequenz (Spalte 3) beschrieben. Der Wert 5,8 entspricht der durchschnittlichen Abweichung. Diese geringe durchschnittliche Abweichung lässt auf eine

entsprechend hohe Reinheit des aufgereinigten Proteins schließen, und bestätigt zudem dessen Identifizierung. Zusätzlich wird die experimentell bestimmte hydrolysierte Proteinmenge angegeben, bei der es sich um das 2,5 fache der eingespritzen Menge handelt. In Bezug auf die Angaben der Konzentration der Probe sollten sich 1735,65 pmol in der hydrolysierten Probe befinden. Daraus ergibt sich, dass die Konzentrationsangabe nicht korrekt war und sich tatsächlich lediglich 1,82 %, bezogen auf die ursprüngliche Konzentrationsangabe, des Proteins in der Probe befinden. Aus dem prozentuallen Gehalt wird eine Konzentration der Probe von ca. 0,3 - 0,4 mg/ml bestimmt, was annähernd dem Wert aus der Konzentrationsbestimmung nach der UV-VIS-Methode entspricht.

3.1.3 Klonierung zytoplasmatischer *Np*HtrII-Fragmente

Für Kristallisations-Versuche zur Aufklärung der Struktur der Linker-Region sollen drei verschiedene zytoplasmatische *Np*HtrII-Konstrukte hergestellt werden. Die Auswahl der Fragmente beruht vor allem auf Resultaten der ESR-Spektroskopie (Wegener *et al.*, 2001), als auch auf Sekundärstrukturvorhersagen. Folgende Konstrukte des *Np*HtrII werden ausgewählt: **1**. *Np*HtrII_L82C-534, **2**. *Np*HtrII_K96C-534 und **3**. *Np*HtrII_130-534.

Die beiden Fragmente **1** und **2** enthalten jeweils ein N-terminales Cystein, das durch „Crosslinking“ im jeweiligen Transducer-Dimer über eine S-S Brücke fixiert werden kann, so dass die laut Sekundärstrukturvorhersagen existierende coiled-coil Struktur erhalten bleibt (s. Abb. 3.2.1). Es werden genau die Positionen 82 (Konstrukt **1**) und 96 (Konstrukt **2**) ausgewählt, da diese Positionen jeweils im Dimer nach Angaben der ESR-Daten (Wegener *et al*., 2001) bzw. dem ESR-Modell von Bordignon *et al. (*Bordignon *et al.*, 2005a) aufeinander zu orientiert sind, d.h. sie liegen relativ nah beieinander.

Das Fragment **1** *Np*HtrII_L82C-534 beinhaltet somit den kompletten zytoplasmatischen Bereich, inklusive beider HAMP-Domänen, des Transducers beginnend an der Position 82, die zu einem Cystein mutiert wird, bis zum C-Terminus (AS 534). Das Fragment **2** *Np*HtrII_K96C-534 beginnt mitten in der amphipatischen Helix 1 der ersten HAMP-Domäne an der Position 96 mit einem mutierten Cystein.

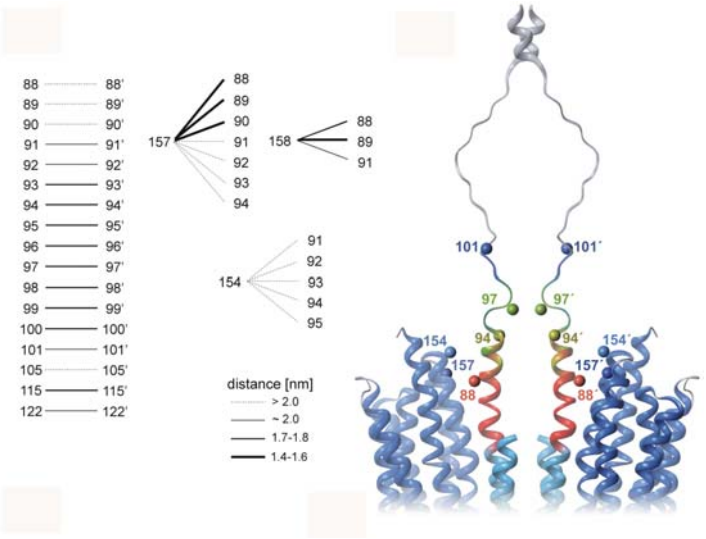


Abb. 3.1.5: Modell der benachbarten Region des *Np*HtrII-157 im Komplex mit dem *Np*SRII in PML rekonstituiert basierend auf ESR Daten (Bordignon *et al*., 2005b).

Das dritte zytoplasmatische Fragment **3** *Np*HtrII_130-534 beginnt an der Aminosäure 130. Die Position wurde ausgesucht, da sie die vorletzte Aminosäure der ersten HAMP-Domäne darstellt. Durch das Entfernen der wahrscheinlich relativ flexibeln und damit eventuell unstrukturierten 1. HAMP-Domäne, könnte die Möglichkeit eine Kristallstruktur zu erhalten erhöht werden. Auf eine Mutation der Aminosäure an Position 130 zu Cystein wurde verzichtet, da keine genauen Strukturdaten über diese Region bekannt sind, und so durch ein „Crosslinking" der Transducer durch die Kopplung der beiden Cysteine eventuell in unnatürliche Konformation gezwungen werden könnte. Die 2. HAMP-Domäne wird nicht entfernt, da über diesen Breich ebenfalls keine Strukturdaten existieren.
Zur Veranschaulichung der Anfangsaminosäuren der Fragmente ist die erste HAMP-Domäne des Transudcers in der Abbildung 3.1.6 dargestellt.

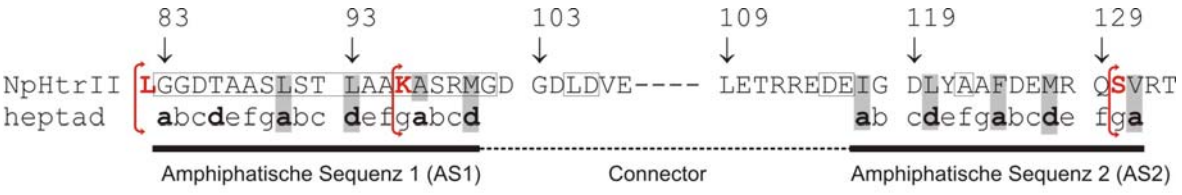


Abb. 3.1.6: Erste HAMP-Domäne des *Np*HtrII mit Markierung der Anfangsaminosäuren (rot) und der Schnittstellen (Pfeil) der zytoplasmatischen Fragmente.

Die drei *Np*HtrII-Fragmente werden als ein N-terminales His_TEV-Kostrukt kloniert. Das bedeutet, dass an das Protein N-terminal eine TEV-Schnittstelle mit einem anschließenden His-Tag, der durch einen kurzen Linker mit der TEV-Erkennunssequenz verbunden ist, angefügt wird. Der Vorteil dieser Klonierungs-Strategie besteht darin, dass das Protein durch den His-Tag mittels einfacher Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann. Anschließend erfolgt eine

Abspaltung des Tags mit Hilfe der TEV-Protease, die direkt hinter ihrer Erkennungssequenz schneidet. Durch den Schnitt bleibt die natürliche Sequenz des gewünschten Konstruktes erhalten (Abb. 3.1.7).

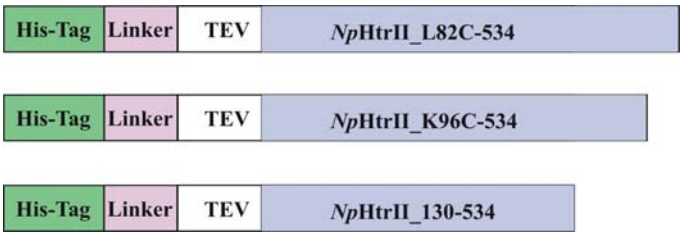


Abb. 3.1.7: Schematische Darstellung der drei zytoplasmatischen Fragmente des *Np*HtrII.

Die jeweils codierende DNA wird mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, s. 2.5.9) aus dem Vektor pTrc_HtrIIwt_His amplifiziert. Während der PCR werden durch die Oligonukleotide N-terminal die Restriktionsschnittstelle *Sap*I und C-terminal *Bam*HI eingeführt. Nach Restriktion der PCR-Produkte erfolgt eine Ligation in den Vektor pTXB3_N_His_TEV mut *Nco*I, welcher folgendermaßen hergestellt wird. Der Ausgangsvektor pTXB3_Int-N wird *Nco*I und *Sap*I geschnitten, und das entstandene 6234 bp Fragment wird mit vier zuvor hybridisierten Oligonukleotiden ligiert. Diese enthalten die *Nco*I-Schnittstelle, den His-Tag mit anschließendem Linker und nachfolgender TEV-„site“, sowie eine *Sap*I Schnittstelle zur Ligation in den pTXB3_INT-N. Das fertige Plasmid pTXB3_N-His-TEV enthält eine Mutation in der *Nco*I-Schnittstelle, bei der die Base G deletiert ist. Das Plasmid (Abb. 3.1.8) kann jedoch weiter verwendet werden, da sich die Deletion vor dem Start-Kodon des Protein-Gens befindet.

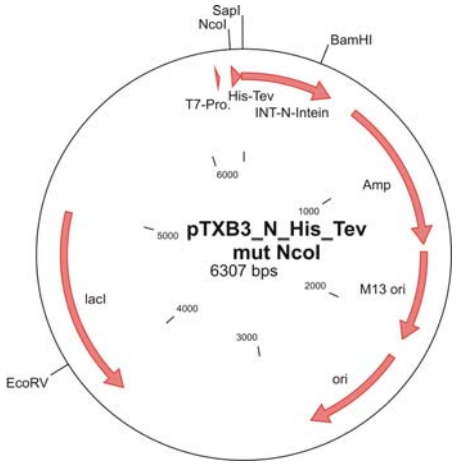


Abb. 3.1.8: Plasmidkarte des pTXB3_N_His_TEV Vektor mit mutierter *Nco*I-Schnittstelle.

Vor der Ligation wird der Vektor mittels der „Overlap Extension“-Methode (s. Kapitel 2.5.9) an der *Sap*I-Schnittstelle entsprechend der Anfangsaminosäure des einzuführenden Gens mutiert.

Die entstehenden Vektoren sind identisch zu der Plasmidkarte in Abbildung 3.1.8. Die *Sap*I-Schnittstelle enthält anstatt der Sequenz ATG als überhängendes Ende, die Sequenz TGT (Cystein) bzw. TCG (Serin). Abbildung. 3.1.9 zeigt die Plasmidkarten der durch Ligation mit dem jeweiligen Zielgen hergestellten Vektoren.

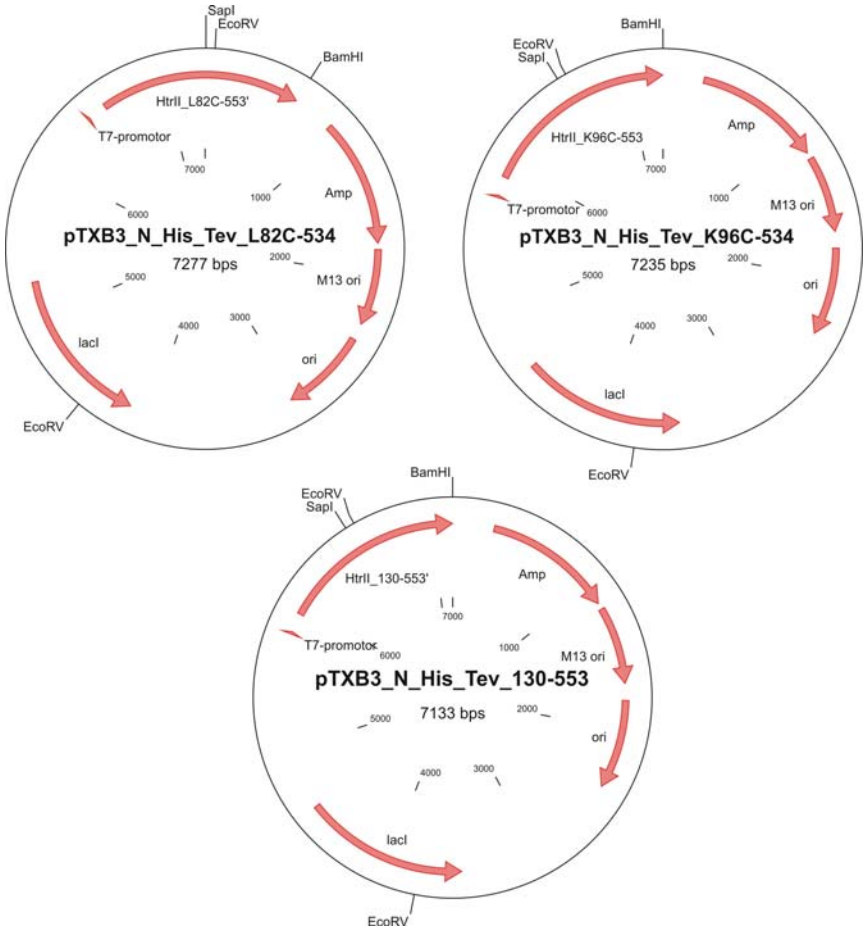


Abb. 3.1.9: Plasmidkarten der drei zytoplasmatischen Fragmente des *Np*HtrII.

Die Plasmide werden in *E. coli* XL1 transformiert (s. 2.5.7 und 2.5.8). Eine anschließende Testrestriktion der Mini-Präparationen (s. 2.5.4 und 2.5.2) ermittelt die positiven Klone, deren Korrektheit durch Sequenzierung überprüft wird.

3.1.4 Expression und Aufreinigung der zytoplasmatischen Fragmente

Die Expression der Proteine erfolgt analog zu der in Kapitel 2.6.1 beschriebenen Methode. Während der Expression werden 1 ml Zelllösungen, sowohl vor der Induktion mit IPTG, als auch nach der Induktion als Expressionskontrollen abgenommen und in 2 x SDS-Probenpuffer lysiert.

Die Aufreinigung erfolgt mit Hilfe der Ni-Affinitätschromatographie (s. 2.6.2; Abb. 3.1.10). Das eluierte N-terminale His-TEV-Konstrukt wird zur Vorbereitung auf den TEV Verdau über Nacht bei 4°C gegen TEV-Puffer dialysiert.

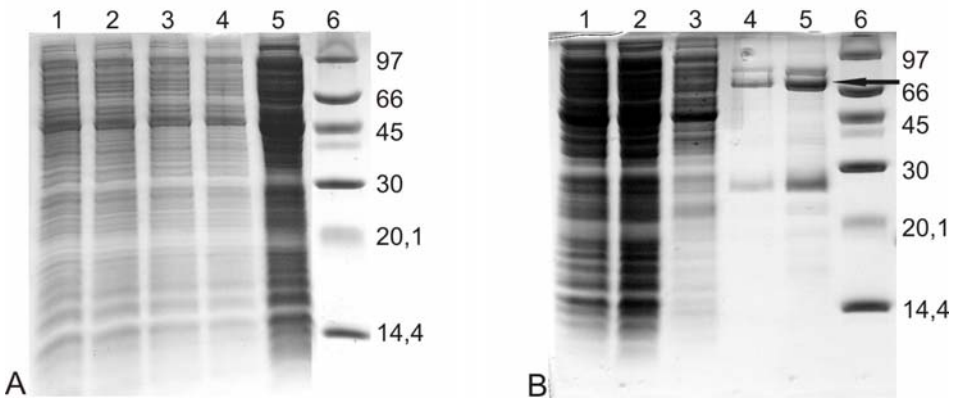


Abb. 3.1.10: SDS-Polyacrylamid-Gele der Expression und Aufreinigung bis zum TEV-Verdau am Beispiel des *Np*HtrII_L82C-534 Konstruktes.
A: 1: Zelllösung (ZL) vor der Induktion, 2: ZL 30' nach Ind., 3: ZL 1,5 h nach Ind., 4: ZL 2,5 h nach Ind., 5: Zytoplasma, 6: LMW-Standard.
B: 1: Zytoplasma, 2: Ni-Durchfluss, 3: Ni-Waschen, 4: Ni-Eluat, 5: Ni-Eluat in TEV-Puffer dialysiert, 6: LMW-Standard. Der Pfeil markiert das eluierte *Np*HtrII_N_His_TEV_L82C-534.

In den Expressionsproben (Abb. 3.1.10 A, Spuren 2 - 4) ist im Vergleich zu der Probe vor der Induktion (Spur 1) keine zusätzliche Bande zu erkennen. Auch im Zytoplasma (Spur 5) läst sich das Protein in Gegenwart zytoplasmatischer Proteine im SDS-Gel nicht identifizieren. Die Abbildung 3.1.10 B zeigt eine Aufreinigung des zytoplasmatischen Fragmentes über die Ni-Säule. Unerwünschte Proteine werden im Durchfluss (Spur 2) und in einem Waschschritt (Spur 3) abgetrennt. Das Ni-Eluat (Spur 4 und 5) enthält drei Banden bei den Molekulargewichten von ca. 80 – 85 kDa, 70 – 75 kDa und 27 kDa. Der Pfeil markiert das Transducer-Fragment, das durch den anschließenden TEV-Verdau nachgewiesen (s. u.) wird. Das Protein erscheint bei einer Größe von ca. 70 - 75 kDa, trotz seines kalkulierten Molekulargewichtes von 50,6 kDa. Das *Np*HtrII_N_His_TEV_K96C-534 und das *Np*HtrII_N_His_TEV_130-534 zeigen ebenfalls ein höheres apparentes Molekulargewicht als erwartet, und zwar 70 – 75 kDa (kalkuliertes MW: 49,4 kDa) bzw. ca. 60 kDa (kalkuliertes MW: 45,5 kDa). Die entsprechenden Gele zeigen ansonsten ein gleiches Muster wie die in der Abbildung 3.1.10 gezeigten. Bei den anderen beiden Proteinbanden handelt es sich um Verunreinigungen.

Zur weiteren Aufreinigung der zytoplasmatischen Fragmente wird der N-terminale His-TEV-Tag abgespalten. Dazu wird als erstes stellvertretend für alle drei zytoplasmatischen Fragmente am *Np*HtrII_N_His_TEV_L82C-534 getestet in welchem Verhältnis die C-terminal His-getaggte TEV-Protease eingesetzt werden muss, damit es zur vollständigen Abspaltung kommt. Es wird zunächst ein Test-TEV Verdau durchgeführt. Jeweils 2,5 µg Protein-Proben werden mit

verschiedenen Konzentrationen der TEV-Protease inkubiert und anschließend auf einem SDS-Gel analysiert (nicht gezeigt). In dem Bandenmuster ist kein Unterschied zwischen den einzelnen Proben sichtbar. Der Unterschied von 2 kDa kann vermutlich bei den großen Molekulargewichten nicht auf einem SDS-Gel detektiert werden. Deshalb wird erneut ein Test-TEV Verdau durchgeführt, bei dem nach der Inkubation eine Ni-Chromatographie durchgeführt wird. Das *Np*HtrII_L82C-534 befindet sich im Durchfluss der Säule. Als Beispiel wird in Abbildung 3.1.11 A das entsprechende SDS-Gel eines 1:50 Verhältnisses (Massenverhältnis TEV-Protease : *Np*HtrII-Fragment) gezeigt, welches auch für spätere Abspaltungsreaktionen eingesetzt wird.

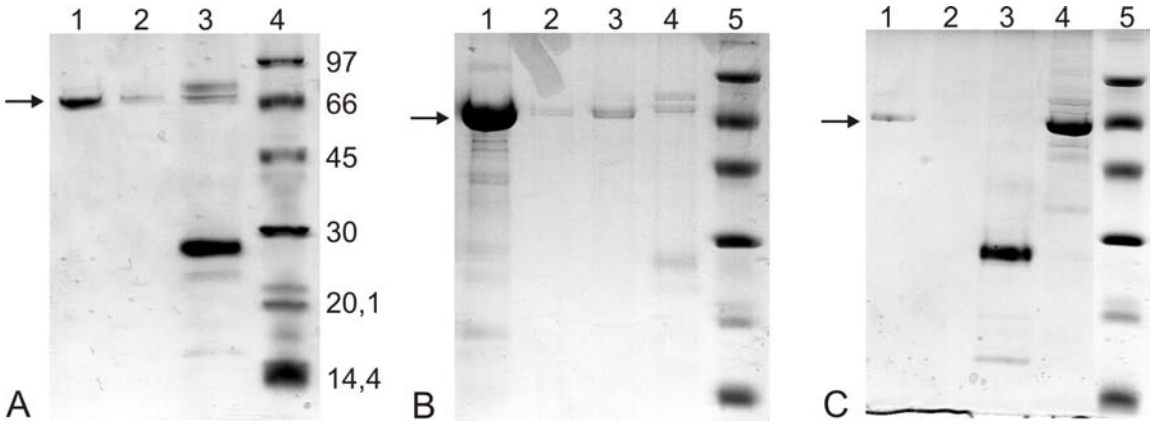


Abb. 3.1.11: SDS-Gele der 2. Ni-Säule nach dem TEV-Verdau der drei zytoplasmatischen *Np*HtrII-Fragmente (durch Pfeile markiert). Die TEV-Protease mit His-Tag befindet sich im Ni-Eluat.
A: *Np*HtrII_L82C-534: 1: Ni-Durchf., 2: Ni-Waschen, 3: Ni-Eluat, 4: LMW.
B: *Np*HtrII_K96C-534: 1: Ni-Durchf., 2: Durchf. ankonzentriert, 3: Ni-Waschen, 4: Ni-Eluat, 4: LMW.
C: *Np*HtrII_130-534: 1: Ni-Durchf., 2: Ni-Waschen, 3: Ni-Eluat, 4: ankonzentrierter Ni-Durchfluss, 5: LMW.

Die Spuren 1 der Abbildung 3.1.11 zeigen jeweils die Ni-Durchflüsse nach dem TEV-Verdau. Die zytoplasmatischen Fragmente *Np*HtrII_L82C-534 (kalkuliertes MW: 48,5 kDa), *Np*HtrII_K96C-534 (kalkuliertes MW: 47,3 kDa) und *Np*HtrII_130-534 (kalkuliertes MW: 43,4 kDa) befinden sich jeweils bei den apparenten Molekulargewichten von ca. 70 kDa, 68 kDa und 60 kDa. Im Eluat (Spuren 3 (A+C) und 4 (B)) ist die TEV-Protease bei ca. 27 kDa sichtbar.
Die zytoplasmatischen Proteine werden anschließend auf 1 – 8 mg/ml ankonzentriert.

3.1.5 Mutagenese der *Np*HtrII-Cysteinmutanten

Für die ESR-Untersuchungen zur Struktur und Funktion von *Np*HtrII werden verschiedene Cysteinmutanten hergestellt (s. Abb. 3.1.12).

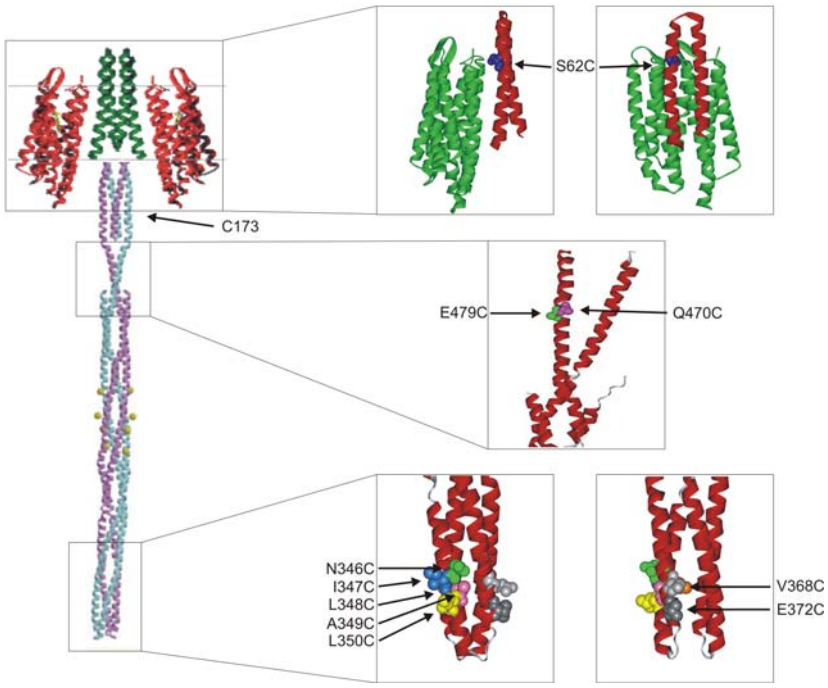


Abb. 3.1.12: Schematische Darstellung der ausgesuchten Positionen zur Spinmarkierung im *Np*HtrII Molekül. Die einzelnen Aminosäuren sind farblich gekennzeichnet. Die Kristallstruktur des *Np*SRII/*Np*HtrII Komplexes (obere Bilder) ist aus Gordeliy (Gordeliy *et al.*, 2002) entnommen. Die unteren Bilder stellen die Kristallstruktur des Tsr-Rezeptors (Kim *et al.*, 1999) mit den entsprechenden Positionen im *Np*HtrII dar.

Die Positionen werden ausgewählt um folgende Fragen zu beantworten:

S62C: Bewegt sich die TM2 auch auf der extrazellulären Seite?

N346C - E372C: Wird für diesen Bereich eine coiled-coil Struktur gefunden? Ist die Signalweiterleitung an die Histidin-Kinase CheA gestört?

E469C und Q470C: Findet eine Beeinflussung der Methylierung des Transducers statt?

Eine Auswahl der Positionen erfolgt auf Grundlage der Sequenzhomologie zu den Chemotaxisrezeptoren und den Daten zur Aktivierung/Inhibierung der Histidin-Kinase CheA von Mehan *et al.* (Mehan *et al.*, 2003). Die analogen Aminosäuren des *Np*HtrII an den Positionen L350C, V368C und E372C zum Tar-Rezeptor zeigen laut Mehan eine Inhibierung des CheA bei den Eukaryoten. Zusätzlich soll eine 1,5 Helix-Windung untersucht werden, um die erwartete coiled-coil-Struktur zu identifizieren und eventuelle Konformationsänderungen bzw eine Dynamik zu beobachten. Die beiden Positionen E469C und Q470C entsprechen laut

Sequenzalignment zwei Methylierungsstellen des *Np*HtrII, die auf Informationen von M. Koch (Koch, 2005) beruhen.

Die Mutagenese der Cysteinmutanten erfolgt mit Hilfe der „Overlap Extension Methode“ von Ho *et al.* (Ho *et al*., 1989) (s. 2.5.9). Bevor jedoch die einzelnen Cysteinmutationen eingeführt werden können, muss das natürliche Cystein an Position 173 entfernt werden. Als Ausgangsvektor für die PCR wird der pET27bmod-npHtrII_His Vektor und die Primer unter Kapitel 9 verwendet. Das Cystein wird zu einem Serin mutiert, um Einflüsse auf die Struktur zu minimieren. Der so klonierte Vektor pET_HtrII_C173S_His wird als Ausgangsvektor für die eigentlichen Mutationen verwendet. Die amplifizierten mutierten Gen-Fragmente werden anschließend zurück in den Ausgangsvektor, aus dem das entsprechende Stück heraus geschnitten wird, ligiert und in den *E.coli* XL1 Stamm zur Sequenzanalyse transformiert. Abbildung 3.1.13 zeigt als Beispiel die Plasmidkarte der Mutanten S62C.

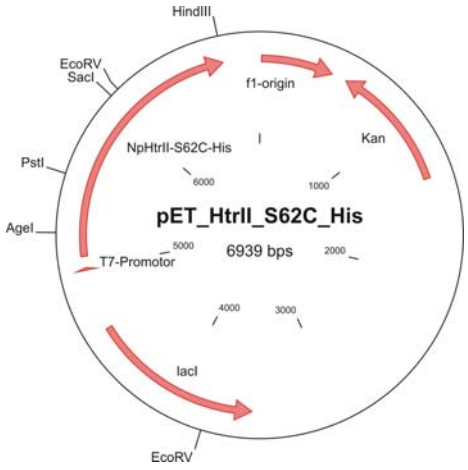


Abb. 3.1.13: Plasmidkarte der Cysteinmutanten *Np*HtrII_S62C-His im pET27bmod Vektor. Die Karten der anderen Mutanten sehen entspechend aus.

3.1.6 Expression und Aufreinigung der Cysteinmutanten

Die mittels Sequenzierungsanalyse identifizierten korrekten Klone werden in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Expression und Aufreinigung der Cysteinmutanten erfolgt analog den Protokollen unter den Kapiteln 2.6.1 und 2.6.2. Expressionsproben werden nicht abgenommen, da aus den Erfahrungen der Experimente mit dem *Np*HtrII (s. 3.1.1) keine Proteinbande im SDS-Gel sichtbar ist, die auf eine Überexpression des Proteins hinweisen könnte. Die Solubilisate werden über Ni-Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 3.1.14).

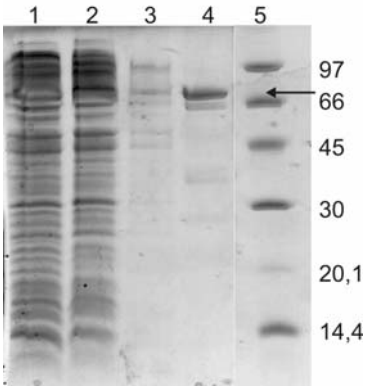


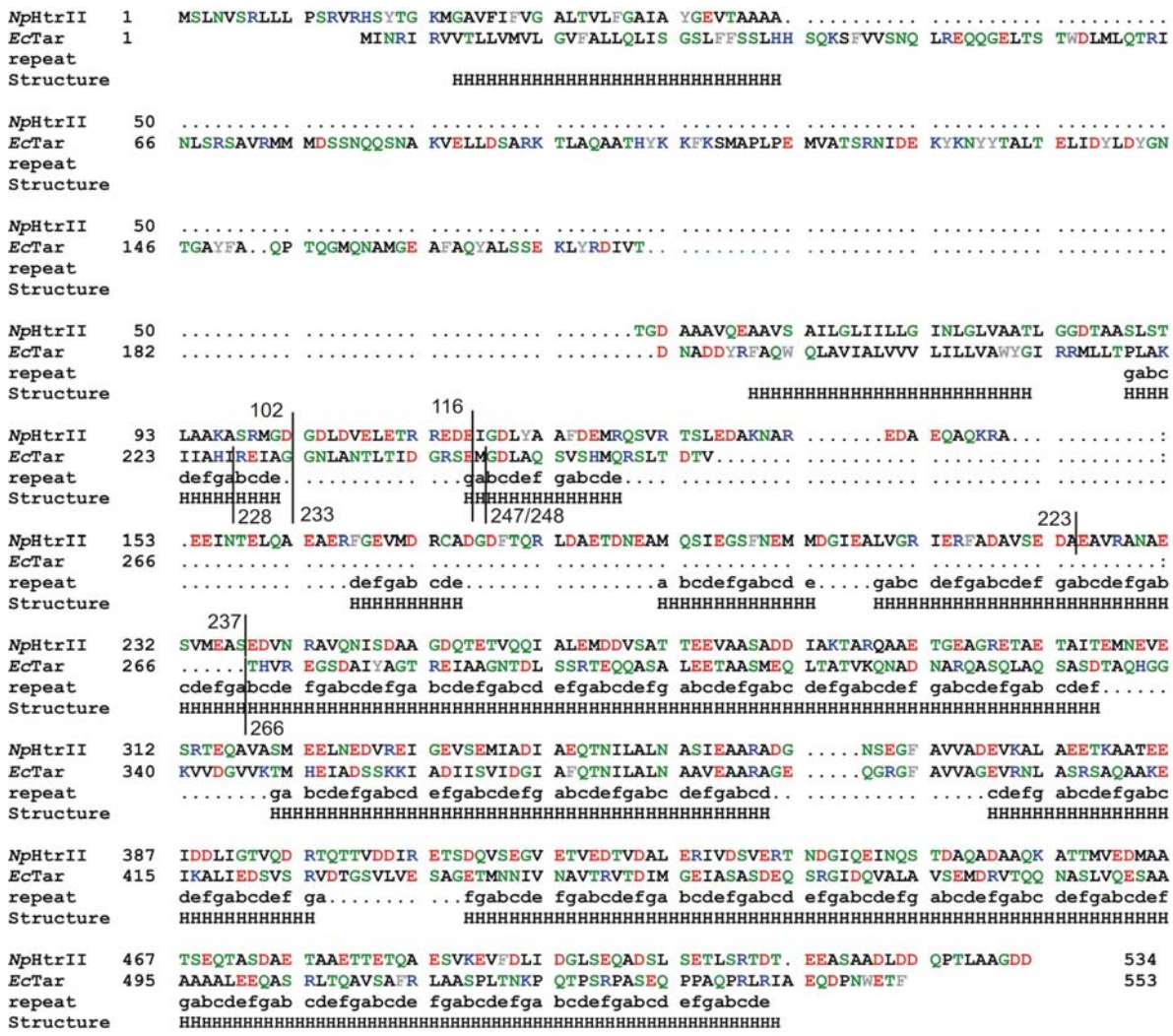
Abb. 3.1.14: SDS-Polyacrylamid-Gel der Ni-Affinitätsaufreinigung am Beispiel der Cysteinmutanten *Np*HtrII-L348C. Spur 1: Solubilisat; 2: Ni-Durchfluss; 3: Ni-Waschen; 4: Ni-Eluat; 5: LMW-Standard. Der Pfeil markiert die aufgereinigte Cysteinmutante.

Die Spuren 1 (Solubilisat) und 2 (Ni-Durchfluss) zeigen nahezu die gleichen Proteinbanden, wobei es sich um verschiedene Membranproteine handelt. Durch den Waschschritt werden zusätzlich Fremdproteine entfernt (Spur 3). Das Gel zeigt in der Spur 4 (Ni-Eluat) die erhaltene Mutante bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 70 kDa. Jedoch sind ein paar zusätzliche Banden bei kleineren Molekulargewichten erkennbar, bei denen es sich um Degradationsbanden des Transducers handeln könnte.
Alle Cysteinmutanten zeigen vergleichbares Verhalten, wobei einige Mutanten deutlich mehr Degradationsbanden aufweisen. Die Reinheit der Proteine liegt schätzungsweise zwischen 60 - 90%. Die Ausbeute beträgt ca. 1 – 2 mg pro Liter Zellkultur.

3.1.7 Auswahl der Fusionsschnittstellen für *Np*HtrII/MCP2-Chimären

Auf Grundlage der Sequenz-Homologie zwischen den archaebakteriellen Transducern und den eubakteriellen Chemotaxis-Rezeptoren, und somit vermutlich auch bezüglich ihrer Proteinstruktur, sollen Fusionsproteine hergestellt werden. Diese Chimären sollten aus dem transmembranen Bereich und der Linker-Region des HtrII aus *Natronomonas pharaonis* fusioniert mit dem zytoplasmatischen Teil des Aspartat-Rezeptors aus *E. coli* bestehen. Die Auswahl der Schnittstellen zwischen beiden Proteinen wird anhand von Sequenzdaten des Transducer *Np*HtrII im Vergleich mit den existierenden homologen Daten der Primärstruktur der Chemotaxis-Rezeptoren durchgeführt (Seidel *et al.*, 1995; Wegener, 2000; Zhang *et al.*, 1996). Die Ausrichtung der Primärstruktur zwischen den einzelnen Proteinen beruht auf dem Sequenzvergleich von Le Moual und Koshland (Le Moual & Koshland, Jr., 1996), in dem die große Homologie zwischen den Transducern und den Chemotaxis-Rezeptoren sehr deutlich wird.

Dieses Sequenzalignment wird in der von Wegener (2000) und Klare (2003) nachbearbeiteten Version verwendet. In der Abbildung 3.1.15 ist der Sequenzvergleich zwischen dem archaebakteriellen Transducer *Np*HtrII und dem Tar-Rezeptor aus *E. coli* dargestellt. Die vorausgesagte Sekundärstruktur und das für coiled-coil-Strukturen typische Heptaden-Muster sind an den entsprechenden Stellen angegeben.


NpHtrII 1 MSLNVSRLLL PSRVRHSYTG KMGAVFIFVG ALTVLFGAIA YGEVTAAAA.
EcTar 1 MINRI RVVTLLVMVL GVFALLQLIS GSLFFSSLHH SQKSFVVSNQ LREQQGELTS TWDLMLQTRI
repeat
Structure HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
NpHtrII 50
EcTar 66 NLSRSAVRMM MDSSNQQSNA KVELLDSARK TLAQAATHYK KFKSMAPLPE MVATSRNIDE KYKNYYTALT ELIDYLDYGN
NpHtrII 50
EcTar 146 TGAYFA..QP TQGMQNAMGE AFAQYALSSE KLYRDIVT..
NpHtrII 50 .....TGD AAAVQEAAVS AILGLIILLG INLGLVAATL GGDTAASLST
EcTar 182 .....D NADDYRFAQW QLAVIALVVV LILLVAWYGI RRMLLTPLAK
repeat gabc
Structure HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHH
102
116
NpHtrII 93 LAAKASRMGD GDLDVELETR REDEIGDLYA AFDEMRQSVR TSLEDAKNAR .....EDA EQAQKRA...
EcTar 223 IIAHIREIAG GNLANTLTID GRSEMGDLAQ SVSHMQRSLT DTV.....
repeat defgabcde. ...gabcdef gabcde....
Structure HHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHH
228
233
247/248
223
NpHtrII 153 .EEINTELQA EAERFGEVMD RCADGDFTQR LDAETDNEAM QSIEGSFNEM MDGIEALVGR IERFADAVSE DAEAVRANAE
EcTar 266
repeat ....defgab cde..... .....a bcdefgabcd e.....gabc defgabcdef gabcdefgab
Structure HHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
237
NpHtrII 232 SVMEASEDVN RAVQNISDAA GDQTETVQQI ALEMDDVSAT TEEVAASADD IAKTARQAAE TGEAGRETAE TAITEMNEVE
EcTar 266 .....THVR EGSDAIYAGT REIAAGNTDL SSRTEQQASA LEETAASMEQ LTATVKQNAD NARQASQLAQ SASDTAQHGG
repeat cdefgabcde fgabcdefga bcdefgabcd efgabcdefg abcdefgabc defgabcdef gabcdefgab cdef.....
Structure HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

den beiden Proteinklassen der Eubakterien und der Archaebakterien zeigt sich, dass dieser Bereich spezifisch bei den halobakteriellen Transducern ist. Beim *Np*HtrII liegt dieser Bereich zwischen der Aminosäure 136 und der Aminosäure an Position 237. Le Muoal und Koshland (Le Moual & Koshland, Jr., 1996) identifizierten diese Region ebenfalls als spezifisch für die archaebakteriellen Transducer. Später wurde diese Region als eine 2. HAMP-Domäne identifiziert (Koch, 2005).

Die Auswahl der Fusionsstellen orientiert sich an diesem Homologie- und Analogievergleich. Zusätzlich werden Mutationsstudien an *Hs*HtrI und *Hs*HtrII (Spudich, 1998; Zhang *et al.*, 1999), die gezeigt haben, dass der transmembrane Teil des Transducers *Np*HtrII für die Aufnahme und Weiterleitung des Lichtsignals vom *Hs*SRII notwendig ist, mit in die Auswahl einbezogen. Aus weiteren Studien ist deutlich geworden, dass die zytoplasmatische Domäne der Transducer austauschbar ist. Ein Fusionsprotein aus *Hs*HtrII verbunden mit dem zytoplasmatischen Bereich des *Hs*HtrI war funktionell (Zhang *et al.*, 1999). Auch Trivedi und Spudich (Trivedi & Spudich, 2003) zeigten die Funktionalität einer Chimäre zwischen *Np*HtrII und *Ec*Tsr. Die Schnittstellen werden so gewählt, dass sie zum einen die zusätzliche für Transducer-Proteine spezifische Region enthalten, welche die zweite HAMP-Domäne einschließt, und zum zweiten das typische für coiled-coil auftretende Heptaden-Muster $(abcdefg)_n$ nicht unterbrechen. Die Positionen a und d entsprechen typischerweise hydrophoben Seitenketten und f und g geladenen Seitenketten. Beim *Np*HtrII werden zwei verschiedene Positionen für die Schnittstellen gewählt, die sich direkt am Ende der eingeschobenen Transducer-Sequenz, also der 2. HAMP-Domäne, befinden, wobei die Schnittstelle 237 auf Grundlage des neuesten Sequenzalignments (s. Abb. 3.1.16) ausgewählt wird und die Position 223 auf eine alternative Version zurückgeführt wird, da in dieser Version der Transducer-spezifische Bereich schon an der Aminosäure 223 endet.

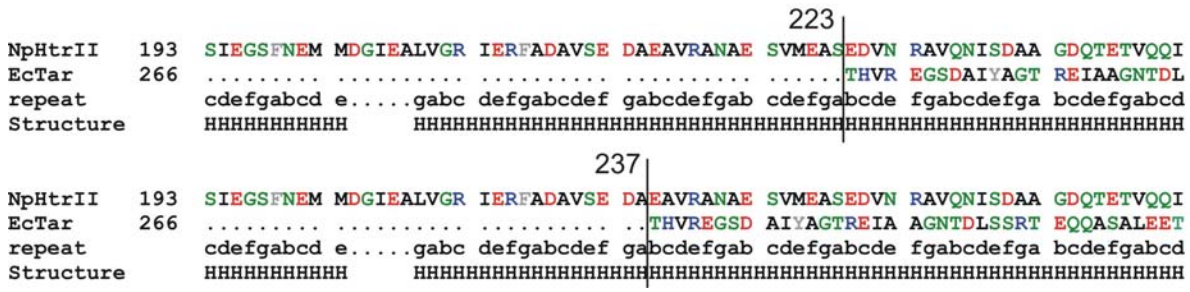


Abb. 3.1.16: Ausschnitt des Sequenzalignments zwischen dem *Np*HtrII und dem *Ec*Tar mit Kennzeichnung der vorausgesagten Sekundärstruktur und dem Heptaden-Muster (Le Moual & Koshland, Jr., 1996). Die untere Version entspricht dem neuesten Alignment (Wegener (2000) und Klare (2003)) und der obere Vergleich stellt die alternative Version dar.

Die Schnittstellen im Aspartat-Rezeptor (AS 266, 248, 247, 223, s. Abb. 3.1.15) werden so gewählt, dass das Heptaden-Muster nicht unterbrochen wird, d. h. endet der *Np*HtrII-Teil mit

einer Aminosäure an der Position a, beginnt der Tar-Teil an einer Aminosäure an der Position b. Zusätzlich wird der zytoplasmatische Teil des MCP2 immer größer, so dass der C-Terminus bei den Fusionsproteinen d und e keinen Kontakt mehr mit dem archaebakteriellen Teil des Fusionsproteins haben kann. Es wird angenommen, dass der zurückgefaltete C-Terminus eventuelle Interaktionen mit der ersten zytoplasmatischen Helix des coiled coil eingeht. Die fünf Fusionsproteine sind im Folgenden mit ihren jeweiligen Schnittstellen (in der Abb. 3.1.15 markiert) angegeben:

*Np*HtrII/MCP2-237/266	(FP-a)
*Np*HtrII/MCP2-237/248	(FP-b)
*Np*HtrII/MCP2-223/248	(FP-c)
*Np*HtrII/MCP2-237/228	(FP-d)
*Np*HtrII/MCP2-223/228	(FP-e)

Die Abbildung 3.1.17 zeigt eine schematische Darstellung der fünf Chimären nach Vorbild der Sekundärstruktur-Zuweisung des Serin-Rezeptors von Kim *et al.* (Kim *et al.*, 1999).

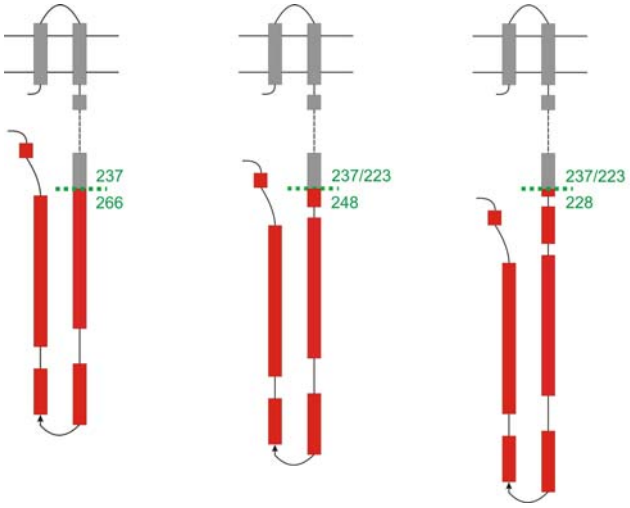


Abb. 3.1.17: Schematische Zeichnung der fünf entwickelten Chimären nach dem Vorbild von Kim *et al.* (Kim *et al.*, 1999). In grün sind die einzelnen Positionen der jeweiligen Schnittstellen angegeben.

Zusätzlich zu diesen fünf Chimären werden noch weitere Fusionsproteine aus *Np*HtrII und *Ec*Tar, die in anderen Arbeiten (Hippler-Mreyen, 2003b; Mennes, 2003) hergestellt wurden, überprüft. Die Schnittpunkte dieser Chimären sind an folgenden Positionen (s. Abb. 3.1.15):

*Np*HtrII/MCP2-102/233 (FP-102)	(Mennes, 2003)
*Np*HtrII/MCP2-116/247 (FP-116)	(Hippler-Mreyen, 2003a)
*Np*HtrII/MCP2-223/266 (FP-223)	(Zur Verfügung gestellt von R.Seidel)

3.1.8 Klonierung der Chimären

Zur Konstruktion der Fusionsproteine werden beide Proteinteile getrennt voneinander durch eine PCR-Reaktion amplifiziert. Zunächst wird im Tar-Gen die *Nco*I-Schnittstelle mutiert, um diese bei der weiteren Klonierung an anderer Stelle verwenden zu können. Dazu wird ein Teilbereich des Tar-Gens, von der *Xba*I- bis zur *Hind*III-Schnittstelle, aus dem pDV4 Vektor (Scharf *et al*., 1998) amplifiziert und nach anschließender Restriktion in den pUCBM20 Vektor ligiert. Die für die PCR-Reaktionen notwendigen Primer sind in Kapitel 9 beschrieben. Die *Nde*I-Schnittstelle wird nun mit Hilfe der „Overlap Extension Methode“ im pUCBM20_Tar-Teil Vektor (s. Abb. 3.1.19 A) mutiert. Dieser mutierte pUCBM20_Tar-Teil_Mut_NdeI Vektor (s. Abb. 3.1.19 A) wird als Matrize für die Amplifikation der einzelnen MCP2-Teile für die Fusionsproteine eingesetzt. Die *Np*HtrII-Fragmente werden aus dem Vektor pRPS1 heraus amplifiziert. Die flankierenden Primer der beiden PCR-Reaktionen führen am Anfang des Gens eine *Nde*I-Schnittstelle und am Ende des Gens eine *Hind*III-Schnittstelle mit einem vorgeschalteten Stop-Codon in das offene Leseraster der beiden Gen-Teile ein. Die Schnittstellen-Primer enthalten jeweils an ihrem 5’-Ende einen 15 – 16 bp langen Überhang, der zu dem entsprechendem Gen-Fragment des anderen Proteins in der Chimäre komplementär ist. Dadurch können sich die beiden Fusionsstellen in einer folgenden Ligations-PCR, durch die das komplette Fusionsprotein amplifiziert wird, aneinander lagern. Die Strategie dieser Klonierung ist in Abbildung 3.1.18 schematisch dargestellt.

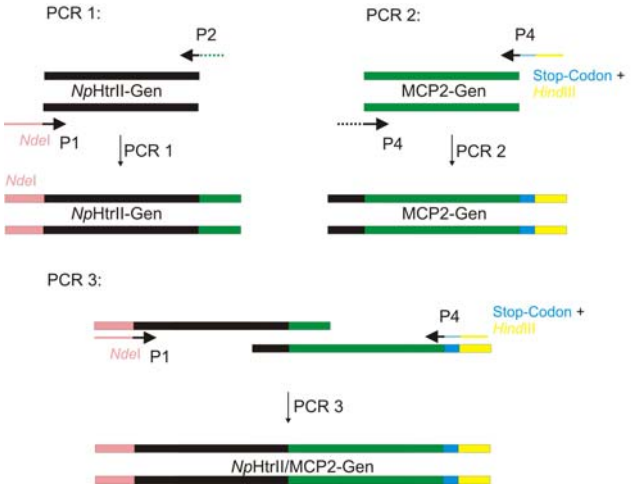


Abb. 3.1.18: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion zur Konstruktion der Fusionsproteine zwischen dem *Np*HtrII und dem Tar- (MCP2) Rezeptor aus *E. coli*. Die einzelnen Gen-Bereiche und Restriktionsschnittstellen sind farblich voneinander unterschieden.

Nach den PCR-Reaktionen werden die fusionierten Gen-Produkte durch eine Restriktion mit den beiden Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Hind*III geschnitten. Eine anschließende Ligation

dieser Gene in den ebenfalls mit *Nde*I und *Hind*III geschnitten pET27b$^+$ Vektor führt zu dem in Abbildung 3.1.19 B gezeigten Plasmid. Die Plasmide der vier anderen Chimären sehen entsprechend aus. Das Fusionsgen steht hier ebenfalls unter der Kontrolle des T7-Promotors. Dieses Expressionssystem wird näher unter Kapitel 3.1.1 beschrieben. Die Identität der PCR-Produkte wird nach der Ligation durch Sequenzierung nachgewiesen.

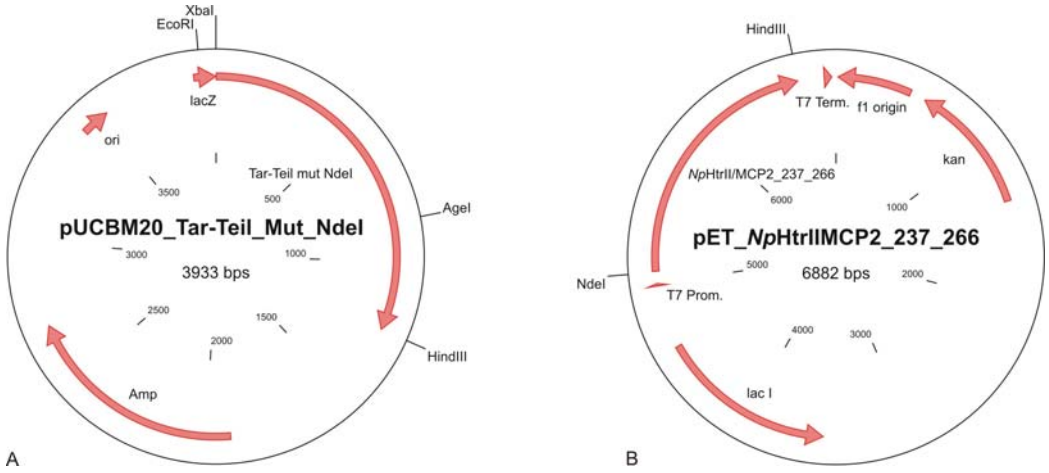


Abb. 3.1.19: Plasmidkarte von pUCBM20_Tar-TeiI_Mut_NdeI (A). Der Vektor pUCBM20_Tar-TeiI sieht entsprechend aus. In B ist der Vektor pET_*Np*HtrII/MCP2_237_266 dargestellt. Die Karten der anderen Chimären sehen entspreched aus.

Die Chimären sind im pET-Vektor ohne einen Tag zur Aufreinigung kloniert worden. Deshalb werden sie in den pTXB3_N_His_TEV Vektor mit mutierter *Nco*I-Schnittstelle (s. 3.1.8) umkloniert, so dass sie einen N-terminalen His-Tag mit anschließender TEV-Schnittstelle erhalten. Dazu werden die Chimären mittels PCR aus dem pET-Vektor amplifiziert. Durch die Primer wird am N-Terminus eine *Sap*I-Schnittstelle und am C-Terminus eine *Bam*HI-Schnittstelle eingefügt, so dass sie nach anschließender Restriktion mit diesen Enzymen in den pTXB3_N_His_TEV Vektor ligiert werden können. Die Sequenz der Fusionsproteine wird erneut durch Sequenzierung auf Fehler getestet. Die entsprechenden Plasmide sind in Abbildung 3.1.20 am Beispiel der Chimäre 237/266 (a) dargestellt und enthalten das Fusionsprotein als N-terminales His-TEV-Konstrukt, wie auch schon in Abbildung 3.1.7 für die zytoplasmatischen *Np*HtrII-Konstrukte gezeigt wird.

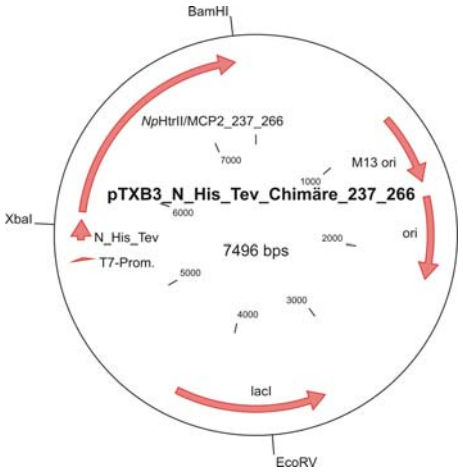


Abb. 3.1.20: Plasmidkarte des pTXB3_N_His_TEV_FP-a. Die Karten der anderen Chimären sehen identisch aus.

3.1.9 Expression und Aufreinigung der Chimären

Die Expression der Fusionsproteine erfolgt mit den Vektoren pTXB3_N_His_TEV_FP im *E. coli* BL21(DE3) Stamm (s. 2.6.1). Die anschließende Aufreinigug der His_TEV-Konstrukte wird in Kapiel 2.6.2 beschrieben. Bei der folgenden SDS-PAGE Analyse ist das Fusionsrotein als sehr undeutliche Bande sichtbar. Zusätzlich sind viele weitere Banden erkennbar, bei denen es sich vermutlich um Degradationsbanden handelt. Durch einen zusätzlichen Western Blot lässt sich die Fusionsbande nicht genau identifizieren, da eine starke Hintergrund-Färbung auftritt. Daher wird diese Methode der Aufreinigung nicht weiter verfolgt.

Ein alternativer Ansatz macht sich die Bindung des Transducers an den Rezeptor *Np*SRII zu Nutzen. Dazu werden die Vektoren pET_FP (s. 3.1.19 B) ebenfalls in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Zellen werden analog zu Kapitel 2.6.2 aufgereinigt. Die Ni-Affinitätschromatographie mit dem solubilisierten Membranprotein erfolgt, um in einem ersten Aufreinigungsschritt die an das Ni-Material bindenden Proteine abzutrennen. Da die Chimären keinen Affinitäts-Tag, weder C-terminal noch N-terminal, besitzen, binden die Fusionsproteine nicht an die Ni-Matrix, sondern sind im Durchfluss der Säule zu finden. Dieser enthält neben dem Fusionsprotein auch ca. 2/3 *E. coli* Proteine, die als Verunreinigungen entfernt werden müssen. Die Chimären sollen nun durch eine Co-Aufreinigung mit dem Rezeptor *Np*SRII aus dieser Proteinmischung isoliert werden. Eine Konzentrationsbestimmung der Lösung erfolgt mit Hilfe des Bradford-Tests. Die erhaltene Gesamtmenge an Protein wird durch 3 dividiert, da nach einer Abschätzung aus dem SDS-Gel die *Np*HtrII-Menge ca. 1/3 beträgt. Der Rezeptor wird anschließend in einem 1:1 Verhältnis (Molarverhältnis Rezeptor : Chimäre, theoretisch berechnet) zum Ni-Durchfluss zugefügt. Nach einer 2 - 4 stündigen Inkubation bei 4°C wird

erneut eine Ni-Chromatographie durchgeführt. Da das *Np*SRII C-terminal mit einem His-Tag versehen ist, bindet dieses Protein im Komplex mit der Chimäre an die Ni-Matrix und wird mit Puffer D_{mem} (s. 2.6.2) als saubere Fraktion eluiert. Die einzelnen Schritte der Expressionsanalyse und der anschließenden Aufreinigung werden in Abbildung 3.1.21 anhand von SDS-PAGE-Analysen dargestellt.

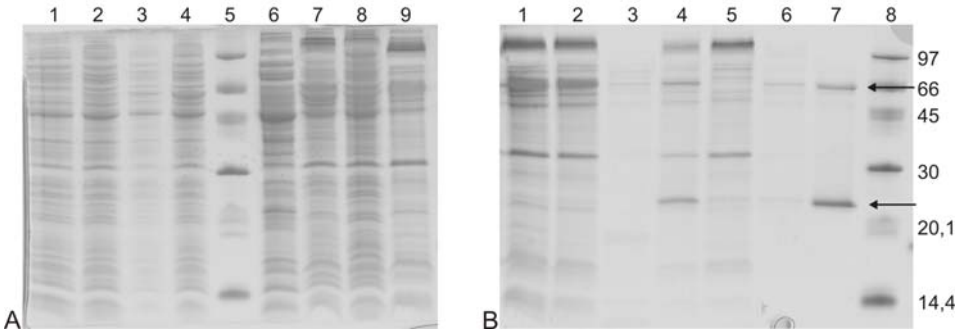


Abb. 3.1.21: SDS-Polyacrylamidgele der Expressionsuntersuchung und anschließender Aufreinigung des Fusionsproteins *Np*HtrII/MCP2_237/266 (a) zusammen mit dem Rezeptor *Np*SRII als Beispiel.
Gel A: 1: Zelllösung vor Induktion; 2-3: Zelllösung nach Iduktion (30', 1,5 h, 2,5 h); 5: LMW-Standard; 6: Zytoplasma; 7: Membranen; 8: unlösliche Bestandteile; 9: Solubilisat.
Gel B: 1: Solubilisat; 2: 1 x Ni-Durchfluss; 3: 1 x Ni-Eluat; 4: 1 x Ni-Durchfluss + *Np*SRII; 5: 2 x Ni-Durchfluss; 6: 2 x Ni-Waschen; 7: 2 x Ni-Eluat; 8: LMW-Standard.
Der LMW-Standard ist in kDa angegeben. Die Pfeile markieren das *Np*SRII und das Fusionsprotein.

Aus dem SDS-Gel (A) ist erkennbar, dass in den Expressionproben keine Bande vorhanden ist, die durch eine Überexpression eines Proteins verursacht wird. Im Solubilisat (Gel A: Spur 9; Gel B: Spur 1) ist das Fusionsprotein als etwas dickere Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 66 kDa sichtbar (Pfeil). Bei der anschließenden Aufreinigung ist die Chimären-Bande nach der ersten Ni-Affinitätschromatographie noch nicht deutlich detektierbar, da im Ni-Durchfluss (Gel B: Spur 2) fast alle Fremdproteine des Solubilisates erneut auftreten. Die Spur 4 (Gel B) zeigt wieder den Ni-Durchfluss mit zusätzlichem *Np*SRII (ca. 27 kDa). Beide Proteine, Chimäre und *Np*SRII, sind hier neben ein paar Fremdbanden deutlich sichtbar (Pfeile). Ein Teil des Komplexes befindet sich jedoch auch in der Waschfraktion. Der His-Tag des *Np*SRII ist vermutlich nicht ungestört zugänglich auf Grund der Komplexbildung. Im Eluat sind *Np*SRII und die Chimäre in ausreichender Menge mit einer Reinheit > 90 % detektiertbar (Pfeile). Die Ausbeute beträgt ca. 15 mg Fusionsprotein / 1 L Zellkultur. Die Aufreinigung der anderen Fusionsproteine erfolgt analog. Es werden ähnliche Ausbeuten erhalten.

3.1.10 Klonierung der Che-Proteine

Die Funktion der Chimären soll über die Aktivierung der Zwei-Komponenten-Kaskade überprüft werden. Hierzu müssen CheA, CheW und CheY isoliert und aufgereinigt werden.
Die Klonierung der Che-Proteine wird mit Hilfe der PCR-Reaktion durchgeführt. Das CheA und das Adapterprotein CheW werden aus dem Vektor pDV4 (s. 2.3) amplifiziert. Für die PCR des CheY dient der pRL22-Vektor als Matrize. In allen drei Fällen wird durch die Polymerase-Kettenreaktion N-terminal eine *Sap*I-Schnittstelle und C-terminal eine *Bam*HI-Restriktions-schnittstelle durch die Primer eingeführt. Durch die anschließende Restriktion der PCR-Produkte mit diesen beiden Restriktionsenzymen, können die Gene der Che-Proteine in den Vektor pTXB3_N_His_TEV ligiert werden. Dadurch entstehen Plasmide durch die die Proteine mit einem N-terminalen His-TEV-Tag versehen sind. Die Plasmidkarten sind analog zu der in Abbildung 3.1.20 dargestellten Karte des pTXB3_N_His_TEV_Chimäre_237_266.

3.1.11 Expression und Aufreinigung der Che-Proteine

Die Plasmide werden ebenfalls in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Expressionsbedingungen und die Methode der Aufreinigung sind unter den Kapiteln 2.6.1 und 2.6.2 beschrieben. Da es sich bei den Che-Proteinen um zytoplasmatische Proteine handelt, kann der Überstand aus der Zentrifugation des Zelllysates direkt über Ni-Chromatographie aufgereinigt werden. Das erhaltene Eluat enthält jeweils das N-terminale His-TEV-Konstrukt des entsprechenden Che-Proteins. Durch eine Dialyse in TEV-Puffer werden die Bedingungen für den TEV-Verdau hergestellt. Die TEV-Spaltung wird optimiert um ideale Bedingungen zu bekommen. Nach dem Abspalten des His-Tags vom Protein wird die Lösung erneut auf eine Ni-Säule aufgetragen. Das natürliche Che-Protein befindet sich im Durchfluss.

Aufreinigung des CheW
In den Expressionsproben der CheW Expression lässt sich keine Bande mit zunehmender Intensität für das Protein erkennen (Abb. 3.1.22 A, Spuren 1 - 4). Nach der Ni-Säule (Spuren 8 - 10) findet sich bei ca. 27 kDa und 21 kDa zwei Banden im Eluat (Spur 10), wobei die 21 kDa Bande dem N-terminalen His_TEV-Konstrukt entspricht, das ein theoretisches Molekulargewicht von 20,1 kDa besitzt. Bei der 27 kDa Bande handelt es sich vermutlich um Cytochrome, die unter Stressbedingungen bei der Expression von den Zellen hergestellt werden und an eine Ni-Säule gebunden werden. Die zusätzliche Bande bei ca. 80 kDa stellt vermutlich eine Verunreinigung durch ein *E. coli* endogenes Protein dar.

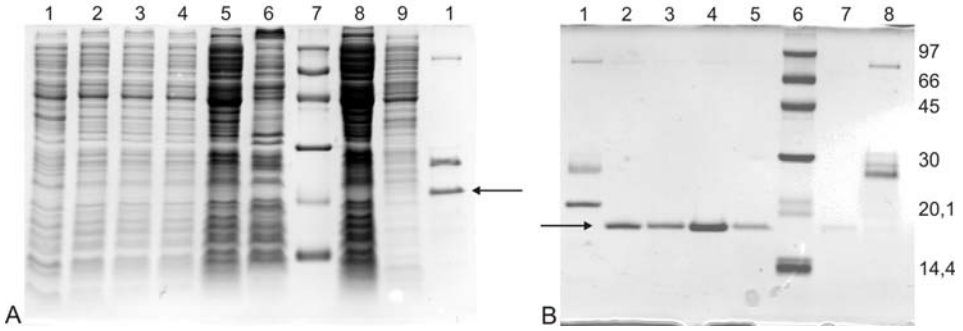


Abb. 3.1.22: SDS-PAGE der Expression und Aufreinigung des CheW.
Gel A: 1: Zelllösung vor Induktion; 2-4: Zelllösung nach Induktion (30', 1,5 h, 2,5 h); 5: Zytoplasma; 6: Membranen; 7: LMW-Standard; 8: Ni-Durchfluss; 9:Ni-Waschen; 10: Ni-Eluat.
Gel B: TEV-Verdau 1: Ni-Eluat + TEV-Protease = Auftrag; 2-5: Ni-Durchfluss in Fraktionen; 6: LMW-Standard; 7: Ni-Waschen; 8: Ni-Eluat.
Der LMW-Standard ist in kDa angegeben. Die Pfeile markieren das N_His_TEV-CheW (Gel A) und das CheW (Gel B).

Das eluierte Konstrukt des Adapterproteins CheW wird mit der N-terminal His-getaggten TEV-Protease in einem Verhältnis von 1:10 (TEV : CheW) über Nacht gespalten. Der Ansatz wird erneut über Ni-Affinitätschromatographie aufgereinigt, wobei der Durchfluss das geschnittene CheW bei ca. 18 kDa enthält (Abb. 3.1.22, Gel B, Spur 2 - 5). Das kalkulierte Molekulargewicht von CheW beträgt 18,1 kDa. Das Protein hat eine, durch Abschätzung der Bande vom SDS-Gel, Reinheit von > 95 %. In der Spur 8 (Gel B) ist die TEV-Protease erkennbar, die durch einen C-terminalen His-Tag an der Ni-Matrix gebunden bleibt. Die Durchflüsse werden vereinigt und anschließend in TKMD-Puffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DTT, pH 7.5) über Nacht bei 4°C dialysiert. Nach folgender Konzentrationsbestimmung wird die Proteinlösung aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Ausbeute des CheW beträgt ca. 0,4 mg/L Zellkultur.
Zur Identifikation des CheW wird ein ESI durchgeführt. Das Spektrum ist in Abbildung 3.1.23 dargestellt.

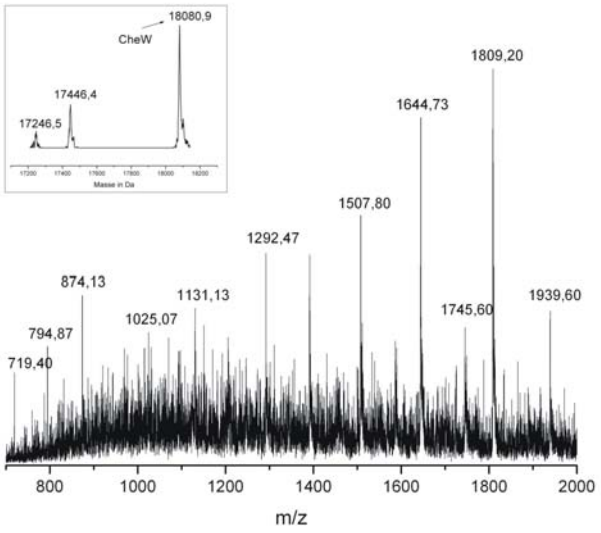


Abb. 3.1.23: ESI-Spektrum des aufgereinigten CheW.

Die Masse von 18.080,9 Da entspricht der theoretischen Masse von 18.083,8 Da des CheW.

Aufreinigung des CheY

Die Aufreinigung des Response Regulators CheY erfolgt analog zur Aufreinigung des CheW. Die Gele der Expression und Aufreinigung zeigt die Abbildung 3.1.24.

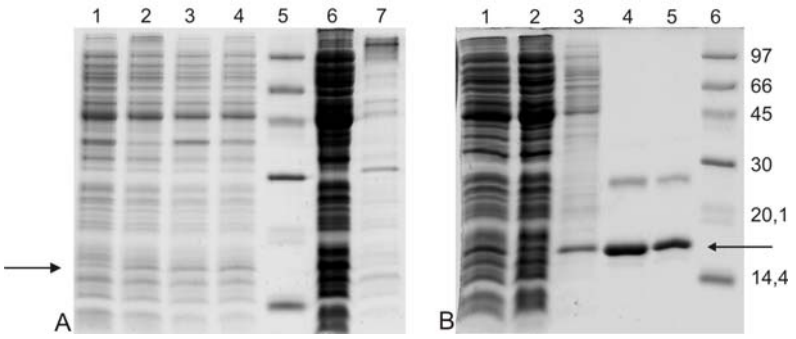


Abb. 3.1.24: Auftragung der Expressionsproben und der Schritte der ersten Ni-Säule der CheY Aufreinigung auf ein SDS-Gel.
Gel A: 1: Zelllösung vor Induktion; 2-3: Zelllösung nach Iduktion (30', 1,5 h, 2,5 h); 5: LMW-Standard; 6: Zytoplasma; 7: Membranen.
Gel B: Spur 1: Zytoplasma; 2: Ni-Durchfluss; 3: Ni-Waschen; 4: Ni-Eluat; 5: Ni-Eluat ankonz.; 6: LMW-Standard.
Der LMW-Standard ist in kDa angegeben. Die Pfeile markieren das N_His_TEV-CheY.

Bei den Expressionsproben (Gel A, Spuren 1 - 4) kann eine leichte Zunahme der Bandenintensität bei ca. 16 kDa beobachtet werden (Pfeil). Das Zytoplasma (Gel A, Spur 6 und Gel B, Spur 1) enthält sehr viele verschiedene Proteinbanden, so dass das N_His_TEV_CheY nicht sichtbar ist. Nach der Ni-Aufreinigung (Gel B, Spuren 2 - 4) eluiert das Protein bei einem

Molekulargewicht von ca. 16 kDa (Gel B, Spur 4+5). Das theoretische Molekulargewicht entspricht 16,2 kDa. Die Bande bei ca. 27 kDa entspricht vermutlich ebenfalls wieder Cytochromen. Da diese aber erfahrungsgemäß an das Ni-Material binden, können sie später bei der zweiten Ni-Chromatographie vom verdauten CheY Molekül abgetrennt werden.
Eine Optimierung des TEV-Verdaus wird auch beim N_His_TEV_CheY-Konstrukt durchgeführt. Folgende Ansätze werden getestet: 1:2; 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:250 (TEV-Protease:CheY) (Abb. 3.1.25 A).

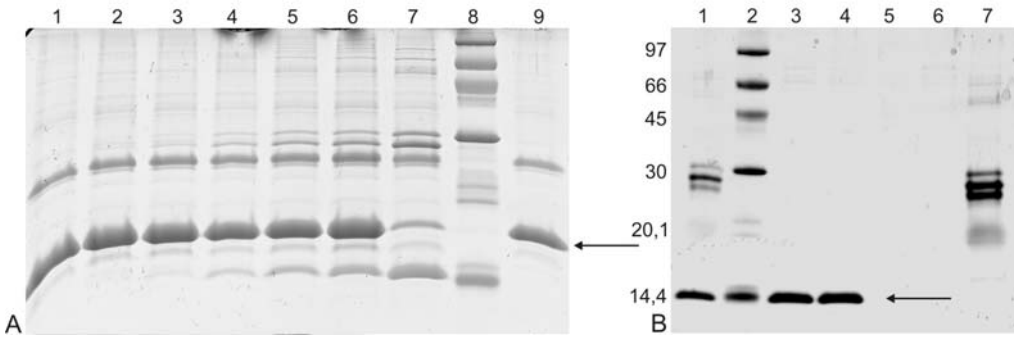


Abb. 3.1.25: SDS-Polyacrylamid-Gele des Test-TEV Verdaus des CheY (Gel A) und die anschließende Ni-Säule (Gel B). Die Pfeile markieren das N_His_TEV-CheY (Gel A) und das CheY (Gel B). Der LMW-Marker ist in kDa angegeben.
Gel A: Spur 1-7: TEV-cut (1:250; 1:100, 1:50, 1:25, 1:10, 1:5, 1:2); 8: LMW-Standard; 9: Ni-Eluat mit N_His_TEV-CheY.
Gel B: Spur 1: Auftrag: Ni-Eluat + TEV-Protease; 2: LMW-Standard; 3+4: Ni-Durchfluss; 5+6: Ni-Waschen; 7: Ni-Eluat.

In der Abbildung 3.1.25 ist erkennbar, dass die TEV-Protease, als Doppelbande bei ca. 27 – 30 kDa, in den Ansätzen immer deutlicher sichtbar wird (Gel A, Spuren 1 - 7). Zusätzlich wird die N_His_TEV-CheY-Bande bei 16 kDa erst beim 1:2 Ansatz (Gel A, Spur 7) deutlich kleiner und es entsteht eine zusätzliche Bande bei ca. 14 kDa. Diese ist schon in geringerem Maße ab einem Verhältnis von 1:25 (Spur 4) sichtbar. Durch diese Optimierungsversuche wird ein Verhältnis von 1:2 (TEV : Protein) bestimmt. Der TEV Verdau erfolgt anschließend über Nacht. Die Abtrennung der TEV-Protease mit C-terminalem His-Tag und des His-Tags des CheY erfolgt durch Ni-Affinitätschromatographie. Das Gel B, Spur 1 zeigt den Auftrag auf die Ni-Säule mit dem gespaltenen CheY und der TEV-Protease. Das CheY befindet sich deutlich sichtbar in der Durchfluss-Fraktion bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 14 kDa (theoretisches MW 14,1 kDa) (Spur 3+4). Das Protein kann mit einer Reinheit von > 95 % isoliert werden. Die Ausbeute beträgt ca. 1,2 mg/L Zellkultur. Anschließend erfolgt eine Dialyse in TKMD-Puffer und eine Aliquotierung. Das Protein wird bei -80°C gelagert.
Zur Identifikation des Proteins werden ebenfalls eine ESI-Messung und zusätzlich eine MALDI-Messung durchgeführt. Die Probe wird wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben vor der Messung behandelt. Für die ESI-Messung wird eine Probe sowohl durch eine Aceton-Fällung (nicht

gezeigt), als auch eine TCA-Fällung vorbereitet, um das enthaltene Salz zu entfernen. Die Spektren sind in der Abbildung 3.1.26 dargestellt.

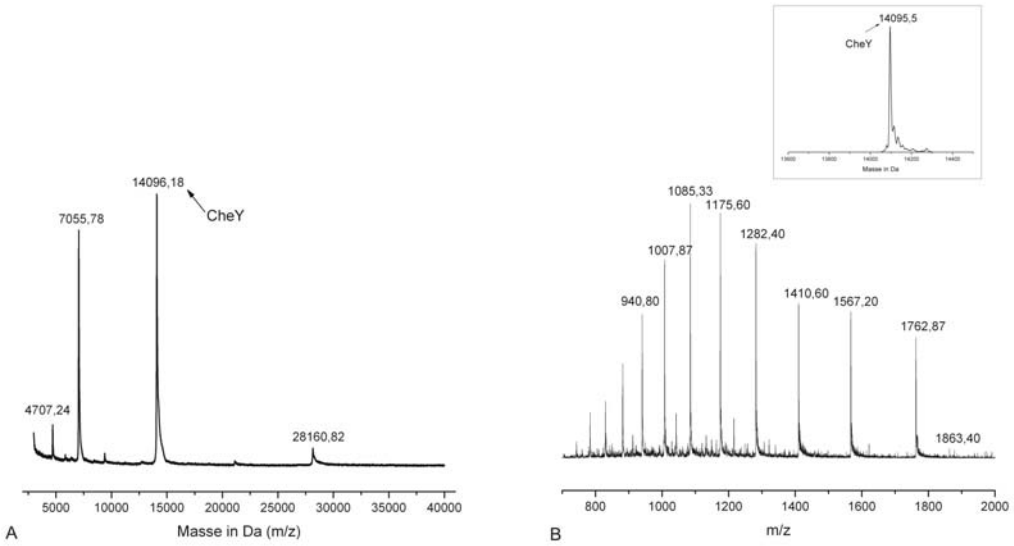


Abb. 3.1.26: Massenspektrometrische Spektren der CheY Probe. A: MALDI; B: ESI mit TCA-Fällung.

In beiden Fällen wird das theoretische Molekulargewicht der Aspartat-Kinase CheY aus *E. coli* von 14.097,3 Da unter Abzug eines H-Atoms bestimmt. Das ESI-Spektrum für die Aceton-Fällung ergibt analog zur TCA-Fällung eine Masse von 14.096,0 Da.

Aufreinigung des CheA

Die SDS-Gele der Expression und der anschließenden Aufreinigung der Histidin-Kinase CheA ist in der Abbildung 3.1.27 gezeigt.

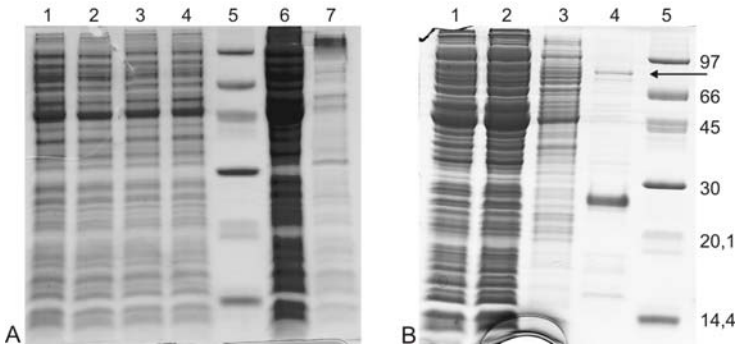


Abb. 3.1.27: SDS-PAGE der Expression und Aufreinigung des CheA.
Gel A: 1: Zelllösung (ZL) vor Induktion; 2-4: ZL nach Iduktion (30', 1,5 h, 2,5 h); 5: LMW-Marker; 6: Zytoplasma; 7: Membranen.
Gel B: 1: Zytoplasma; 2: Ni-Durchfluss; 3: Ni-Waschen; 4: Ni-Eluat; 5: LMW-Marker.
Der LMW-Marker ist in kDa angegeben. Der Pfeil markiert das CheA.

In den Expressionsproben (Gel A, Spuren 1 - 4) lässt sich auch bei dieser Expression keine deutliche Überexpression erkennen. Jedoch wird nach der Ni-Aufreinigung eine Bande bei ca. 80 kDa sichtbar, die dem N_His_TEV_CheA-Konstrukt (kalkuliertes Molekulargewicht: 73,5 kDa) entsprechen könnte (Gel B, Spur 4). Die übrigen Banden lassen sich durch Verunreinigungen erklären, die durch eine zweite Ni-Chromatographie nach der TEV-Spaltung abgetrennt werden. Die TEV-Protease wird in einem Verhältnis von 1:2 (TEV : CheA) in die Reaktion eingesetzt. Die Abbildung 3.1.28 zeigt das SDS-Gel der anschließenden Ni-Chromatographie zur Abtrennung des natürlichen CheA.

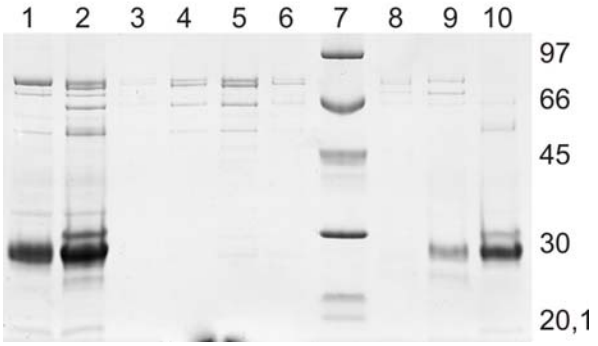


Abb. 3.1.28: Auftragung der Aufreinigungsschritte der zweiten Ni-Säule auf ein SDS-PAGE-Gel nach dem TEV-cut des CheA. Spur 1: CheA vor dem TEV-cut; 2: CheA nach TEV-cut; 3-6: Ni-Durchflüsse; 7: LMW-Standard; 8+9: Ni-Waschen; 10: Ni-Eluat. Der LMW-Standard ist in kDa angegeben.

Das SDS-Gel zeigt in der Spur 1 erneut das Ni-Eluat der ersten Säule (s. Abb. 3.1.27 B). Die restlichen Banden sind vermutlich Verunreinigungen. Die gleiche Lösung ist mit Zusatz der TEV-Protease in Spur 2 zu sehen. Die Abspaltung des N-terminalen His-TEV-Tag des CheA durch die TEV-Protease wird deutlich, da das CheA sich im Ni-Durchfluss (Spur 3 - 6) befindet. Es ist aber nicht nur eine Doppelbande sichtbar, sondern mindestens zwei weitere Banden mit einem geschätzten Molekulargewicht von 66 kDa und 55 kDa, da das CheA vermutlich nicht stabil ist und abgebaut wird. Es könnte sich um eine spontane Degradation des Proteins handeln. In den beiden Waschfraktionen (Spur 8 + 9) sind noch Proteinbanden erkennbar, die dem CheA entsprechen. Zusätzlich befindet sich in der Spur 9 die dicke Verunreinigung bei ca. 27 kDa. Im Eluat der Ni-Säule ist die TEV-Protease mit C-terminalem His-Tag sichtbar, die ebenfalls bei einem Molekulargewicht von ca. 27 kDa erscheint. Auf Grund der Degradation der Histidin-Kinase CheA hat sich diese Methode der Aufreinigung jedoch nicht bewährt.

Alternativ wird das CheA nach der Methode von Hess *et al.* (Hess *et al.*, 1991) isoliert (s. 2.6.2). Die Expression des CheA wird mit dem Vektor pDV4 im Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Die Überexpression des CheA-Gens wird durch IAA (3β-Indoleacrylicacid) induziert. Die Zellen werden geernet und das Pellet mit TEDG20-Puffer (s. 2.6.2) gewaschen. Nach Aufschluss der Zellen und Fällung durch Ammoniumsulfat wird das resuspendierte Pellet

in TEDG20-Puffer über Nacht dialysiert und anschließend auf eine AffiGel Blue Säule aufgetragen. Das FPLC-Chromatogramm ist in Abbildung 3.1.29 dargestellt.

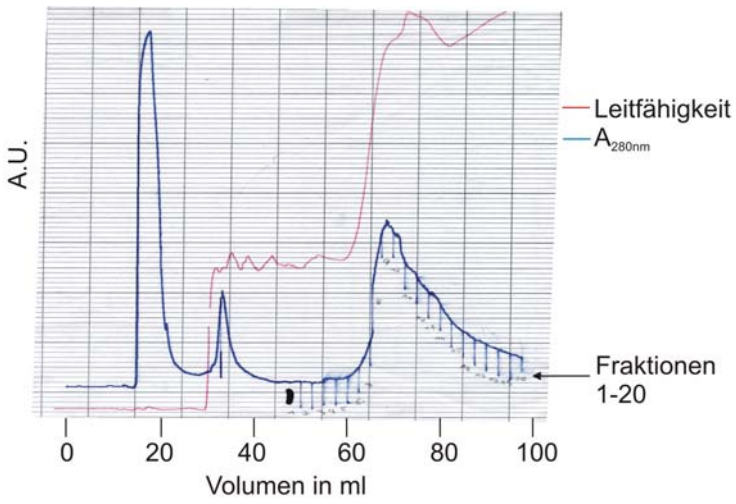


Abb. 3.1.29: Chromatogramm der CheA Aufreinigung über eine AffiGel Blue Säule. Die gesammelten 2,5 ml Fraktionen sind durch eine Nummerierung der senkrechten Striche angedeutet.

Der blaue Graph repräsentiert die Absorption bei 280 nm. Die ersten beiden großen Peaks entsprechen Verunreinigungen der Probe. Im dritten breiten Peak eluiert das CheA, von dem 2,5 ml Fraktionen gesammelt werden (durch die senkrechten Striche angedeutet). Zur Identifikation werden diese Fraktionen der Säule auf einem SDS-Gel (Abb. 3.1.30) aufgetrennt.

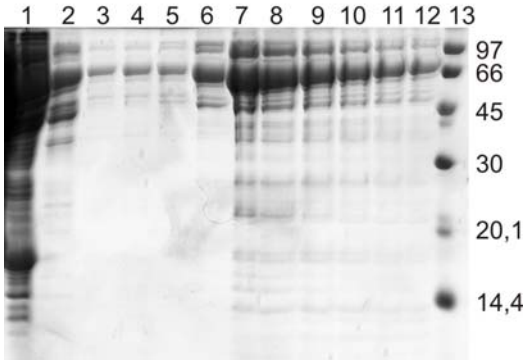


Abb. 3.1.30: SDS-Polyacrylamid-Gel der Aufreinigung über die AffiGel Blue Säule. Spur 1: Durchfluss; 2: Waschen; 3 - 12: 2,5 ml Fraktionen des Gradienten in zweier Schritten von 2 – 20; 13: LMW-Standard in kDa.

Das CheA ist bei einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa sichtbar. Die Fraktionen 6 - 20 (Spur 5 - 12) werden vereinigt, da dort der größte Anteil des CheA vorhanden ist, und erneut durch die Zugabe von Ammoniumsulfat gefällt. Nach Inkubation auf Eis wird das Präzipitat pelletiert und in TEDG-Puffer (s. 2.6.2) resuspendiert. Diese Protein-Lösung wird über eine Superdex 200 Säule, aufgetrennt. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 3.1.31 zu sehen.

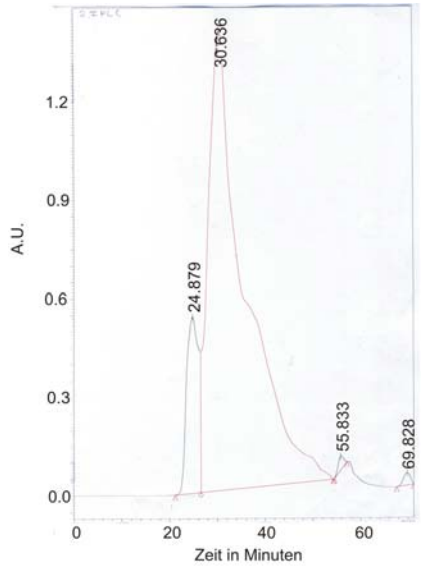


Abb. 3.1.31: FPLC-Chromatogramm der Superdex 200 Säule mit dem Auftrag des CheA.

Das Chromatogramm zeigt 4 Peaks, bei den ungefähren Retentionszeiten 25, 31, 56 und 70 min. Der Peak bei 31 min erscheint mit einer zusätlichen Schulter, die allerdings im SDS-Gel (s. Abb. 3.1.32) keinen Unterschied zur Peakspitze bei 31 min zeigt. Während des Laufs wird pro Minute eine Fraktion gesammelt, die mittels SDS-PAGE (Abb. 3.1.32) analysiert werden.

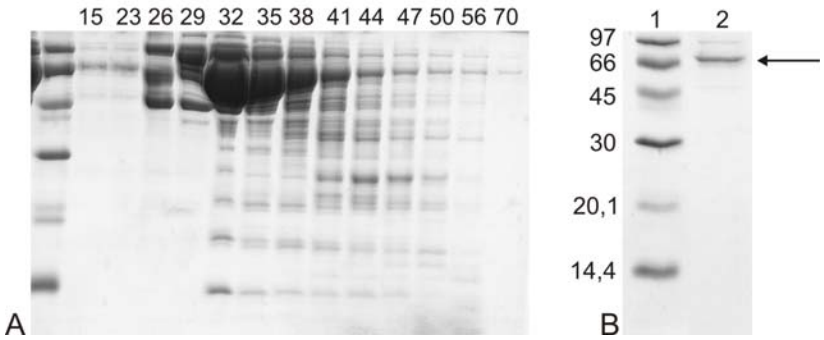


Abb. 3.1.32: Auftragung der einzelnen Fraktionen des FPLC-Laufs mit der Suerdex 200 Säule und dem Auftrag des CheA (Gel A). Spur 1: LMW-Standard. Die restlichen Spuren geben die Retentionszeiten in Minuten der aufgetragenen Fraktionen an.
Gel B: CheA, nach der Dialyse in TKMD-Puffer (Spur 2), Spur 1: LMW-Standard. Der Pfeil markiert das CheA.
Der LMW-Standard ist in kDa angegeben.

Das CheA (bei ca. 70 kDa) eluiert in einer breiten Verteilung mit der Hauptmenge in den Fraktionen 30 - 38 (Gel A). Diese werden zu einer Fraktion zusammengefasst. Anschließend erfolgt eine Dialyse in TKMD-Puffer (s. 2.6.2) über Nacht bei 4°C und eine Konzentrationsbestimmung. Das CheA kann ohne zusätzliches Ankonzieren (Gel B, Spur 2) durch Zugabe von 10 % Glycerin stabilisiert werden und wird bei -80°C mit einer Konzentration von 1,88 mg/ml gelagert. Durch diese Präparationsmethode kann die Histidin-Kinase mit einer

Reinheit von > 90 % hergestellt werden. Die Ausbeute des CheA beträgt nach der Aufreinigung etwa 2,3 mg/L Zellkultur.

3.1.12 Klonierung des *E. coli* Tar-Rezeptors

Für den Phosphorylierungs-Assay wird der Tar-Rezeptor als positive-Kontrolle benötigt. Zu diesem Zweck muss das Protein kloniert, exprimiert und aufgereinigt werden.
Bei der Klonierung muss die interne *Nde*I-Schnittstelle im MCP2-Gen mutiert werden, damit diese am Anfang des Gens eingebaut werden kann. Die Mutation der *Nde*I-Schnittstelle erfolgt mittels der „Overlap Extension Methode“ (s. 2.5.9). Das Tar-Gen-Fragment wird aus dem Vektor pDV4 amplifiziert. Die Sequenz beginnt am Anfang des Gens mit gleichzeitiger Einführung einer *Nde*I-Schnitstelle und endet an der Mutationsstelle der internen *Nde*I-Schnittstelle. Der zweite Teil des Tar-Gens wird aus dem Vektor pUCBM20_Tar-Teil_Mut_NdeI amplifiziert. Diese Sequenz beginnt an der Mutationsstelle und endet an der eingeführten *Hind*III-Schnittstelle im Tar-Gen. Beide Teile dienen nun als Matrize für die Ligations-PCR. Das entstandene PCR-Produkt wird mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Hind*III geschnitten und kann anschließend in den Vektor pET27b^{+} ligiert werden. Eine folgende Sequenzierung überprüft die Korrektheit der Sequenz. Anschließend wird das Tar-Gen wieder durch die beiden Enzyme *Nde*I und *Hind*III aus dem pET-Vektor ausgeschnitten und in den Vektor pTrc-99A ligiert. Die Plasmidkarten der resultierenden Vektoren sind in Abbildung 3.1.33 dargestellt.

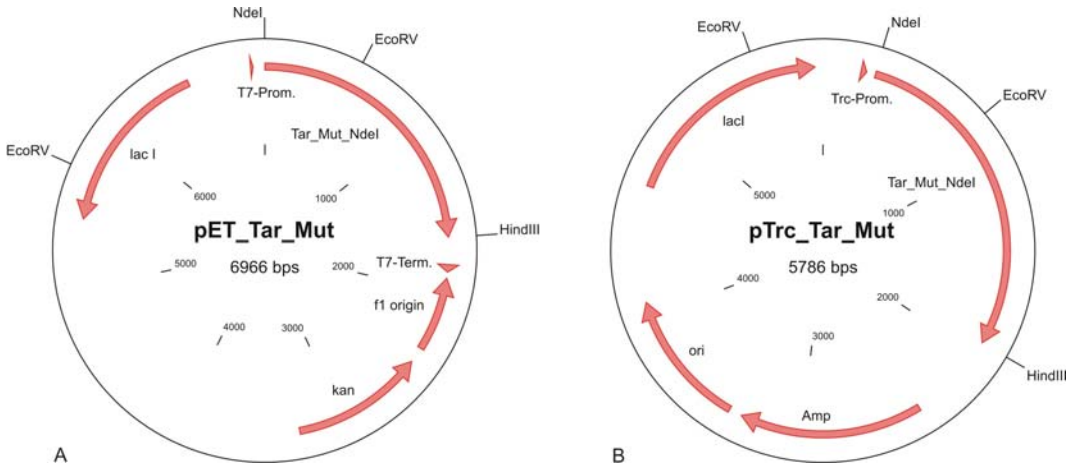


Abb. 3.1.33 Plasmidkarten des pET_Tar_Mut (A) und des pTrc_Tar_Mut (B).

3.1.13 Expression und Aufreinigung des Aspartat-Rezeptors

Zur Expression des Aspartat-Rezeptors wird das pTrc_Tar_Mut Plasmid in den Expressionstamm *E. coli* HCB721 (s. 2.3) transformiert. In diesem Stamm sind alle Chemorezeptoren und der Aerotaxisrezeptor deletiert. Die Expression erfolgt wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben und die anschließende Aufreinigung des Tar-Rezeptors wird nach der Methode von Borkovich *et al.* und von Chen *et al.* (Borkovich *et al.*, 1989;Chen & Koshland, 1995) durchgeführt (s. 2.6.2). Nach der Membranpräparation erfolgt die Aufreinigung des Rezeptors. Das solubilisierte Proteingemisch wird dabei über eine Säule mit ω-Aminoocty-Agarose aufgetrennt. Es werden jeweils Fraktionen mit 3,4 ml gesammelt und auf SDS-Gelen (Abb. 3.1.34) analysiert.

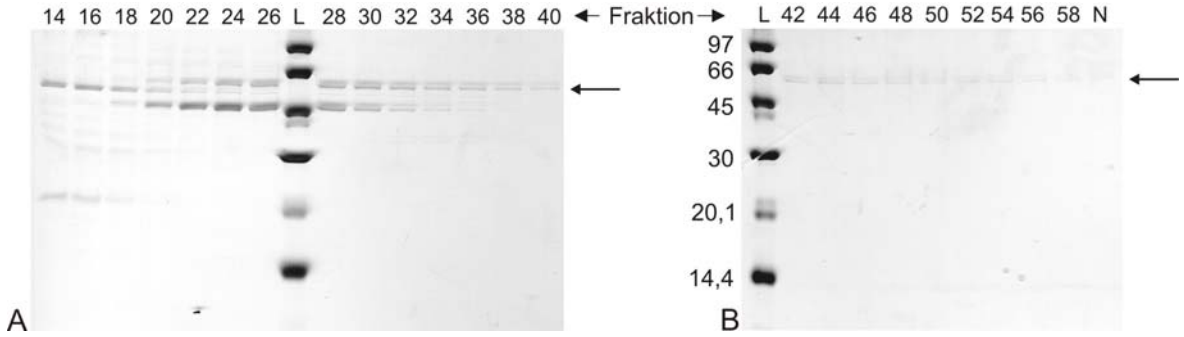


Abb. 3.1.34: SDS-Polyacrylamid-Gele der FPLC-Säule der Tar-Aufreinigung.
Gel A: Fraktionen 14 - 40 in 2er Schritten; L: LMW-Standard.
Gel B: L: LMW-Marker; Fraktionen 42 - 58 in 2er Schritten; N: Nachspülen der Säule.
Der LMW-Standard ist in kDa angegeben. Die Pfeile markieren den Tar-Rezeptor.

Auf dem SDS-Gel ist sichtbar, dass die Fraktionen 14 - 18 mehrere Proteinbanden enthalten, wobei die beiden am stärksten vertretenden Banden bei einem ungefähren Molekulargewicht von 22 und 54 kDa liegen. Erst ab Fraktion 18 wird eine neue Bande bei ca. 46 kDa sichtbar, die jedoch nur bis zu der Fraktion 38 vorhanden ist. Bei diesen Proteinbanden handelt es sich um *E. coli* eigene Membranproteine. Das Tar-Protein wird ab der Fraktion 20 deutlich auf der Höhe seines kalkulierten Molekulargewichts von 60 kDa sichtbar. Die Fraktionen 19 – 39 werden als eine unsaubere Tar-Fraktion zusammengefügt und bei -80°C gelagert. Die Fraktionen 40 - 58 mit der anschließenden Spül-Fraktion (N) werden vereinigt und nach Zugabe von 50 % Glycerin bei -20°C gelagert. Der Tar-Rezeptor hat eine Reinheit von > 95 %, die Ausbeute beträgt ~ 0,5 mg/L Zellkultur.

3.1.14 Umklonierung der Chimären in den pTrc-99A Vektor für den *in vivo* Schwimmversuch

Zur Drchführung des *in vivo* Schwimmversuchs muss eine Umklonierung der Gene durchgeführt werden, da das Gen der jeweiligen Chimäre nur auf einem pET-Vektor existiert und da die Expression bzw. das Schwimmverhalten im *E. coli* RP437wt Stamm untersucht wird. Bei diesem Stamm handelt es sich um einen Wildtyp-Stamm, der keine T7-Polymerase besitzt, sondern nur *E. coli* eigene Polymerasen zur Transkription verwenden kann. Deshalb werden die Chimären-Gene aus dem pET-FP Vektor durch die Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Hind*III wieder herausgeschnitten und sollen in den pTrc-99A Vektor ligiert werden, da dieser einen pTrc-Promotor besitzt.

Der pTrc-99A Vektor muss allerdings vor der Ligation mit den Fusionsprotein-Genen modifiziert werden. Zunächst wird die *Nde*I-Schnittstelle im Vektor entfernt. Da der Vektor nur eine Gesamtgröße von 4176 bp hat, wird zur Mutation der *Nde*I-Schnittstelle das „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (s. 2.5.9) verwendet. Bei dieser Methode wird das gesamte Plasmid mit Hilfe der beiden Mutationsprimer (s. Kapitel 9) in einem Schritt amplifiziert. Der entstandene pTrc_mut_NdeI_weg Vektor wird durch Sequenzierung auf eventuelle Fehler überprüft. Nach positiver Auswertung erfolgt der zweite Schritt der Modifizierung des Vektors. Dieser beinhaltet die Mutation der *Nco*I-Schnittstelle in eine *Nde*I-Schnittstelle. Die Durchführung dieser Änderung wird ebenfalls mit Hilfe des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ ausgeführt. Als Matrize dient der hergestellte Vektor pTrc_mut_NdeI_weg. Eine Plasmidkarte des modifizierten Plasmides pTrc_mut_NdeI_NcoI-NdeI, welches durch Sequenzierung überprüft worden ist, ist in Abbildung 3.1.35 A dargestellt.

Die geschnittenen Chimären werden nun in den durch die Enzyme *Nde*I und *Hind*III geschnittenen Vektor pTrc_mut_NdeI_NcoI-NdeI ligiert. Als Beispiel ist in der Abbildung 3.1.35 B die Plasmidkarte des Fusionsproteins a dargestellt.

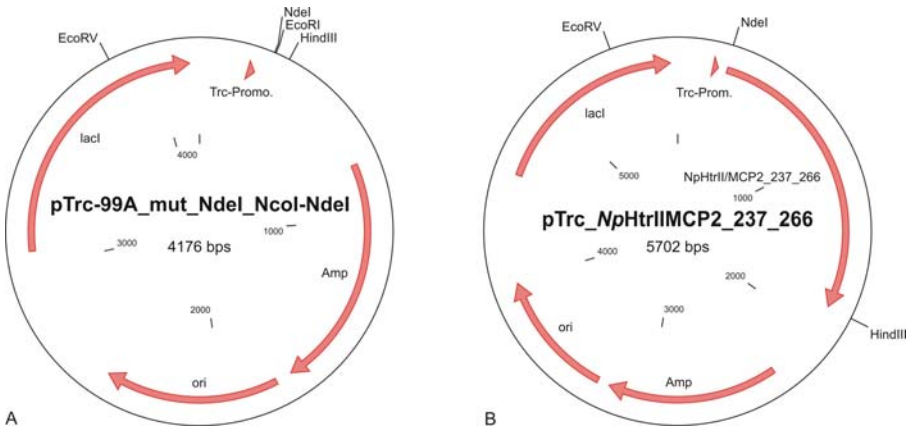


Abb. 3.1.35: Plasmidkarten des Vektors pTrc_mut_NdeI_NcoI-NdeI (A) und des Vektors pTrc_*Np*HtrIIMCP2_237_266 (B).

3.1.15 Testexpressionen im RP437wt Stamm

Der *E. coli* RP437 Stamm ist Wildtyp für die Chemotaxis, d. h. er besitzt alle entsprechenden Gene. Für den Schwimmversuch werden die entwickelten Plasmide pTrc_*Np*HtrIIMCP2 mit den jeweiligen Fusionsproteinen und das Plasmid pSM_CT_pTrcNpSRII_a, das von Hippler-Mreyen (Hippler-Mreyen, 2003a) hergestellt wurde, in diesen Stamm transformiert. Der pSM_CT_pTrcNpSRII_a Vektor enthält das *Np*SRII-Gen unter der Kontrolle des Trc-Promotors. Zusätzlich besitzt er eine Tetrazyklin- und eine Chloramphenicol-Resistenz, einen C-terminalen His-Tag am *Np*SRII-Gen und einen p15A Replikationsursprung. Durch den unterschiedlichen Origin im Grundvektor der beiden Gene, *Np*SRII und Fusionsprotein, sind beide Plasmide zueinander kompatibel.

Um vor dem eigentlichen Phototaxis-Experiment zu testen ob beide Proteine exprimiert werden, wird hier als Beispiel an Hand des Fusionsproteins a eine Testexpression beschrieben. Die Zellen werden bei 30° und 120 – 150 rpm auf eine OD_{578nm} von ≈ 1 - 1,5 angezogen und anschließend mit 0,1 M IPTG und 10 µM Retinal, als Chromophor für den Rezeptor, induziert. Nach 2,5 h weiterer Inkubation erfolgt die Zellernte durch Zentrifugation. Während der Expression werden 1 ml Zelllösungen für eine SDS-Gel-Analyse vor der Induktion und 30, 90 und 150 min nach der Induktion abgenommen. Zusätzlich wird eine zweite Kultur als negativ-Kontrolle angezogen, die wie die erste Kultur behandelt wird, nur dass diese nicht mit IPTG und Retinal induziert wird. Die Expressionsproben werden pelletiert und in 100 µl 2 x SDS-Probenpuffer (s. 2.7.1) resuspendiert. Eine SDS-Gel-Analyse dieser Proben ergibt folgendes Bild (Abb. 3.1.36).

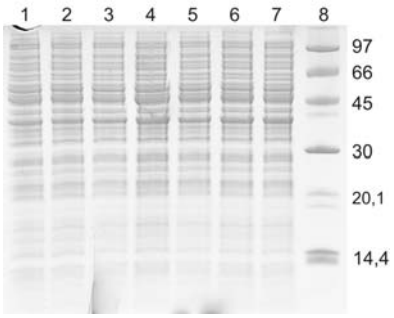


Abb. 3.1.36: SDS-Polyacrylamid-Gel der Expressionsuntersuchung des *E. coli* RP437 Stammes mit den beiden Plasmiden pSM_CT_pTrcNpSRII_a und pTrc_*Np*HtrII-MCP2_237_266. Spur 1: Zelllösung vor Induktion; 2-7: Zelllösungen nach der Induktion mit 2: K-30'; 3: I-30'; 4: K-90'; 5: I-90'; 6: K-150', 7: I-150'.
K = nicht induzierte Probe, I = induzierte Probe. 8: LMW-Standard in kDa.

Alle Expressionsproben, sowohl die induzierten, als auch die nicht induzierten Proben sehen auf dem SDS-Gel vollkommen identisch aus. Es ist keine deutliche Überexpression einer Proteinbande sichtbar. Zur Überprüfung, ob dennoch das Rezeptor-Molekül und die Chimäre

exprimiert werden, wird eine Western Blot Analyse durchgeführt. Eine Membran wird mit einem His-Tag Antikörper entwickelt, der das *Np*SRII identifiziert und der zweite Blot wird mit Hilfe eines *Np*HtrII-spezifischen Antikörpers, dessen Paratop sich gegen die AS 77 – 149 des *Np*HtrII richtet (Wegener, 2000), inkubiert. Es werden zwei identische Gele mit der gleichen Auftragung wie Abbildung 3.1.36 hergestellt, von denen die Proteine auf die Membran geblottet werden. Die Entwicklung der Blots ist in Abbildung 3.1.37 dargestellt.

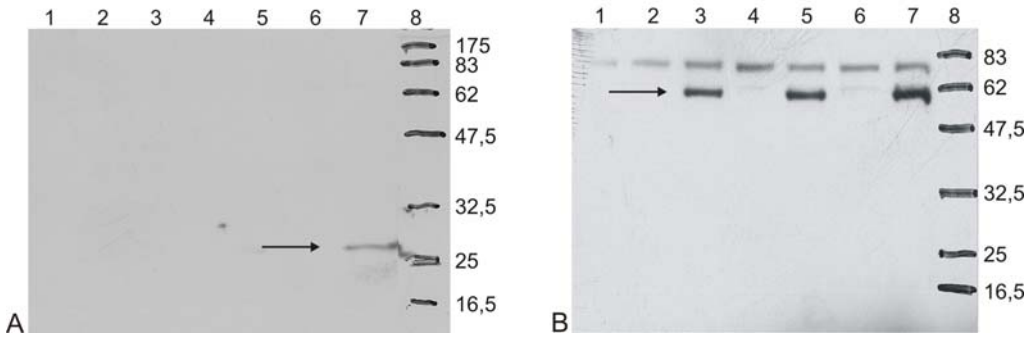


Abb. 3.1.37: Immunologischer Nachweis der Expressionsproben der Chimäre a und des *Np*SRII im RP437 Stamm durch Western Blot mit Hilfe des His-Antikörpers (A) und des *Np*HtrII-Antikörpers (B). Spur 1: Zelllösung vor Induktion; 2-7: Zelllösungen nach der Induktion mit 2: K-30'; 3: I-30'; 4: K-90'; 5: I-90'; 6: K-150', 7: I-150'. K = nicht induzierte Probe, I = induzierte Probe. 8: Prestained Proten Marker in kDa.

Der Blot mit dem Anti-His (Gel A) zeigt lediglich 2,5 h nach der Induktion eine schwache Bande (Spur 7, Pfeil). Die Größe des Proteins stimmt gut mit dem apparenten Molekulargewicht von 26,93 kDa des *Np*SRII-Rezeptors überein. Alle nicht induzierten Proben, also die negativen Kontrollen (Spuren 2, 4 und 6), zeigen keine Expression des Rezeptors. Im Gegensatz dazu lässt sich im zweiten Blot (B), der mit einem *Np*HtrII-Antikörper entwickelt wird, in allen Spuren eine Bande bei ca. 75 kDa erkennen. Da diese Bande auch in der Probe vor der Induktion vorkommt, handelt es sich wahrscheinlich um eine Kreuzreaktion mit einem *E. coli* eigenem Protein, eventuell den Chemorezeptoren, da sie eine schwache Sequenzhomologie zu dem Paratop zeigen. Zusätzlich lassen sich auf dem Gel B bei zwei Kontrollen, der 90 min (Spur 4) und der 150 min (Spur 6) Probe nach Induktion, eine schwache Bande erkennen. Dieses kann von einer schwachen Basalexpression des RP437 Stammes herrühren. Deutlich ist die Überexpression in den induzierten Proben sichtbar (Spuren 3, 5 und 7, s. Pfeil). Demnach werden beide Proteine, sowohl das *Np*SRII als auch die Chimäre exprimiert und daher können diese Stämme für die folgenden Phototaxis Experimente eingesetzt werden.

3.1.16 Umklonierung der Fusionsproteine und des *Np*SRII-Rezeptors auf einen Vektor

An Hand dieser Ergebnisses (s. 3.1.15) wird deutlich, dass die beiden Proteine, *Np*SRII und Chimäre, zusammen erst nach 2,5 h Stunden Inkubation in der Zelle detektierbar exprimiert werden. Auf Grund der unterschiedlichen Expressionsraten werden beide Proteine gemeinsam auf einen Vektor kloniert, um eine 1:1 Expression zu garantieren.
Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Umklonierung der Plasmide durchgeführt werden. Die Klonierungsstrategie sieht folgendermaßen aus. Das *Np*SRII-Gen wird in Kombination mit dem Trc-Promotor aus dem Vektor pSM_CT_pTrcNpSRII_a mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Die dazu verwendeten Primer (s. Kapitel 9) führen gleichzeitig vor den Promotor eine *Eco*RI-Schnittstlle ein und am C-Terminus des Gens eine *Sac*II-Schnittstelle. Nach der folgenden Restriktion des PCR-Produktes mit den beiden Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Sac*II wird es in den ebenfalls mit *Eco*RI und *Sac*II geschnittenen Vektor pACYC184 (s. 2.3) ligiert. Das entstandene Plasmid pACYC_pTrc_*Np*SRII (Abb. 3.1.38 A) wird durch Sequenzierung auf eventuelle Fehler während der PCR überprüft. In einem weiteren Schritt wird dieser Vektor mit der Restriktionsendonuklease *Tat*I geschnitten, so dass er linearisiert wird. Gleichzeitig werden die Gene für die Fusionsproteine ebenfalls mit *Tat*I aus dem jeweiligen Vektor pTrc-FP herausgeschnitten. Durch diese Restriktion entsteht ein Fragment, das neben der Chimäre den Trc-Promotor und das *Lac*I-Gen enthält. Eine Ligation dieses Fragmentes mit dem linearisierten pACYC_pTrc_*Np*SRII Vektor ergibt ein Plasmid, das sowohl den Rezeptor *Np*SRII unter der Kontrolle des Trc-Promotors, als auch das Fusionsprotein hinter dem Trc-Promotor enthält. Die Abbildung 3.1.38 B zeigt die Plasmidkarte pACYC_pTrc_*Np*SRII-pTrc-FP-a der Chimäre a als Beispiel.

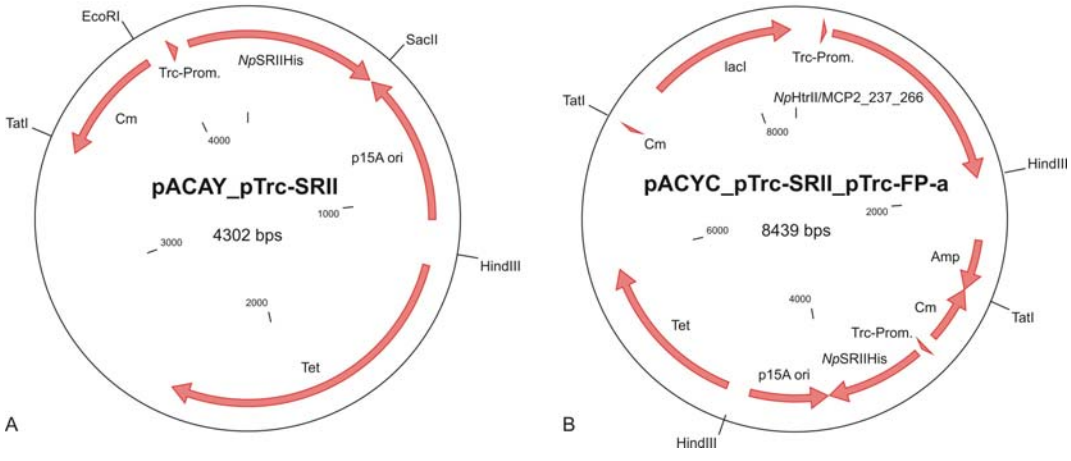


Abb. 3.1.38: Plasmidkarten des pACYC_pTrc_*Np*SRII Vektor (A) und des pACYC_pTrc_*Np*SRII-pTrc-FP-a Vektors. Die Plasmidkarten der anderen fünf Chimären a – e sehen entsprechend aus.

3.2 Untersuchungen zur *Np*HtrII Struktur und Rezeptor -Transducer - Bindung

In dieser Arbeit werden erstmalig Experimente mit einem vollständigen *Np*HtrII-Konstrukt durchgeführt.

3.2.1 Gelfiltrations-Analysen des *Np*HtrII

Zur Charakterisierung möglicher oligomerer Formen des *Np*HtrII Moleküls wird eine Größenausschluss-Chromatographie mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule durchgeführt (s. 2.7.5). Die optimale Trennleistung der Säule liegt im Bereich von 10.000 – 600.000 Da mit einem linearen Bereich bis ca. 1300 kDa. Abbildung 3.2.1 zeigt die Trennleistung der Säule mit zwei gemischten Gelfiltrations-Standards (LMW und HMW, s. 2.7.5).

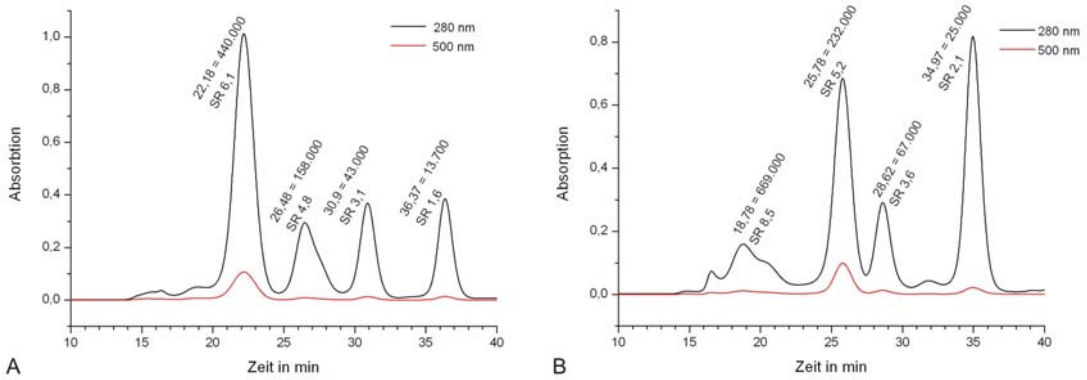


Abb. 3.2.1: Chromatogramme der Gelfiltrations-Standards der HPLC Gelfiltration mit Angaben der Elutionszeit (min), dem Molekulargewicht (kDa) und dem Stokes Radius (SR, nm).
A: Run-1: Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Ribonukleasea A (13,7 kDa);
B: Run-2: Thyroglobulin (669 kDa), Catalase (232 kDa), Albumin (67 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa).

Aus den Retentionszeiten der Abbildung 3.2.1 beider Chromatogramme lässt sich in der halblogarithmischen Darstellung eine Eichgerade konstruieren, da die Retentionszeit spärischer Makromoleküle umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht ist. Es werden für das Molekulargewicht zwei verschiedene Eichgeraden entwickelt, wobei die erste Auftragung das Molekularwicht in logarithmischer Darstellung gegen die entsprechenden Elutionzeiten der

Standardproteine setzt. Die zweite Auftragung wird entsprechend unter Berücksichtigung des Ausschlussvolumens nach folgender Formel berechnet:

$$K_{av} = \frac{Ve - Vo}{Vc - Vo} \qquad \text{(Amersham Bioscience)}$$

Ve = Elutionsvolumen der Proben-Peaks, Vo = Ausschlussvolumen, Vc = Säulenvolumen. Der K_{av}-Wert wird gegen den Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen. Aus den ermittelten Werten beider Eichgeraden wird ein Mittelwert gebildet, um ein ungefähres Molekulargewicht für die einzelnen Protein-Peaks zu erhalten.

Gelfiltration des NpHtrII

Das Chromatogramm für den solubilisierten Transducer ist in Abbildung 3.2.2 dargestellt.

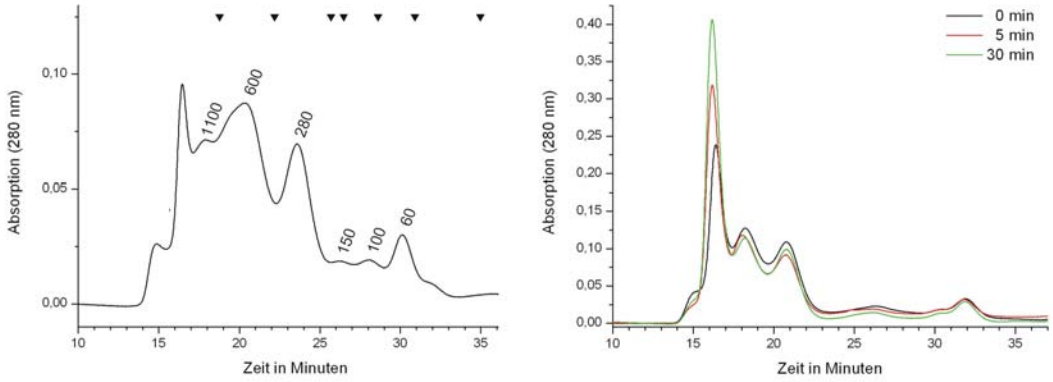


Abb. 3.2.2: Chromatogramme des *Np*HtrII.
Links: RT und 0 Minuten Inkubation. Pfeilspitzen deuten die Retentionszeiten der Standardproteine an. Molekulargrößen sind in kDa angegeben.
Rechts: Zeitabhängigkeit der Aggregationsbildung des Transducers bei 45°C.

Das Chromatogramm (links) zeigt die Anwesenheit von mehreren verschiedenen Spezies, die verschiedenen oligomere Formen des Transducer repräsentieren. Das Ausschlussvolumen liegt bei der Retentionszeit 16,5 min, so dass dieser Peak und der erste Peak bei einer Retentionszeit von 15 min ein Molekulargewicht > 1,3 MDa haben und somit höher oligomere Komplexe darstellen. In absteigender Reihenfolge werden Peaks bei den Retentionszeiten von 17.9, 20.4, 23.6, 28.1 und 30.2 min beobachtet, die einem Molekulargewicht von jeweils ca. 1100, 600, 280, 100 und 60 kDa entsprechen. Die Werte, die im Weiteren in Klammern angegeben werden, repräsentieren die Fraktionen der jeweiligen Spezies (in %, bezogen auf die gesamte betrachtete Fläche), die durch einen Gauss'schen Fit bestimmt werden. Die 1100 kDa Fraktion eluiert mit einem schmalen Peak (29 %), gefolgt von einer Spezies mit einem breitem Peak bei ca. 600 kDa (43 %). Eine andere Spezies folgt gut separiert mit einem starken Peak bei 280 kDa (16 %). Kleinere Fraktionen eluieren bei Volumina, die einem Molekulargewicht von 100 kDa (< 1 %) und 60 kDa (3 %) entsprechen.

Um die Form der Proteine zu berücksichtigen kann bei Gelfiltrations-Analysen der Stokes Radius (Hydrodynamischer Radius) anstelle des Molekulargewichtes als beschreibende Größe verwendet werden. Dieser beschreibt den Radius einer festen Kugel, die dieselben Diffusionseigenschaften besitzt wie das dazugehörige Molekül. Meistens ist der Stokes Radius geringer als der effektive Radius des Moleküls, da diese überwiegend keine perfekten Kugeln bilden. Im Falle des *Np*HtrII-Molekül und seiner entsprechenden Multimere, sind „rod-like" Strukturen durch die hohe Homologie zu den Chemorezeptoren zu erwarten, so dass die aus den Retentionszeiten gewonnenen Molekulargewichte nicht notwendigerweise mit den wirklichen Massen (MW *Np*HtrII-Monomer: 57,91 kDa) korreliert werden können (Brownleader *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 2005). Aus diesem Grund werden die Stokes Radii der verschiedenen Transducer-Spezies auf Grundlage einer Eichkurve der Standardproteine bestimmt. Für die entsprechenden oben genannten Peaks werden folgende Radii ermittelt: 8.1, 7.1, 6.0, 4.4 und 3.6 mit einer Abweichung von ± 0.5 nm. In Gelfltrations-Studien am *E. coli* Tar-Rezeptor wurde ein apparentes Molekulargewicht von 248 kDa mit einem entsprechendem Stokes Radius von 5.6 nm für den in Octylglucoside (OG) solubilisierten Aspartat-Rezeptor gefunden (Foster *et al.*, 1985). In anderen Untersuchungen mittels Sukrose-Dichte-Zentrifugation wurde ein Stokes Radius von 5,4 nm für den Tar-Rezeptor bestimmt, was zu einem, mit Hilfe des Stokes Gesetzes, berechneten Molekulargewicht von 122 kDa führt (Milligan & Koshland, Jr., 1988). Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem Rezeptor-Dimer (60 kDa pro Monomer). Auf Grund der strukturellen und funktionellen Homologie zwischen dem Transducer und den Chemorezeptoren kann die Annahme gemacht werden, dass *Np*HtrII ebenfalls als Dimer mit einer ähnlichen Form vorkommt. Deshalb könnte es sich bei der Spezies, die mit einem Stokes Radius von 6.0 nm (280 kDa) eluiert, um ein Transducer-Dimer handeln (im Vergleich zu 248 kDa von Tar, s. o.), obwohl der theoretisch berechnete Wert eines Dimers bei ca. 170 kDa liegt. Das Tar-Rezeptor-Dimer eluiert bei den Gelfiltrationsexperimenten ebenfalls mit einem höheren Molekulargewicht, als das theoretisch berechnete. Der höher ermittelte Wert des Transducers (6.0 nm im Gegensatz zu 5.6 nm) kann wie folgt erklärt werden. Zwar besitzt der *Np*HtrII keine Ligandenbindungs-Domäne, die ca. 8 nm lang ist, aber stattdessen ist die zytoplasmatische Domäne um ~ 100 Aminosäuren, die die zweite HAMP-Domäne enthält, länger als der Tar-Rezeptor. Daher kann von einer gleichen Länge beider Proteine ausgegangen werden. Zudem ist der Transducer in DDM solubilisiert anstatt in OG. DDM bildet eine Mizelle mit einer ungefähren Größe von 50 kDa, im Gegensatz zu OG, dessen Mizellengröße ca. 7 kDa beträgt. Deshalb kann auch eine größere gebundene Menge an Detergenz am Transducer-Dimer erwartet werden.

Basierend auf dieser Zuordnung des Transducer-Dimers müssen die Spezies mit kleineren Stokes Radii entweder Monomere darstellen und/oder fehlgefaltetes Protein. Die Fraktion bei einem Molekulargewicht von 60 kDa könnte dem Transducer Monomer zugeordnet werden. Unter der Annahme, dass der Transducer in nativer Form Dimere bildet, könnte vermutet werden, dass ein Monomer wahrscheinlich in denaturierter Form vorkommt. Deshalb könnte der 60 kDa Peak

einer unstrukturierten Form entsprechen, da es sonst wahrscheinlich zu höheren Molekulargewichten verschoben wäre. Über die in Spuren vorkommende andere Spezies bei 4.4 nm (100 kDa) kann nur spekuliert werden, dass sie entweder einem fehlgefalteten Dimer oder einem teilweise gefalteten Monomer entspricht. Jedoch hat diese Fraktion nur einen Anteil von < 1% am Gesamtprotein in der Probe.
Die Spezies bei einem Stokes Radius von 7.1 nm (600 kDa) stellt die Hauptkomponente dar (43 %). Es könnte sich hierbei, ausgehend von einer parallelen Anordnung der Transducer-Dimere im Vergleich zu den Chemorezeptoren (Francis *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 1999), um eine „Trimer of Dimer" Formation handeln. Der Peak bei einem Stokes Radius von 8.1 nm müsste nicht näher bestimmbaren höheren Oligomeren entsprechen.
Die ITC-Experimente (s. u.) werden bei 45°C durchgeführt. Deshalb sollte die Oligomerbildung und die Zeitabhängigkeit auch unter diesen Bedingungen untersucht werden. Aus den Egebnissen dieser Gelfiltrations Experimente kann eine Zunahme der relativen Menge des Ausschlusspeaks (Abb. 3.2.2, rechts) beobachtet werden. Dieses deutet auf eine Zeitabhängigkeit des Systems hin, bei der die Formung der Cluster bzw. höherer Aggregate einen langsamen Prozess darstellt.

Gelfiltration des NpSRII

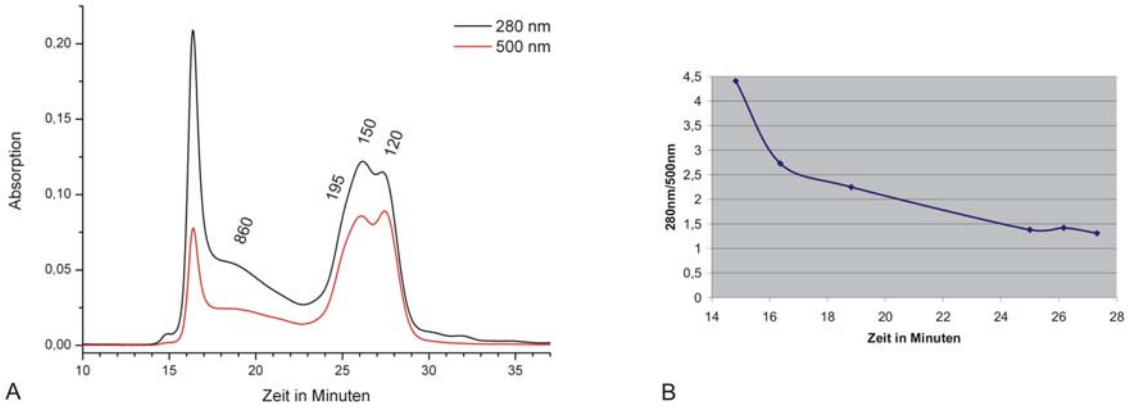


Abb. 3.2.3: A: Chromatogramm des *Np*SRII gemessen bei den Wellenlängen 280 nm und 500 nm. Molekulargewichtsangaben sind in kDa angegeben.
B: Auftragung des Reinheitsquotienten von 280 nm / 500 nm gegen die Zeit der einzelnen Peaks des *Np*SRII Chromatogramms.

Das Chromatogramm (Abb. 3.2.3) des solubilisierten *Np*SRII zeigt sechs Peaks, wobei es sich bei dem Ersten und Zweiten erneut um Protein-Aggregate handelt, die im Ausschlussvolumen mit einem Molekulargewicht > 1,3 MDa eluieren. Die Schulter bei ~ 860 kDa stellt wahrscheinlich oligomere Formen des *Np*SRII dar. Jedoch läst sich aus dem 500/280 nm Verhältnis (ca. 2,25, optimales Verhältis: 1,21) feststellen, dass es sich teilweise um eine denaturierte Form handelt, die vielleicht durch Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial zustande kommen könnte, da das

in diesem Versuch verwendete *Np*SRII ein 500/280 nm Verhältnis von ca. 1,3 aufweist. Zusätzlich ist aus früheren Arbeiten deutlich, dass das *Np*SRII in Detergenzien wie DDM stabil ist.

Die Abbildung 3.2.3 B zeigt die berechnete Reinheit des *Np*SRII in den einzelnen Peaks. Drei weitere Fraktionen mit einer relativ hohen Absorption bei 500 nm werden bei apparenten Molekulargewichen von ~ 195 kDa (nur andeutungsweise als Schulter sichtbar), ~ 150 kDa und ~ 120 kDa beobachtet. Die Spezies bei 195 kDa und 120 kDa scheinen eine dimere und eine monomere Form des funktionellen *Np*SRII zu repräsentieren. Dies ergibt sich durch Betrachtung des Verhältnisses der Absorptionen bei 280 und 500 nm, welche bei der 120 kDa Spezies 1,31 (92 % funktionell) und bei der 195 kDa Fraktion 1,38 (88 % funktionell) beträgt. Das ungewöhnlich hohe apparente molekulare Gewicht ist durch die große DDM Mizelle und die daraus resultierende scheibenförmige Gestalt des Protein-Detergenz-Komplexes zu erklären. Die letzte Fraktion bei 150 kDa könnte vermutlich einem denaturierten Monomer entsprechen, der wahrscheinlich eine länger gestreckte Konformation aufweist, so dass das scheinbare Molekulargewicht größer würde.

Gelfilration des 1:1 NpSRII/NpHtrII Komplexes

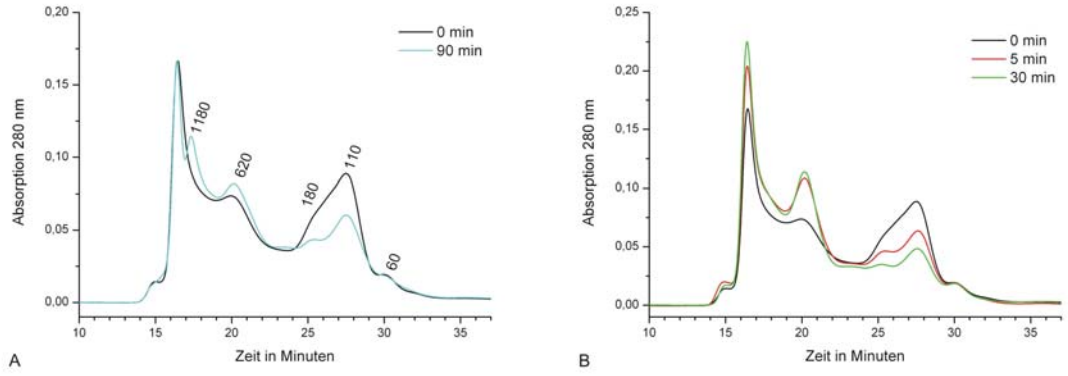


Abb. 3.2.4: Gelfiltrationschromatogramme des 1:1 *Np*SRII/*Np*HtrII Komplexes. Die Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Es wird gleichzeitig die Zeitabhängigkeit des Komplexes bei Raumtemperatur (A), als auch bei 45°C untersucht (B).

Es lässt sich, wie bei allen anderen Chromatogramen, die Aggregat-Peaks (~ 15 und 16 min) erkennen. Im Vergleich zu dem Chromatogramm des *Np*HtrII sind die Spezies, die zum Einen das Transducer-Dimer bei einem Molekulargewicht von 280 kDa und zum Anderen eine oligomere Form bei 1100 kDa darstellen, hier nicht mehr sichtbar. Zusätzlich lässt sich eine kleinere Verschiebung bei der oligomeren Form mit einem molekularen Gewicht von 600 → 620 kDa (RZ 20.1, 40 %) feststellen Die 860 kDa Spezies des freien Rezeptors ist entweder auch verschwunden oder ist auf Grund seiner geringen Größe unter den anderen Peaks untergelagert.

Die Abwesenheit der Peaks des Transducer-Dimers und der oligomeren Form, als auch eventuell des *Np*SRII-Peaks bei 860 kDa, resultiert aus der Bindung des Rezeptors an den Transducer. Auch die Verschiebung zu höherem molekularen Gewicht lässt sich mit der Anwesenheit des Rezeptors erklären. Dieses wird auch durch eine Erhöhung der Absorption bei 500 nm (= λ_{max} (*Np*SRII)) für die entsprechenden Peaks im Chromatogramm nachgewiesen.
Interessant ist, dass nach einer 90 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, das 1100 kDa Transducer-Oligomer wieder erscheint, dass jedoch auch zu einem höheren Gewicht von ~ 1180 kDa (RZ 17.3, 38 %) verschoben ist. Bei dieser Spezies findet eine Zunahme von 17 % zu 38 % statt, wohingegen die Fraktion der 620 (600) kDa Spezies (43 % → 38 %) einen leichten Abfall zeigt. Die Spezies bei 180 kDa (RZ 25.4, 15 %) könnte eine Überlagerung von dem freien *Np*HtrII und dem freien *Np*SRII sein, oder ein Komplex zwischen dem 100 kDa *Np*HtrII-Peak und dem *Np*SRII-Dimer. Dagegen handelt es sich wahrscheinlich bei den Spezies um 110 kDa (RZ 27.5, 12 %) und 60 kDa (RZ 30.0, 1 %) um freies *Np*SRII bzw. *Np*HtrII, die sich teils noch überlagern, was in der anschließenden SDS-Page-Analyse (s. Abb. 3.2.7) bestätigt wird. Zusätzlich kann festgestellt werden, dass auch nach 90 minütiger Inkubationszeit noch freies *Np*SRII detektierbar ist, was darauf hinweist, dass nicht alle Transducer-Moleküle in der Lage sind an den Rezeptor zu binden.
In einer weiteren Serie von Experimenten wird die Zeitabhängigkeit der Komplexbildung bei erhöhter Temperatur von 45°C, die identisch zu der Temperatur ist, die in den ITC-Experimenten verwendet wird (s. 3.2.4), untersucht (Abb. 3.2.4 B). Mit der Zeit nimmt die Spezies bei 620 kDa (43 % → 30 %) zu und die Peaks der wahrscheinlich freien *Np*HtrII und *Np*SRII Moleküle werden kleiner (Abb. 3.2.5).

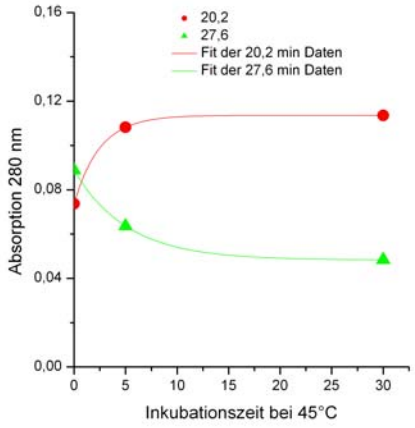


Abb. 3.2.5: Auftragung der Veränderung der Peaks bei der zeitabhängigen Messung bei 45°C.

Interessant ist auch, dass die stärkste Fraktion (ermittelt durch den Gauss' Fit) (Abb. 3.2.6) die Spezies bei 1180 kDa ist, die während der Inkubation um einen Faktor 2 zunimmt (17 % → 35 %), zu Lasten der Spezies bei 180 und 110 kDa. Die erhöhte Temperatur beschleunigt die Bildung der 1180 kDa Spezies und der 620 kDa Spezies. Zusätzlich wird aber

auch hier nicht die komplette *Np*SRII-Fraktion an den Transducer gebunden. Eine Abschätzung durch Integration der jeweiligen Flächen der Elutionspeaks bei der 500 nm Absorption ergibt ~ 43 % komplexiertes *Np*SRII direkt nach dem Mischen der Proteine, 58 % nach 5 min und 72 % nach 30 min Inkubation bei 45°C.

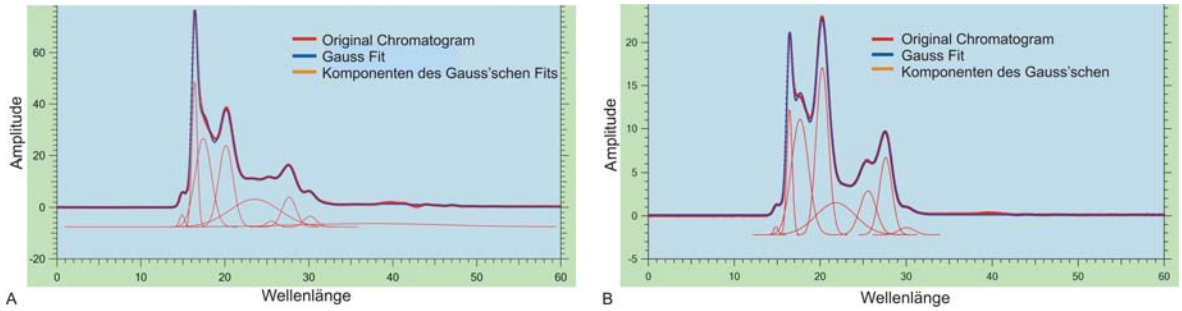


Abb. 3.2.6: Chromatogramme des 1:1 *Np*SRII/*Np*HtrII Komplexes bei 45°C und 30 min Inkubation. Zusätzlich sind die Ergebnisse des Gauss'schen Fits dargestellt. A: Chromatogramm bei 280 nm. B: Chromatogramm bei 500 nm.

Um die Zusammensetzung der Peaks zu überprüfen werden 0,5 ml Fraktionen der Läufe gesammelt und anschließend auf einem SDS-Gel analysiert. Dazu werden die Fraktionen lyophilisiert und in ~ 40 – 50 µl Puffer aufgenommen und auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 3.2.7).

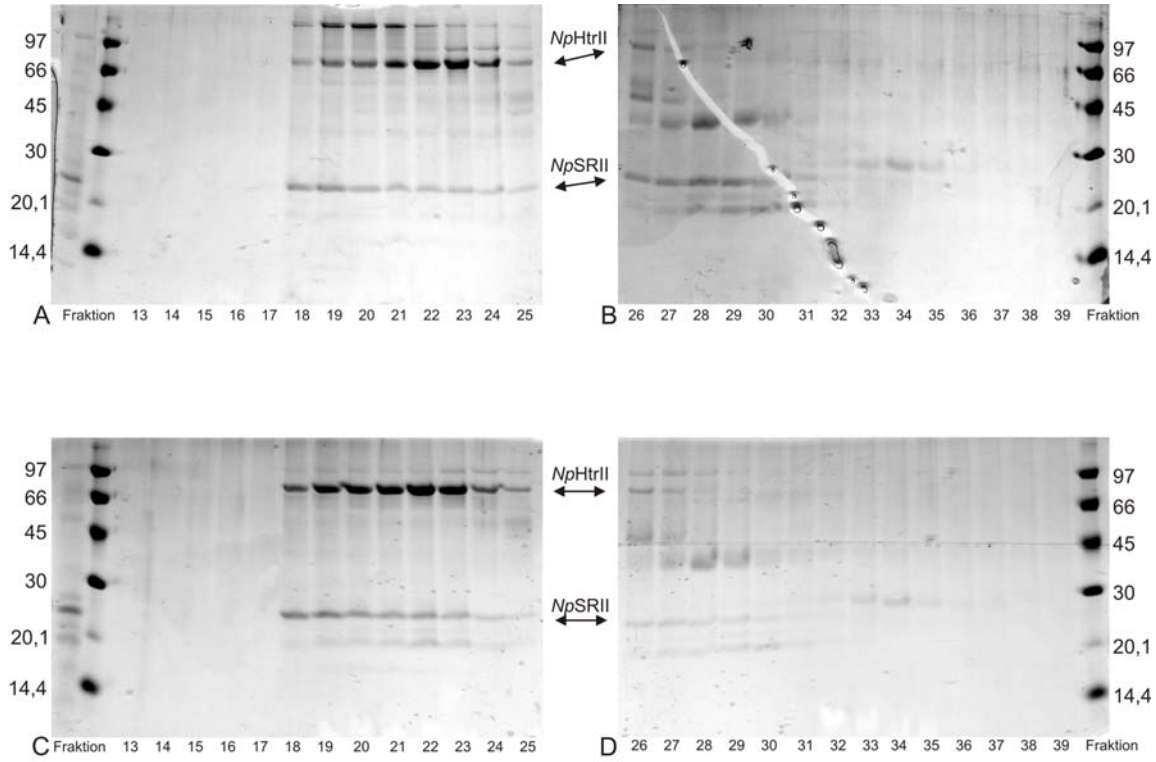


Abb. 3.2.7: SDS-Polyacrylamid-Gele der Gelfiltrations-Analysen des 1:1 *Np*SRII/*Np*HtrII Komplexes bei RT und keine Inkubation (A+B) und bei 45°C und 30 min Inkubation (C+D). Spuren 1 in Gel A+C: Auftrag auf die Säule; Spuren 2 (A+C) u. 15 (B+D): LWM-Standard. Die restlichen Spuren zeigen die jeweiligen Fraktionen der Gelfiltration. Angaben des Standards in kDa.

Die Gele A und B zeigen die einzelnen Fraktionen des Gelfiltrations-Experimentes für den 1:1 Komplex bei RT. Die Gele C und D repräsentieren die entsprechenden Fraktionen der Messung bei 45°C mit einer Inkubationszeit von 30 min. Die Spuren 1 der beiden Gele A und C zeigen den Auftrag des Komplexes auf die Säule. Zusätzlich wird auf jedem SDS-Page ein LMW-Standard aufgetragen (Spuren 2: Gel A+C; Spuren 15: Gel B+D). In den Fraktionen 13 - 17 sind keine Banden sichtbar. Erst ab Fraktion 18 lassen sich deutlich die Banden von *Np*HtrII (ca. 80 kDa) und *Np*SRII (27 kDa) erkennen (Pfeile). Auch durch das SDS werden die höheren Aggregate beider Proteine nicht zerstört (Fraktionen 18 - 26). Dagegen nimmt die Konzentration des Transducers in den Fraktionen, die kleinere Molekulargewichte repräsentieren, ab (Fraktionen 27 - 29). Woraus die 60 kDa große Spezies besteht ist schwer zu sagen, da die Bestandteile dieser Fraktionen nur schwach auf dem SDS-Gel zu erkennen sind (Fraktionen 30, 31). Durch das gemeinsame Vorkommen des *Np*SRII und des *No*HtrII in einer Fraktion kann die Bindung dieser Proteine nachgewiesen werden.

Untersuchungen zur Stöchiometrie des Komplexes

Zusätzlich werden noch Untersuchungen bezüglich der Stöchiometrie des *Np*SRII/*Np*HtrII Komplexes durchgeführt. Die Abbildung 3.2.8 zeigt die beiden Chromatogramme der 1:0,5 (*Np*HtrII : *Np*SRII) (A) und der 1:2 (*Np*HtrII : *Np*SRII) (B) Stöchiometrie. Es lassen sich keine bemerkenswerten Änderungen im Vergleich zum 1:1 Komplex (Abb. 3.2.4) feststellen, bis auf den Peak bei 620 kDa, der hauptsächlich bei einer Stöchiometrie von 1:0,5 zu beobachten ist.

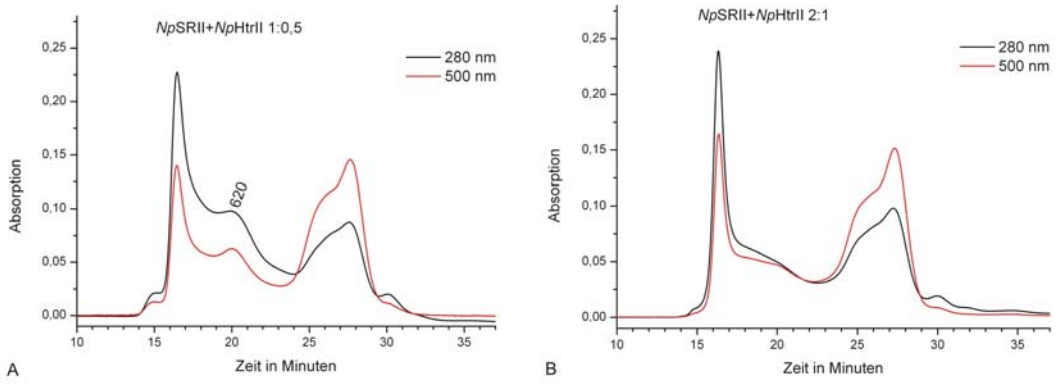


Abb. 3.2.8: Gelfiltrations-Chromatogramme des *Np*SRII/*Np*HtrII Komplexes mit den Stöchiometrien 0,5:1 (A) und 2:1 (B) bei den Wellenlängen 280 und 500 nm.

3.2.2 Circular Dichroismus Spektroskopie (CD)

Zur Analyse der Sekundärstruktur des *Np*HtrII werden von dem in DDM solubilisierten Transducer CD-Spektren aufgenommen (s. 2.8.2). Die Konzentration des Transducers in den Proben beträgt zwischen 7 und 16 µM (= 0,5 – 0,9 mg/ml). Die Spektren werden im Wellenlängen-Bereich von 260 nm bis 190 nm aufgenommen.
Abbildung 3.2.9 A zeigt das CD-Spektrum des solubilisierten *Np*HtrII-Moleküls sowohl in Salz-freien Puffer als auch in Anwesenheit von 1 M NaF.

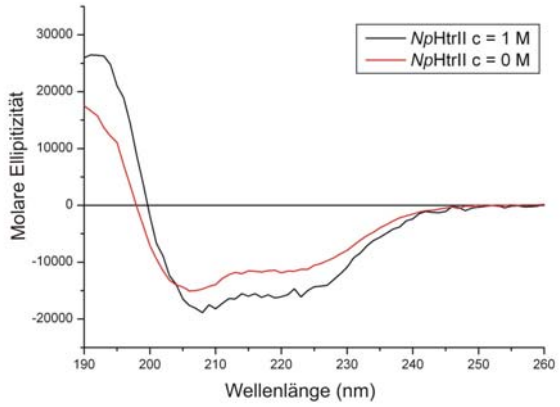


Abb. 3.2.9: CD-Spektren vom solubilisierten *Np*HtrII sowohl in Salz-freien Puffer als auch in 1 M NaF Puffer.

In Abwesenheit von Salz zeigt das CD-Spektrum ein mit hauptsächlich helikalen Anteilen versehendes Spektrum mit einem Maximum bei kleiner Wellenlänge (192 nm) und zwei Minima (207 nm und 222 nm) bei längeren Wellenlängen. Die Sekundärstruktur Vorhersagen aus den CD-Daten mittels dreier verschiedener Algorithmen (s. 2.8.2) zeigen einen α-helikalen Gehalt von 30 % an (s. Tabelle 3.2.1). Bei höherer Ionenstärke (1 M NaF) nimmt der Anteil α-helikaler Struktur zu und es wird ein Gehalt von 50 % kalkuliert. Durch die nativeren Bedingungen könnte die Struktur des Transducer verstärkt werden, die aus den Ergebnissen der ESR-Messungen (s. u.) eine hohe Dynamik in solubilisierter Form aufweist und damit durch CD-Messungen nicht vollständig greifbar ist.
Abbildung 3.2.10 repräsentiert die entsprechenden Messungen für den *Np*HtrII/*Np*SRII Komplex (1:1 Stöchiometrie).

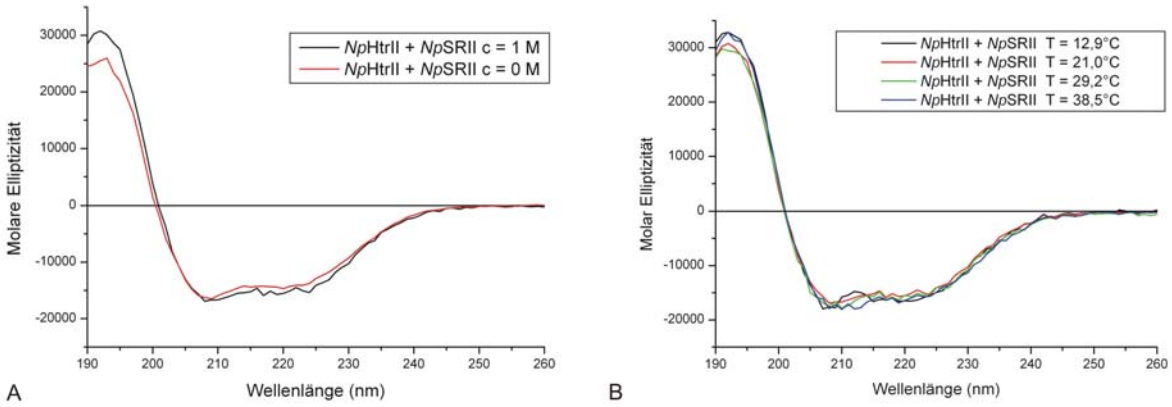


Abb. 3.2.10: CD-Spektren des solubilisierten *Np*HtrII/*Np*SRII Komplexes entweder in Salz freiem Puffer oder in 1 M NaF Puffer (A). B zeigt die Messung der Temperaturabhängigkeit des Komplexes in 1 M NaF.

Wie erwartet zeigt das CD-Spektrum des Komplexes in Anwesenheit des Rezeptors einen hohen α-helikalen Anteil an der Gesamtstruktur (Abb. 3.2.10 A). Der aus Sekundärstrukturvorhersagen berechnete theoretische α-helikale Anteil des Komplexes liegt bei ca. 78 % (*Np*HtrII: 92 %, *Np*SRII: 63 %). Ohne Salz erfährt diese Fraktion schon eine Zunahme auf 47 % nach den Algorithmen-gestützten Strukturvorhersagen. Der Effekt der höheren Ionenstärke ist weniger ausgeprägt. Es ist eine Zunahme von 5 % in der Probe mit 1 M NaF zu beobachten (s. Tabelle 3.2.1).

CD-Messungen zur Temperaturabhängigkeit der Sekundärstruktur des *Np*HtrII/*Np*SRII-Komplexes, zeigen keinen signifikanten Effekt im Bereich von 12,9°C bis 38,5°C (Abb. 3.2.10 B).

Bei den Ergebnissen der drei verschiedenen Algorithmen sollte angemerkt werden, dass die Ergebnisse für den Rezeptor-Transducer Komplex in allen drei Varianten sehr gut miteinander übereinstimmen, aber für die Analyse des Transducers große Abweichungen in den Vorhersagen bestehen (Tabelle 3.2.1).

	α-helix	β-sheet	turn	random coil
*Np*HtrII 0M	24 – 36[1]	12 - 19	19 - 23	30 - 39
*Np*HtrII 1M	44 - 54	4 - 9	13 - 18	24 - 39
complex 0M	47[2] ± 2	9 ± 2	17 ± 2	27 ± 1
complex 1M	52 ± 1	8 ± 1	15 ± 2	26 ± 1

[1] Bereich der Werte in % ermittelt durch die drei verschiedenen Algorithmen
[2] Mittelwerte der durch die drei Algorithmen ermittelten Werte

Tabelle 3.2.1: Sekundärstruktur Vorhersagen mit Hilfe von Netzwerk-basierender CD-Software.

3.2.3 Untersuchungen des Photozykluses des *Np*SRII/*Np*HtrII Komplexes

Die Kenntnis über den Photozyklus des *Np*SRII ist notwendig zum Verständnis der Reizaufnahme und der Weiterleitung an die nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade in dem System der Phototaxis. Es existieren bereits detaillierte kinetische Untersuchungen über den *Np*SRII Photozyklus (Chizhov *et al.*, 1998; Schmies *et al.*, 2000). In dieser Arbeit soll die Laserblitz-Absorptions-Spektrometrie (s. 2.8.3) genutzt werden, um den Einfluss der Bindung des Transducers an das *Np*SRII auf die Kinetik des Photozyklus des Rezeptors zu untersuchen.
Die transienten optischen Absorptionsänderungen werden bei drei indikativen Wellenlängen gemessen. Die Wellenlänge 400 nm repräsentiert die Bildung und den Zerfall des M_{400}-Intermediates, die 500 nm den Zerfall und die Rückbildung des Grundzustandes und die 540/550 nm Wellenlängen stehen für die Kinetik des $O_{540/550}$-Intermediates (Abb. 3.2.11).

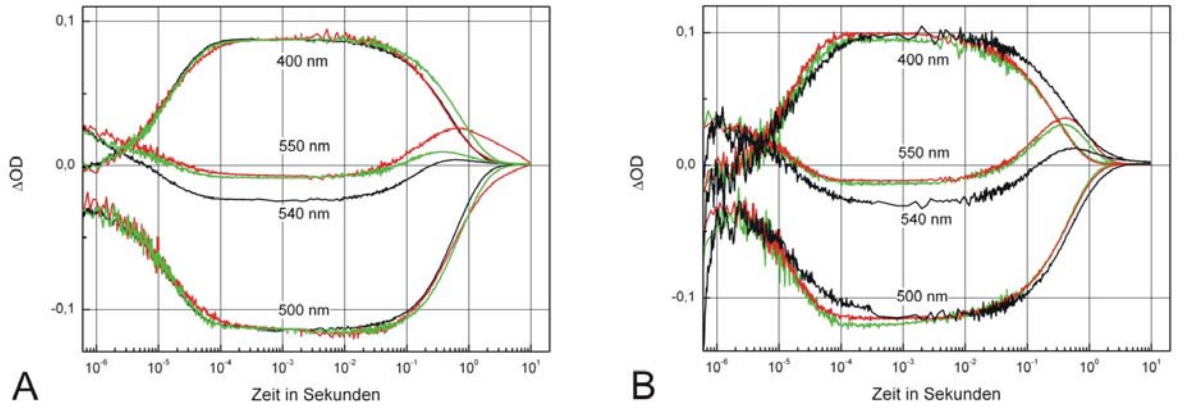


Abb. 3.2.11: Differentielle Absorptionsänderungen bei den drei indikativen Wellenlängen 400 nm, 500 nm und 540/550 nm für *Np*SRII (rot), *Np*SRII/*Np*HtrII-157 (grün) und *Np*SRII/*Np*HtrII (schwarz). Die Proben werden im solubilisierten Zustand (A) und in rekonstituierter Form gemessen.

Es werden sowohl das Rezeptor-Molekül, als auch der *Np*SRII/*Np*HtrII-157 Komplex (*Np*HtrII-157 zur Verfügung gestellt von Swetlana Martell und Annika Göppner) und der *Np*SRII/*Np*HtrII Komplex untersucht.
Abbildung 3.2.11 A zeigt die Photozyklen der drei solubilisierten Proben. In diesem Zustand findet man nur einen kleinen Effekt des verkürzten Transducers *Np*HtrII-157. Der Zerfall des M-Intermediates wird verlangsamt und des O-Intermediates beschleunigt. Dieses Verhalten wurde auch schon Klare *et. al.* (Klare *et al*., 2006) beobachtet. Im Gegensatz dazu wird kein abweichender Effekt des verkürzten Transducers im Vergleich zu der *Np*SRII-Probe im rekonstituierten Zustand beobachtet. Der *Np*HtrII zeigt jedoch einen Effekt auf das Verhalten des Photozykluses des *Np*SRII im rekonstituierten Zustand (Abb. 3.2.11 B). Dieser Effekt ist insbesondere für den M-Zerfall beobachtbar, der etwa um einen Faktor 2 in Anwesenheit des Transducers im Vergleich zu den anderen beiden Proben, verlangsamt ist.

3.2.4 Isotherme Titrations Kalorimetrie am *Np*SRII/*Np*HtrII Komplex

Theoretischer Hintergrund zur ITC-Messung

Durch Isotherme Titrations Kalorimetrie (ITC) (s. auch 2.8.5) wird die Bindung zwischen Reaktionspartnern durch Messung der Reaktionswärme die als endotherme Energie dem System zugefügt werden muss oder als exotherme Energie frei wird, bestimmt. Dabei dient als Messsignal ein Heizstrom an der Messzelle, der Temperaturdifferenzen, durch Freisetzung oder Aufnahme von Wärme, zur Referenzzelle, ausgleicht.

Aus den Messungen können direkt die folgenden Parameter bestimmt werden: Bindungsaffinität k_D, Enthalpy ΔH und Bindungs-Stöchiometrie n. Dieses geschieht durch die Integration der Flächen der einzelnen Injektionspeaks. Mit Hilfe dieser Daten kann sowohl die Entropie ΔS, als auch die freie Energie ΔG berechnet werden:

$$\Delta G = -RT\ln K = \Delta H - T\Delta S.$$

Titrationskontrollen

In einer Reihe von Experimenten wird die Bindungsaffinität des Rezeptors *Np*SRII zum Transducer *Np*HtrII durch ITC-Messungen (s. 2.8.5) untersucht. Alle Messungen erfolgen bei 45°C mit über Nacht in ITC-Puffer dialysierten Proben. Zunächst werden als erstes Kontroll-Titrationen zur Überprüfung der Mischwärmen bei der Titration zweier verschiedener Lösungen durchgeführt. Bei der ersten Messung wird der Rezeptor in unterschiedlichen Konzentrationen in ITC-Puffer titriert. Abbildung 3.2.12 A - C zeigt die entsprechenden Titrations-Kurven.

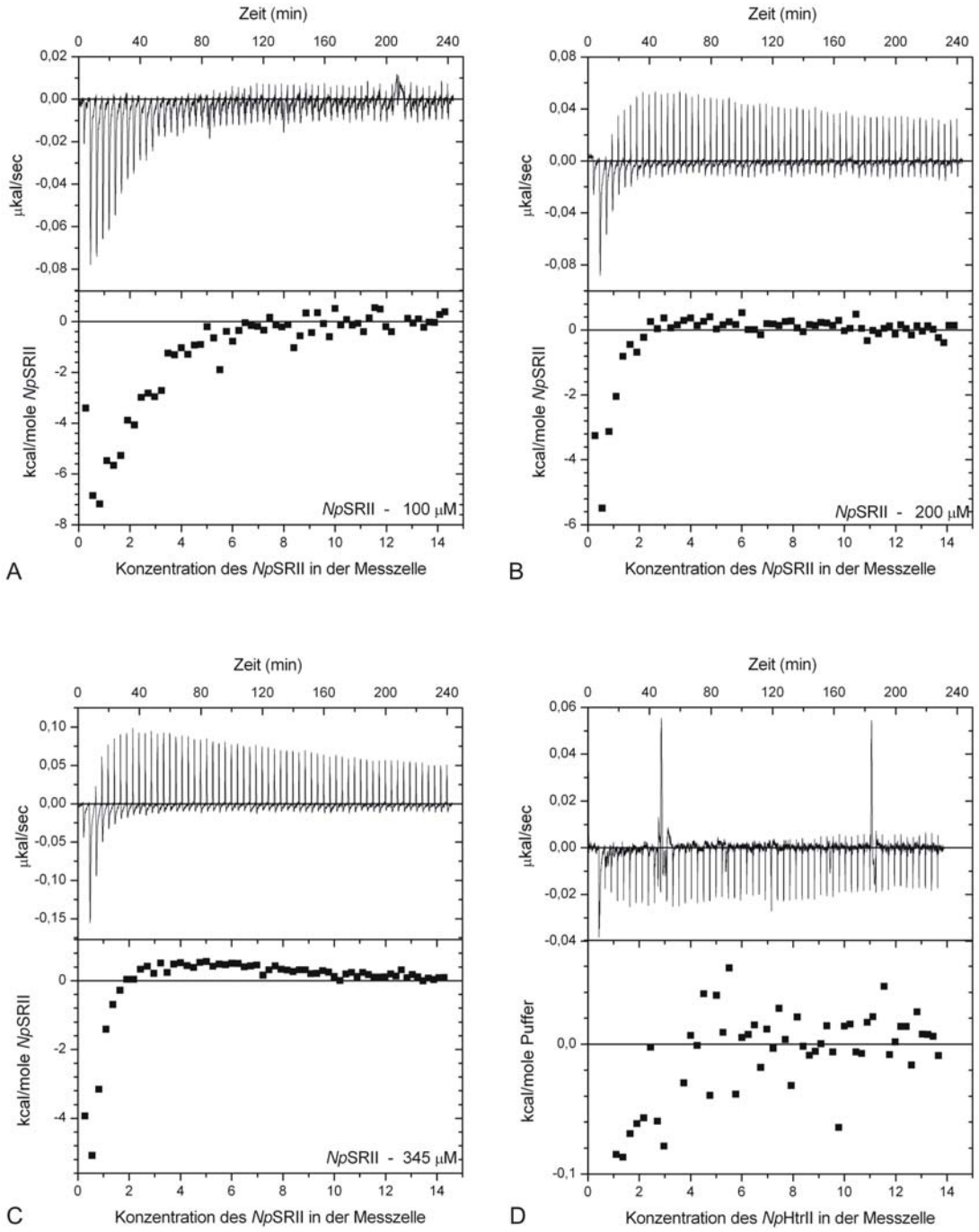


Abb. 3.2.12: ITC-Kontroll-Messungen von *Np*SRII in ITC-Puffer (A-C) mit verschiedenen Konzentrationen (A: 100 µM, B: 200 µM, C: 345 µM) und ITC-Puffer in *Np*HtrII (D). Die oberen Bereiche der Daten stellen jeweils die Basislinien-korrigierten Rohdaten dar. Im unteren Bereich sind die aus der Messkurve berechneten molaren Wärmen in Abhängigkeit von dem Titrationsfortschritt aufgetragen.

Die Kontroll-Titrationen von *Np*SRII in den Puffer lassen erkennen, dass es sich bei diesen Titrationen um Verdünnungskurven handelt. Die negativen Peaks werden mit zunehmender Injektionszahl relativ schnell kleiner und stagnieren dann etwas unter dem Nullpunkt. Auffallend ist allerdings, dass neben den negativen Peaks, die eine exotherme Verdünnungswärme

darstellen, auch positive Peaks, die entsprechend endotherme Energien repräsentieren, auftreten. Jedoch handelt es sich um schmale Peaks, die nur einen kleinen Effekt repräsentieren. Eine Auswertung der Roh-Daten liefert sowohl ohne Einbezug der positiven Peaks, als auch mit Bezug der positiven Flächen vergleichbare Ergebnisse, so dass sie vernachlässigt werden können. Zur zweiten Kontrollmessung wird ITC-Puffer aus der Spritze in die Transducer-Probe, die sich in der Messzelle befindet, titriert. Es ist kein wesentlicher Effekt erkennbar (s. Abb. 3.2.12 D). Es treten zwar negative Peaks auf, die eine endotherme Reaktion andeuten, jedoch ergibt eine Auswertung der Roh-Daten keine Verdünnungskurve. Die positiven Peaks in dieser Messung sind wahrscheinlich auf Grund eines äußeren, störenden Einflussen entstanden und können vernachlässigt bzw. aus der Wertung heraus genommen werden.

Titrationen von NpSRII zu NpHtrII

Bei den eigentlichen Titrationsversuchen, sowie den Kontrollen, liegt der Transducer, isoliert aus der Membranfraktion, in solubilisierter Form in DDM vor und wird wie das solubilisierte Rezeptor Molekül auf 45°C vorgewärmt. Folgend wird das *Np*SRII in 5 µl – 20 µl Portionen durch die Spritze zur Messzelle, in der sich der Transducer befindet, zugefügt. Die Messungen werden bei 45°C durchgeführt, da die verkürzten Transducer-Fragmente keine bemerkenswerten Effekte bei niedrigeren Temperaturen in früheren Experimenten gezeigt haben (Hippler-Mreyen *et al.,* 2003). Die Titrationskurve, in Anwesenheit von 150 mM NaCl, ist in Abbildung 3.2.13 A dargestellt.

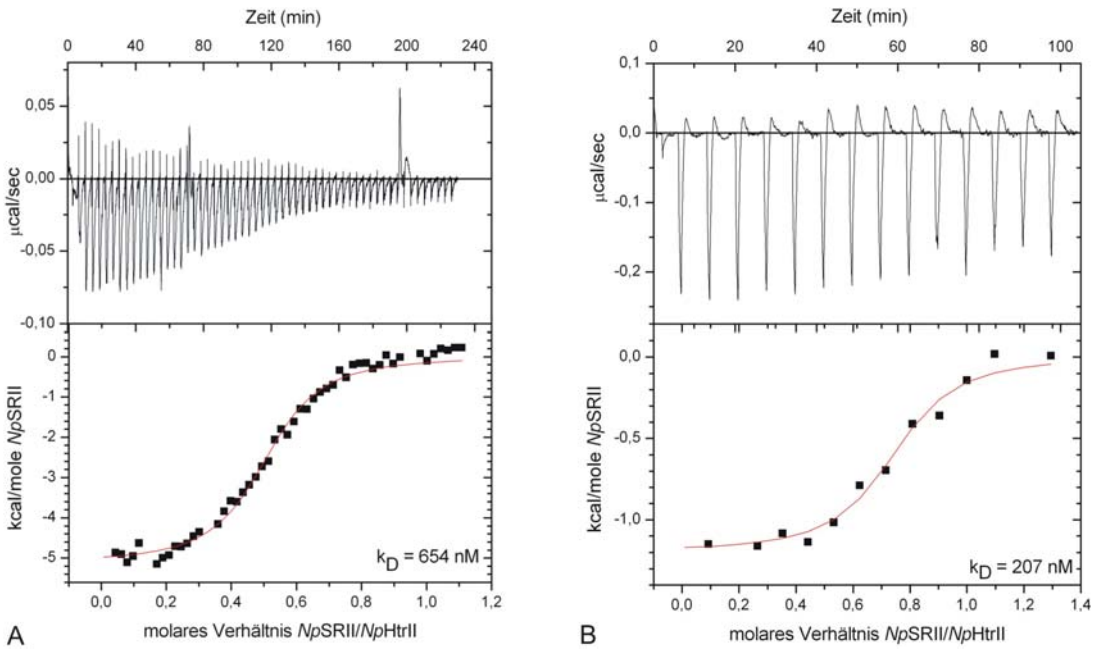


Abb. 3.2.13: ITC-Messungen von *Np*SRII mit dem *Np*HtrII (isoliert aus der Membranfraktion) entweder in Puffer, der 150 mM NaCl (A) oder 4 M NaCl enthält (B). In A sind 5 µl Injektionen und in B 20 µl Injektionen durchgeführt worden. Die oberen Bereiche der Daten stellen jeweils die Basislinien-korrigierten Rohdaten dar. Im unteren Bereich sind die aus der Messkurve berechneten molaren Wärmen in Abhängigkeit vom Titrationsfortschritt aufgetragen.

Aus den Rohdaten (Abb. 3.2.13 A) ist erkennbar, dass negative Peaks auftreten, die mit der Zeit immer kleiner werden. Die auch hier auftauchenden positiven Peaks können ebenfalls vernachlässigt werden. Die Auswertung der Daten (Abb. 3.2.13 A unten) zeigt eine typische Bindungskurve mit ΔH = -22 kJ/mol. Bei der Bindung des Rezeptors an den Transducer handelt sich um eine exotherme Reaktion. Aus vorigen Messungen mit dem verkürtzen *Np*HtrII$_{157}$-His wurde ein ΔH = -17.9 kJ/mol erhalten. Die Titration ergibt eine 1:0,52 Stöchiometrie (*Np*HtrII : *Np*SRII), mit einer Dissoziationskonstanten von 654 nM. Im Vergleich zu den Messungen mit den verkürzten Transducer Fragmenten (z.B. *Np*HtrII$_{157}$-His ($k_D \geq 163$ nM) (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003)) und unter Berücksichtigung der Messungenauigkeit wird hier eine ca. vierfache Zunahme des apparenten k_D Wertes beobachtet, d. h. eine deutliche schwächere Bindung. Durch diese Werte wird ein Hinweis auf Unterschiede in der Bindung zwischen dem Rezeptor und den verkürzten Transducern im Vergleich zum *Np*HtrII gegeben.

Um den Einfluss der ionischen Stärke auf die Rezeptor-Transducer Bindung zu testen, wird eine weitere Reihe von Experimenten in Anwesenheit von 4 M Natriumchlorid, das den natürlichen Bedingungen der halophilen Bakterien ähnelt, durchgeführt. Die Abbildung 3.2.13 B zeigt eine Titrationskurve dieser Versuchsreihe mit 20 µl Injektionen. Auch hier sind hauptsächlich negative Peaks sichtbar und ein paar kleinere positive Peaks. Die Roh-Daten zeigen allerdings keine eindeutige Bindungskurve. Werden stark streuende Datenpunkte aus der Auswertung herausgenommen, ergibt sich die in Abbildung 3.2.13 B unten dargestellte Auftragung aus der eine Bindung des Transducers an *Np*SRII hervorgeht. Die Bindungsaffinität liegt unter diesen Bedingungen bei 207 nM, was einer Zunahme um einen Faktor 3 entspricht. Die Stöchiometrie liegt in diesem Versuch bei 1:0,72 (*Np*HtrII : *Np*SRII). Bemerkenswert ist, dass der enthalpische Beitrag der Bindungsenergie im Vergleich zu den Experimenten mit einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl um einen Faktor 4 auf ΔH = - 5.0 kJ/mol abnimmt.

Die Ergebnisse dieser Messungen einschließlich des Vergleichs mit den publizierten Daten des verkürzten Transdcuer Fragments *Np*HtrII$_{157}$ sind in der Tabelle 3.2.2 dargestellt.

*Np*HtrII	C_{NaCl} (mM)	n[1]	ΔH (kJ mol^{-1})	K_{ass} (M$^{-1}\times 10^6$)	ΔG (kJ mol^{-1})	ΔS (J mol^{-1}K^{-1})	k_D (nM)
full length	150	0.52	- 22.0	1.7	- 37.6	49	654
	4000	0.72	- 5.0	5.0	- 40.6	112	207
157[2]	150	1.0	- 17.9	6.2	- 41.4	74	160

[1]Stöchiometrie Transducer : Rezeptor = 1 : *n*
[2]Daten von Hippler-Mreyen *et al.* (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003)

Tabelle 3.2.2: Thermodynamische Parameter der Bindung von *Np*HtrII und *Np*HtrII$_{157}$ an *Np*SRII.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die gefundene Stöchiometrie von 1:0,52 - 0,72 gut übereinstimmt mit den Ergebnissen aus den Gelfiltrations-Experimenten bei 45°C bei denen kein vollständiger Verbrauch des Rezeptors für die Bindung an den Transducer festgestellt werden konnte (s. 3.2.1). Zusätzlich wird, ähnlich der Zeitabhängigkeit der Komplex Bildung bei den Gelfiltrations-Exerimenten, beobachtet, dass bei längerer Inkubationszeit (7 anstatt 4 min) zwischen den einzelnen Injektionen bei den ITC-Messungen bei hoher Salzkonzentration, eine höhere Rezeptor-Transducer Stöchiometrie beobachtet wird (0,72 im Gegensatz zu 0,52).
Die bisher unternommenen ITC-Messungen bezogen sich auf den aus der Membran isolierten Transducer. Da aber auch ein großer Anteil des *Np*HtrII im Zytoplama der Zelle vorliegt, soll durch ITC-Messungen die Bindungsstärke des Transducers an den Rezeptor überprüft werden. Dazu werden die aus dem Zytoplasma aufgereinigten und in DDM aufgenommenen Transducer Moleküle unter gleiche Versuchsbedingungen wie die vorigen Messungen gebracht. Der Rezeptor wird dann zu den *Np*HtrII Molekülen in 5 µl Schritten in einem Verhältnis von ca. 6:1 (*Np*SRII : *Np*HtrII) titriert. Abbildung 3.2.14 zeigt die entstandenen Titrationskurven.

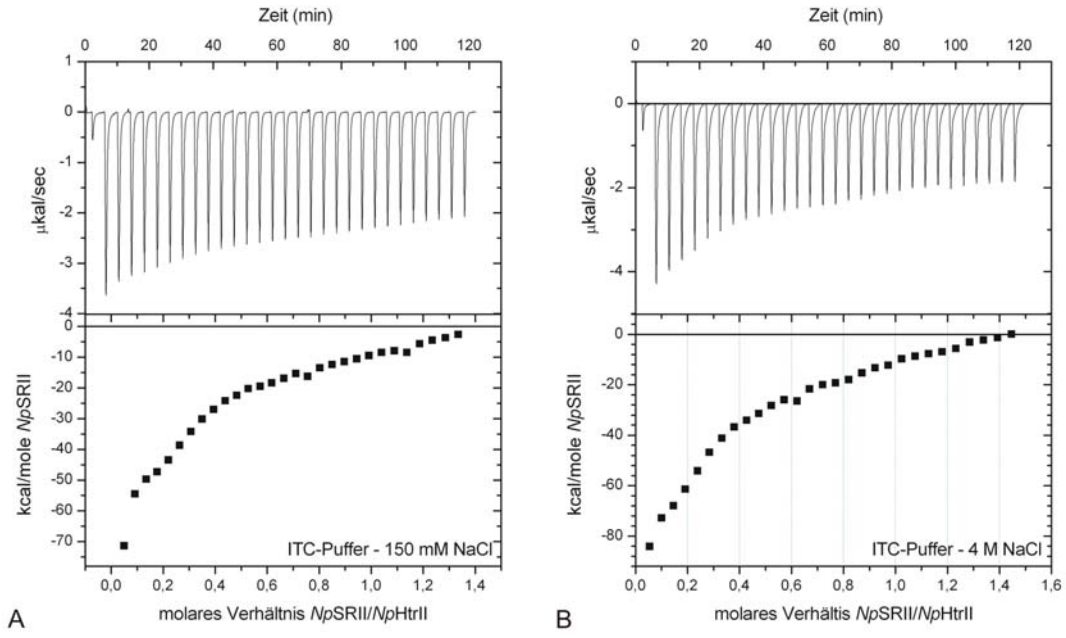


Abb. 3.2.14: ITC-Messungen von *Np*SRII mit dem *Np*HtrII, isoliert aus der Zytoplasma-Fraktion, entweder in Puffer, der 150 mM NaCl enthält (A) oder der 4 M NaCl entält (B). Die oberen Bereiche der Daten stellen jeweils die basislinien-korrigierten Rohdaten dar. Im unteren Bereich sind die aus der Messkurve berechneten molaren Wärmen in Abhängigkeit von dem Titrationsfortschritt aufgetragen.

Beide Titrationskurven zeigen klar negative Peaks pro Injektion ohne positive Peaks. Die Kurven entsprechen Verdünnungskurven wie sie in der Abbildung 3.2.12 für die Kontrollmessungen des Rezeptors dargestellt sind. Das bedeutet, dass eine Bindung des Rezeptors an den Transducer

nicht stattfindet. Es lässt sich daraus folgern, dass der aus dem Zytoplasma aufgereinigte Transducer, vermutlich auf Grund von Fehlfaltung nicht zur Bindung den Rezeptor fähig ist.

3.2.5 Untersuchung zur Rückfaltung des zytoplasmatischen *Np*HtrII

Aus den oben beschriebenen ITC-Messungen ist deutlich geworden, dass *Np*HtrII, das aus dem Zytoplasma aufgereinigt wird (s. 3.1.1) keine korrekte Faltung aufweist, da es mit dem *Np*SRII Rezeptor keine Bindung eingehen kann. Daher soll versucht werden, den Transducer nach Denaturierung wieder in seine aktive Form zu falten. Die Denaturierung erfolgt durch Zugabe von 6 M Guanidinium-Hydrochlorid zum solubilisierten *Np*HtrII für 2 h unter geringem Schütteln bei 4°C. Anschließend wird eine Dialyse gegen ITC-150 mM-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 0,05 % DDM) über Nacht bei 4°C durchgeführt. Eine folgende SDS-Page (s. 2.7.1) Analyse überprüft die behandelte Probe (Abb. 3.2.15).

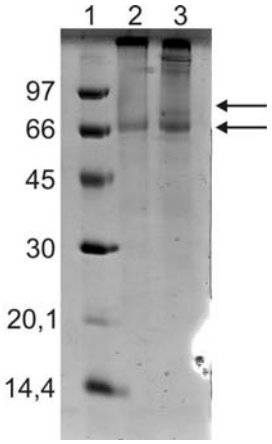


Abb. 3.2.15: SDS-Polyacrylamid-Gel der Denaturierung und anschließenden Rückfaltung des aus dem Zytoplasma isolierten *Np*HtrII.
Spur: 1: LMW-Marker, 2: *Np*HtrII + 6 M GuHCl vor der Dialyse, 3: *Np*HtrII nach Dialyse in 150 mM NaCl
Der obere Pfeil markiert die Größe des funktionellen *Np*HtrII, der untere die abgebaute *Np*HtrII-Bande.

Im SDS-Gel ist klar ersichtlich, dass das *Np*HtrII durch die Denaturierung mit GuHCl eine starke Tendenz zur Aggregation zeigt. Zusätzlich weist es eine unterschiedliche Faltung zum nicht denaturierten Transducer auf, die wahrscheinlich zu einem veränderten Laufverhalten im Gel führt, da hauptsächlich nur noch eine Bande bei ca. 70 kDa auftritt. Trotz der Diaylse in GuHCl freien Puffer wird keine deutliche Besserung mehr erreicht. Daher wird dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

3.2.6 FTIR-Messung des *Np*HtrII

Die FTIR-Messung des Transducers *Np*HtrII wird in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von F. Siebert (Universität Freiburg) durchgeführt. Die Abbildung 3.2.16 zeigt das FTIR-Spektrum von *Np*HtrII (blau). Das Spektrum ebenfalls vermessener PM-Lipide ohne Protein (rot) wird als Basislinie vom eigentlichen FTIR-Spektrum des Transducers subtrahiert um das reine Proteinspektrum (schwarz) zu erhalten. Zur Normierung der Spektren wird eine Bande des Absorptionsspektrums bei ca. 3330 cm^{-1} (Amid A-Region: N-H-Streckschwingung) verwendet, in denen Proteine nicht absorbieren.

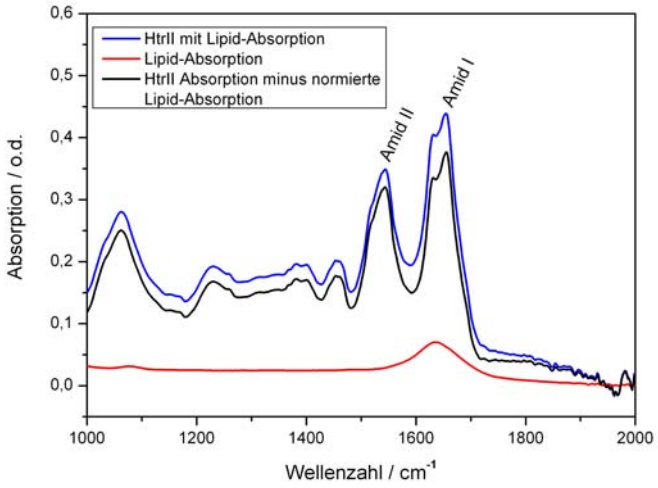


Abb. 3.2.16: FTIR-Spektrum des solubilisierten *Np*HtrII mit Lipid-Absorption (blau), ohne Lipid-Absorption (schwarz) und der Lipide (rot).

Das FTIR-Spektrum der Lipid-Lösung zeigt einen deutlichen Peak bei der Wellenzahl von ca. 1640 cm^{-1} (Amid I) und einen sehr kleinen Peak bei 1075 cm^{-1}. Die beiden FTIR-Spektren des solubilisierten *Np*HtrII sehen fast identisch aus. Sie zeigen beide die gleichen Peaks nur mit unterschiedlicher Amplitude. Vier deutliche Peaks sind ca. bei den Wellenzahlen 1656 (Amid I), 1632 (Amid I), 1541 (Amid II) und 1061 cm^{-1} zu erkennen. Vier weitere kleinere Peaks liegen in dem Wellenzahlbereich zwischen 1460 und 1226 cm^{-1} (Amid III).
Die Amid I und Amid II Regionen sind wichtig bezüglich der Bestimmung der Sekundärstruktur. Um die genauen Peak-Positionen im Spektrum zu bestimmen wird das Derivat (2. Ableitung) berechnet (Abb. 3.2.17).

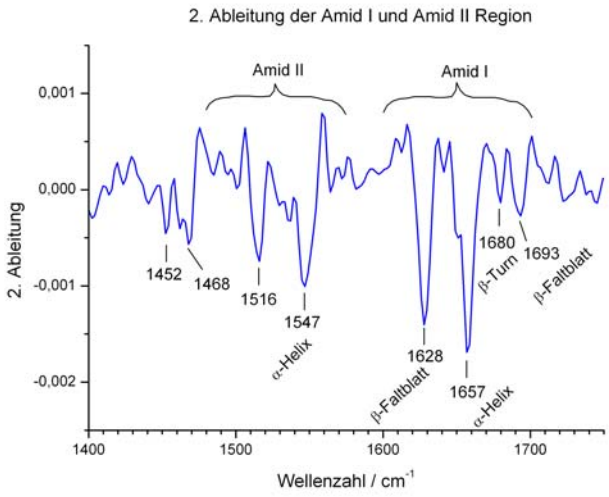


Abb. 3.2.17: 2. Ableitung der Amid I und Amid II Region des *Np*HtrII Interferogramms mit abgezogener PML-Kontrolle.

Im Amid I und Amid II Bereich finden sich verschiedene Peaks, wobei die deutlichsten bei den Wellenzahlen 1452, 1468, 1516, 1547, 1628, 1657, 1680 und 1693 cm^{-1} zu erkennen sind. Die Amid I-Region geht ca. von der Wellenlänge 1600-1700 cm^{-1}, die Amid II-Region erstreckt sich zwichen den Wellenlängen 1480 - 1575 cm^{-1}. Beide Regionen zeigen sowohl β-Faltblatt, als auch α-helikale Strukturen. Die Peaks bei den Wellenlängen 1547 und 1657 cm^{-1} weisen auf eine α-helikale Struktur hin, wohingegen die Peaks bei den Wellenlängen 1628 und 1693 cm^{-1} auf ein β-Faltblatt deuten. Der Peak bei 1680 cm^{-1} gibt zusätzlich einen Hinweis für einen β-Turn. Die übrigen Peaks können nicht eindeutig einer Sekundärstruktur zugeschrieben werden. Durch diese FTIR-Messung wird ein weiterer Hinweis auf eine mögliche coiled-coil Konformation des Transducer geliefert.

3.3 Kristallisation von *Np*HtrII-Konstrukten

Bisher konnte vom *Np*SRII/*Np*HtrII Komplex nur der Rezeptor und der transmembrane Teil des Transducers Moleküls aus kubischen Lipidphasen kristallisiert, und deren Struktur bestimmt werden (Gordeliy *et al.*, 2002). So existieren, zusammen mit den Erkenntnissen struktureller Daten über die Chemorezeptoren, Informationen über die Rezeptordomäne, den Transmembranteil, sowie über die große zytoplasmatische Domäne. Es fehlen immer noch Daten über den für den Signaltransfer wichtigen Linker-Bereich, der sich zwischen dem transmembranen Bereich und der zytoplasmatischen Domäne befindet. Zudem existieren die Informationen über den zytoplasmatischen Bereich nur von den Daten der Chemorezeptoren (Kim *et al.*, 1999). Um diese Lücke zu schließen werden drei verschiedene zytoplasmatische *Np*HtrII-Konstrukte kloniert und für Kristallisationsversuche aufgereinigt, die den Linker-Bereich enthalten. Die Kristallisation dieser Fragmente und des Transducers werden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Georg Büldt (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Die Kristallisationsansätze werden von V. Gordeliy optimiert und ausgeführt.

3.3.1 Vorbereitungen zur Kristallisation

Die zytoplasmatischen *Np*HtrII-Fragmente, *Np*HtrII_L82C-534, *Np*HtrII_K96C-534 und *Np*HtrII_130-534, werden in Kristallisationspuffer (25 mM Hepes, 1 mM EDTA, pH 7,4) über Nacht dialysiert und an V. Gordeliy (Forschungszentrum Jülich) zur Kristallisation übergeben.
Zusätzlich wird versucht *Np*HtrII zu kristallisieren. Dazu wird das Ni-Eluat dieses Proteins (s. 3.1.1), aufgereinigt aus der Membranfraktion, verwendet. Es wird sowohl ein Ansatz mit dem Trasducer, als auch im Komplex mit *Np*SRII durchgeführt. Für die Kristallisations-Versuche werden die Proteine der beiden Ansätze in die kubische Lipidphase überführt, was von V. Gordeliy durchgeführt wird. Erste Kristallbildungen des Komplexes sind in der Abbildung 3.3.1 dagestellt. Die Kristalle sind bislang klein und nicht geeignet um mit ihnen Streuversuche durchzuführen, so dass Optimierungsarbeit notwendig ist.

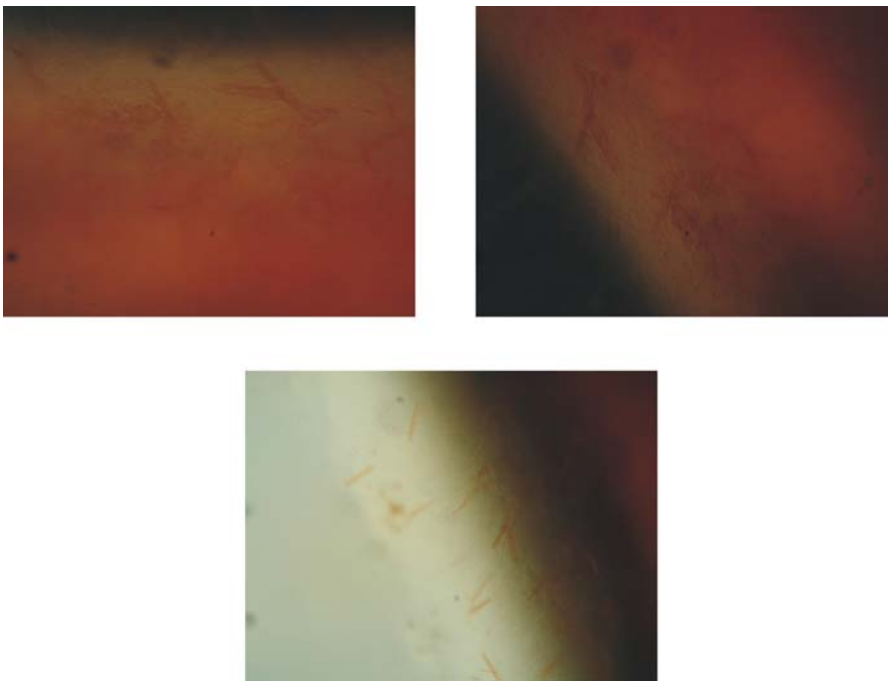


Abb. 3.3.1: Erste Kristalle des Ansatzes des Transducers im Komplex mit *Np*SRII in der kubischen Lipidphase.

3.4 ESR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung und Signaltransduktion

Zum Verständnis der Mechanismen der phototaktischen Signaltransduktion sind nicht nur strukturelle, sondern auch kinetische Daten über den Rezeptor/Transducer Komplex notwendig. Daher wird neben der Röntgenstrukturanalyse eine weitere Methode, die ESR-Spektroskopie (in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von H.-J. Steinoff) unter Anwendung der Methode des „site-directed spin-labeling“ angewendet. Diese Methode erlaubt es zusätzlich zur Strukturuntersuchung dynamische Vorgänge zu analysieren. Um das bisher bestehende statische Bild des Signaltransfers zu verbessern, werden verschiedene Cysteinmutanten hergestellt, mit denen der Signaltransfer von der Membran zur Signaldomäne untersucht werden soll.

3.4.1 ESR-Untersuchungen am Transducer Molekül

Spinmarkierung

Zur Analyse der Mutanten mit Hilfe der ESR-Spektroskopie wird der Spin-Label MTSL kovalent über eine Disulfidbrücke an das Cystein des Moleküls gebunden (s. 2.8.4). Neben der Markierung der Cysteinmutanten des *Np*HtrII wird auch das natürliche Cystein an Position 173 gelabelt. Die Spin-Markierung der Proteine erfolgt wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben. Pro Transducer-Konstrukt werden vier verschiedene Proben hergestellt, das Transducer-Molekül in solubilisierter und in rekonstituierter Form und jeweils solubilisiert und rekonstituiert in einem 1:1 Komplex mit dem Rezeptor *Np*SRII.

Untersuchungen zur Austauschwechselwirkung

Da es sich beim *Np*HtrII um Dimere und Oligomere handelt (s. 3.2.1), kann eine Spin-Spin-Interaktion dann stattfinden wenn beide Label in räumlicher Nähe zueinander sind. Abbildung 3.4.1 stellt die theoretische Struktur des Transducer-Dimers in der Signaldomäne dar.

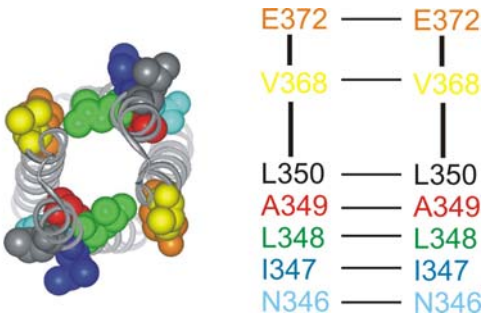


Abb. 3.4.1: Schematische Darstellung der Signaldomäne des Transducer-Dimers.

Die Positionen A349 und L348 zeigen in das Innere des coiled-coil Bündels, so dass Spin-Spin-Interaktionen wahrscheinlicher sind, als bei den nach außen zeigenden Spin-Labeln (z. B. L350, N346).

Die ESR-Daten der Cysteinmutanten des *Np*HtrII bezüglich dieser Austauschwechselwirkungen sind in der Abbildung 3.4.2 aufgeführt.

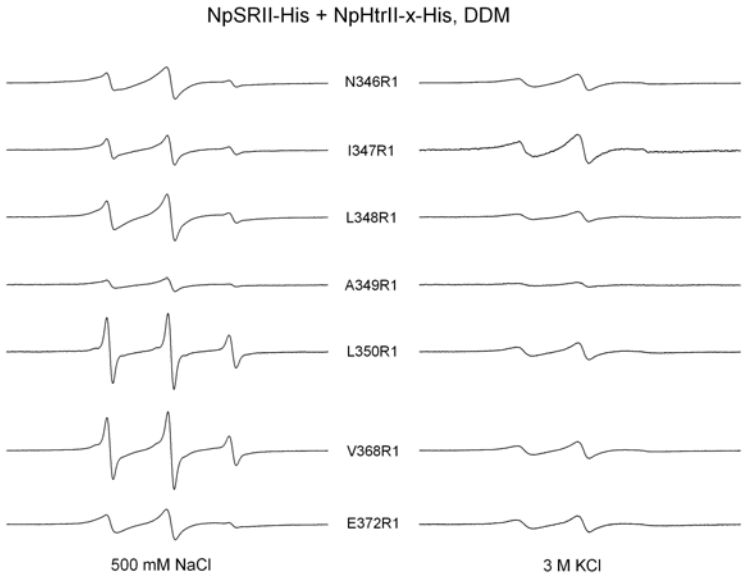


Abb. 3.4.2: ESR-Spektren der solubilisierten *Np*HtrII-Cysteinmutanten im Komplex mit *Np*SRII unter 500 mM NaCl und 3 M NaCl Bedingungen. Die Spektren sind Spin-normiert.

Zur Normierung der ESR-Spektren auf die Spinzahl werden die Proben denaturiert. Dadurch werden Wechselwirkungen ausgeschlossen und es kann eine Normierung auf die Spinkonzentration erfolgen. Die Amplitudenstärke der normalisierten Spektren (Abb. 3.4.2) ist ein Maß für die Austauschwechselwirkungen. Je höher die Amplitude, destso kleiner sind die Austauchwechselwirkungen.

Bei den eine 1,5 Helix-Windung repräsentierenden Cysteinmutanten N346C bis L350C lässt sich kein deutlicher Hinweis auf eine bestehende coiled-coil Struktur bei 500 mM NaCl erkennen. Es ist aber klar ersichtlich, dass es deuliche Austauschwechselwirkungen an bestimmten Positionen, wie z. B. A349C, gibt. Auch bei den Positionen V368C und E372C sind gewisse Anteile vorhanden. Insgesamt wird die Austauschwechselwirkung an allen Positionen bei Anwesenheit von 3 M KCl, bis auf die Cysteinmutante I347C, intensiver, was auf engere Packung unter den nativeren Bedingungen hinweist. Bei 3 M Salz wird zudem ein Hinweis für eine coiled-coil Konformation gefunden, da die Austauschwechselwirkungen an den Positionen L348C und A349C, die nach Sekundärstruktur-Vorhersagen ins Innere des coiled-coil zeigen, sehr stark sind

und bei den nach außen zeigenden Aminosäuren, N346C, I347C und L350C, geringere Wechselwirkungen erkennbar sind.

Mobilitätsuntersuchungen

Zusätzlich wird die Mobilität dieser spinmarkierten Proben gemessen. Die Abbildung 3.4.3 zeigt das Ergebnis dieser Messungen.

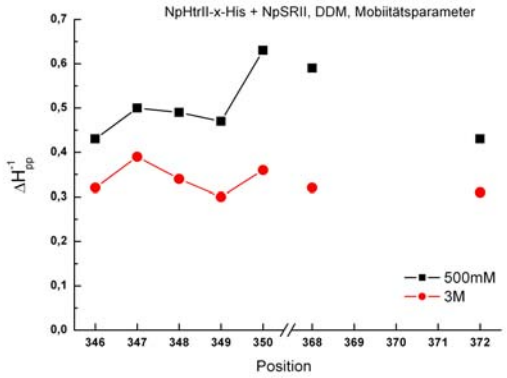


Abb. 3.4.3: Auftragung des Mobilitätsparameters der *Np*HtrII-Cysteinmutanten im Komplex mit *Np*SRII in solubilisierter Form unter 500 mM oder 3 M Salz.
ΔH^{-1}_{pp} = inverse Linienbreite der Hauptfeldlinie.

Der Mobilitätsparameter gibt die Mobilität des Spin-Labels an der entsprechenden Position an. Je höher der Wert des Parameters, destso mobiler ist der Spin-Label (0,6 - 0,7: sehr mobil, fast völlig frei). Alle Positionen weisen eine hohe Mobilität (0,3 - 0,6) des Spin-Labels auf. Auch bei dieser Messung wird deutlich, dass die Hoch-Salz Bedingungen zu einer starreren Konformation des Proteins führen. Die Proteine weisen aber unter diesen Bedingungen noch eine hohe Dynamik auf. Die Positionen L350C und V368C zeigen die stärkste Beeinflussung durch das Salz im Gegensatz zu den anderen Positionen. Die Verteilung der Mobilitätszunahme bzw. -abnahme in Abhängigkeit von der Position, die eine gewisse Periodizität aufweist, deutet eine helikale Struktur an. Dieses ist besonders deutlich bei dem Ergebnis der Hoch-Salz Messungen.

Effekte der Rezeptor-Bindung

In weiteren ESR-Messungen werden einige Cysteinmutanten im Komplex mit dem Rezeptor im Vergleich zu den Transducer-Proteinen in solubilisierter Form untersucht (Abb. 3.4.4).

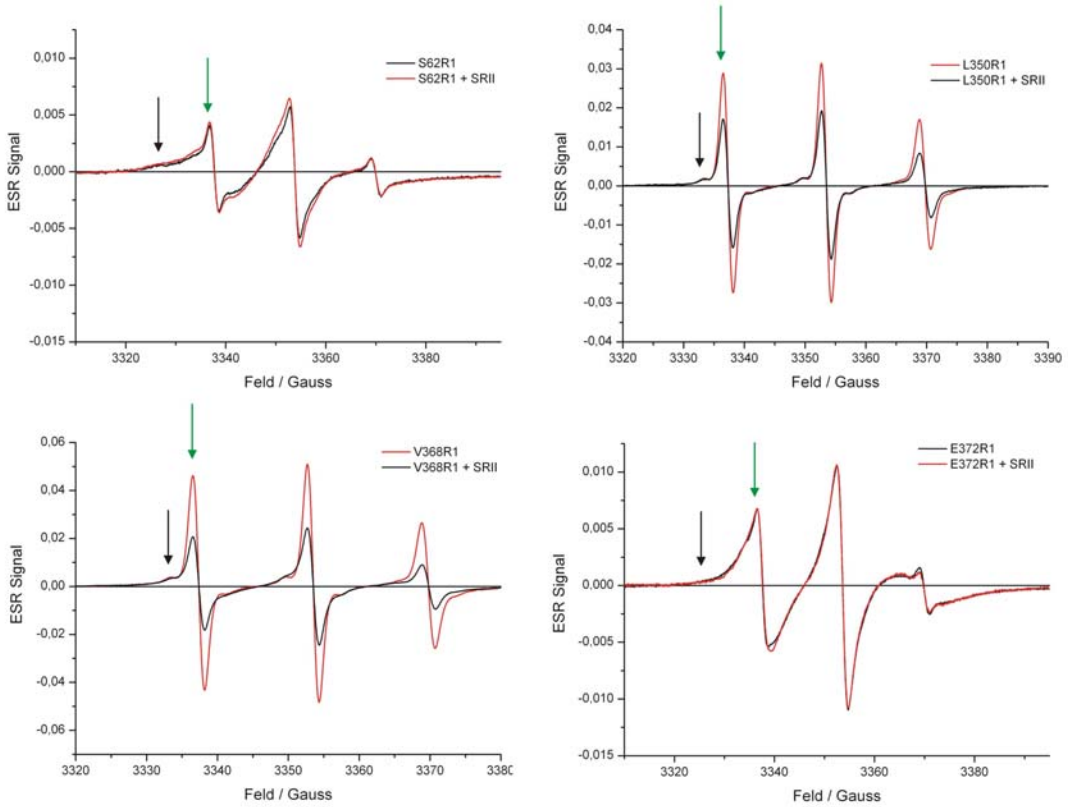


Abb. 3.4.4: Vergleich der Cysteinmutanten S62C, L350C, V368C und 372C mit den Transducer-Proteinen im Komplex mit dem Rezeptor *Np*SRII in solubilisierter Form. Pfeile repräsentieren die immobile (schwarz) und mobile (grün) Komponente. Die Spektren sind Spin-normiert.

Die beiden Spektren, Transducer und *Np*HtrII/*Np*SRII-Komplex, der Cysteinmutanten S62C zeigen nur geringe Abweichungen voneinander, d. h. die Bindung des Rezeptors hat keinen Einfluss auf den Transducer. Im Gegensatz zur Position S62C zeigen die Positionen L350C und V368C eine deutliche Änderung zwischen den Spektren im Komplex mit *Np*SRII und ohne Komplex. In Anwesenheit des Rezeptors wird die mobile Komponente (grüner Pfeil) erheblich reduziert.

Die mobile Komponente der Cysteinmutanten kann wahrscheinlich auf Grund der Proben-Präparation nicht auf freien Spin-Label zurückgeführt werden, ist aber nicht ganz ausgeschlossen. Die Mutante E372C zeigt wiederrum ein identisches ESR-Spektrum sowohl für den Transducer, als auch im Komplex.

Untersuchungen an der Position 173

Das natürliche Cystein des *Np*HtrII an Position C173 wird ebenfalls mit ESR untersucht. Auch hier wird eine Salzabhängigkeit im solubilisierten Zustand gefunden (Abb. 3.4.5).

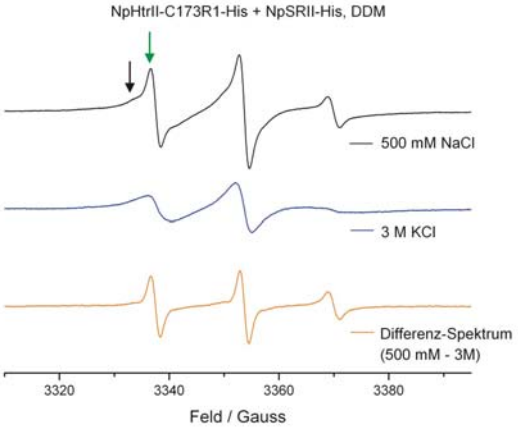


Abb. 3.4.5: Salzabhängigkeit der solubilisierten Probe des natürlichen Cysteins des *Np*HtrII unter 500 mM NaCl und 3 M KCl. Zusätzlich ist das Differenz-Spektrum dargestellt. Die Graphen sind Spin-normiert. Die Pfeile repräsentieren die immobile (schwarz) und mobile (grün) Komponente.

Die Spektren des Transducers zeigen sowohl eine mobile (grüner Pfeil), als auch eine immobile Komponente (schwarzer Pfeil). Die mobile Komponente ist unter Niedrig-Salz Bedingungen (500 mM NaCl) stärker vertreten als die immobile Komponente. Unter Hoch-Salz Bedingungen wird die mobile Komponente reduziert. Zudem finden sich an der Position C173 stärkere Austauschwechselwirkung bei 3 M Salz im Vergleich zu Niedrig-Salz Bedingungen. Auch aus der Mobilitäts-Messung wird deutlich erkennbar, dass die Mobilität des Spin-Labels unter 3 M Salz stark erniedrig wird, wenn das Protein sich im Komplex mit *Np*SRII befindet (Abb. 3.4.6).

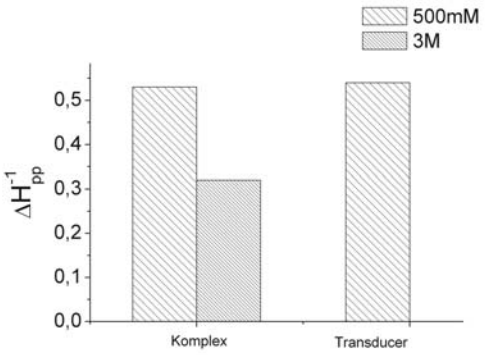


Abb. 3.4.6: Vergleich der Mobilitäten des Spin-Labels an der Position C173 im Komplex mit *Np*SRII unter Niedrig-Salz und Hoch-Salz Bedingungen.

Die Mobilitäts-Messung des Transducers unter Hoch-Salz Bedingungen ist noch nicht durchgeführt worden.

Zusätzlich wird auch an dieser Position eine Vergleichs-Messung im solubilisierten Zustand unter 500 mM Salz bezüglich des Verhaltens des Transducers, als auch des *Np*HtrII/*Np*SRII-Komplexes durchgeführt (Abb. 3.4.7).

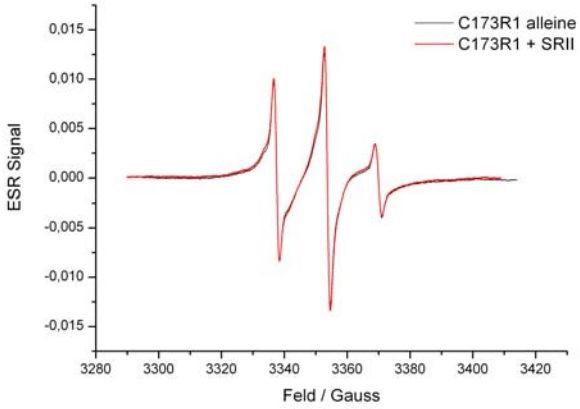


Abb. 3.4.7: Vergleich der ESR-Spektren des Transducers und im Komplex mit dem Rezeptor in der solubilisierten Form unter 500 mM Salz an der Position C173. Graphen sind Spin-normiert.

Auch hier sind beide Spektren fast völlig identisch. Dieses weist daraufhin, dass die Bindung des Rezeptors keinen Einfluss auf die Konformation des Transducers an der Position C173 hat.

Untersuchungen mit rekonstituierten Proben

Des Weiteren sind anfängliche ESR-Messungen mit rekonstituierten Proben der Cysteinmutanten durchgeführt worden. Abbildung 3.4.8 zeigt die ersten Ergebnisse der Messungen mit den rekonstituierten Mutanten N346C - L350C zur Bestimmung der Austauschwechselwirkungen.

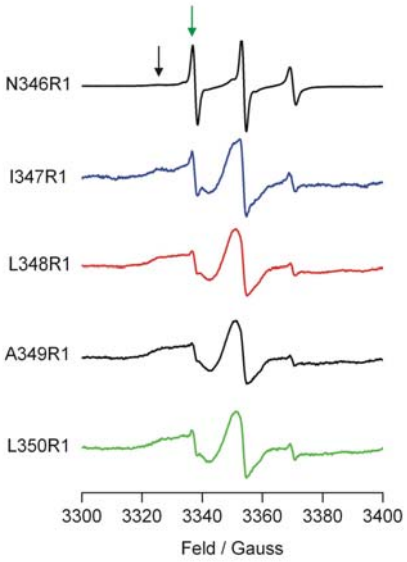


Abb. 3.4.8: ESR-Messungen mit den rekonstituierten Proben N346R1, I347R1, L348R1, A349R1 und L350R1 im Komplex mit *Np*SRII in 150 mM NaCl zur Bestimmung der Austauschwechselwirkungen. Die Spektren sind Amplituden-Normiert. Die Pfeile repräsentieren die immobile (schwarz) und mobile (grün) Komponente.

Die untersuchten Cysteinmutanten sind im Komplex mit *Np*SRII rekonstituiert. Das Spektrum der Mutanten N346C weist auf eine relativ geringe Austauschwechselwirkung hin, da die mobile Komponente (grüner Pfeil) noch stark vertreten ist. Dagegen ist die mobile Komponente in den vier anderen Spektren stark reduziert und die immobile Komponente (schwarzer Pfeil) wird deutlicher, wodurch ein Hinweis auf stärkere Austauschwechselwirkungen gegeben ist. Diese vier Spektren sehen insgesamt sehr ähnlich aus. Diese Experimente müssen wiederholt werden um eindeutige Aussagen über die Effekte treffen zu können.
Zusätzlich sind anfängliche Zugänglichkeits-Messungen mit den rekonstituierten Proben S62C, C173, I347C, L348C, A349C und E372C durchgeführt worden. Die Zugänglichkeit der Spin-Label wird sowohl für Sauerstoff, als auch für Ni-EDDA untersucht. Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Experimente sind in der Tabelle 3.4.1 zusammengefasst.

Cysteinmutante HtrII	Wex (O_2/Luft) in MHz	Wex (Ni-EDDA 3mM) in MHz
S62C	1,16	0,02
C173	0,79	0,04
I347C	1,86	0,16
L348C	0,84	0,04
A349C	0,52	0,11
E372C	1,42	0,04

Tabelle 3.4.1: Ergebnisse der Zugänglichkeits-Messungen der Cysteinmutanten im rekonstituierten Zustand.
W_{ex} = Austauschfrequenz des Spin-Labels mit den paramagnetischen Quenschern.

Die ermittelten Daten zeigen, dass die einzelnen Spin-markierten Positionen überwiegend im wässrigen Milieu oder im Proteininneren lokalisiert sind. Zusätzlich wird durch die niedrigen Zugänglichkeits-Werte für Ni-EDDA ein Hinweis auf eine Oligomerisierung der Transducer-Moleküle geliefert, da für alle Positionen ähnliche Daten bestimmt werden.
Weitere anfängliche ESR-Messungen an Transienten geben deutliche erste Hinweise auf lichtinduzierte Änderungen in der Signaldomäne, so dass das Signal wahrscheinlich von der transmembranen Domäne bis zur Signaldomäne weitergeleitet wird (persönliche Mitteilung E. Bordignon / J. Klare). Jedoch bedarf die Transienten-Messung noch der Optimierung, so dass noch keine eindeutgen Ergebnisse gezeigt werden können.

3.4.2 ESR-Untersuchungen an den Fusionsproteinen

Spinmarkierung und Rekonstitution

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Fusionsproteine a - d Spin markiert. Dieses erfolgt leicht abgewandelt zur unter Kapitel 2.6.3 beschriebenen Methode. Der isolierte Komplex aus *Np*SRII und Chimäre wird zur Reduktion der Cystein-Seitenketten mit 10 mM TCEP für 1 h bei 4°C unter leichtem Rotieren inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe des Spinlabels (MTSL). Die Inkubation wird über Nacht durchgeführt. Der überschüssige Spinlabel wird durch einen Pufferaustausch abgetrennt, indem die Lösung ankonzentriert und anschließend wieder verdünnt und erneut ankonzentriert wird (ca. 4 – 5 x). Von dieser Lösung wird die solubilisierte Probe abgenommen und entsprechend ankonzentriert. Die restliche Lösung wird zur Rekonstitution eingesetzt. Die PM-Lipide werden in einem 1:1 Verhältnis (Massenverhältnis) eingesetzt. Die weitere Durchführung entspricht der unter Kapitel 2.6.5 beschriebenen Methode.

Positionsbeschreibung des Cysteins

Die ESR-Untersuchungen der Fusionsproteine a - d basieren auf dem Vorhandensein eines natürlichen Cysteins an der Position 173 im *Np*HtrII-Fragment. Diese Aminosäure ist nach Sekundärstruktur-Vorhersagen in einer helikalen Region an der Position d im vorgeschlagenen Heptaden-Muster lokalisiert (s. Abb. 3.1.15) und zeigt damit ins Innere der coiled-coil Struktur.

Effekte der Solubilisation durch Raum-Temperatur ESR-Spektren

Die Messungen zur Untersuchung der Effekte der Solubilisation auf die strukturellen und dynamischen Eigenschaften der Chimären werden bei RT durchgeführt. Abbildung 3.4.9 zeigt die Ergebnisse der Chimären im solubilisierten und im rekonstituierten Zustand bei 150 mM NaCl.

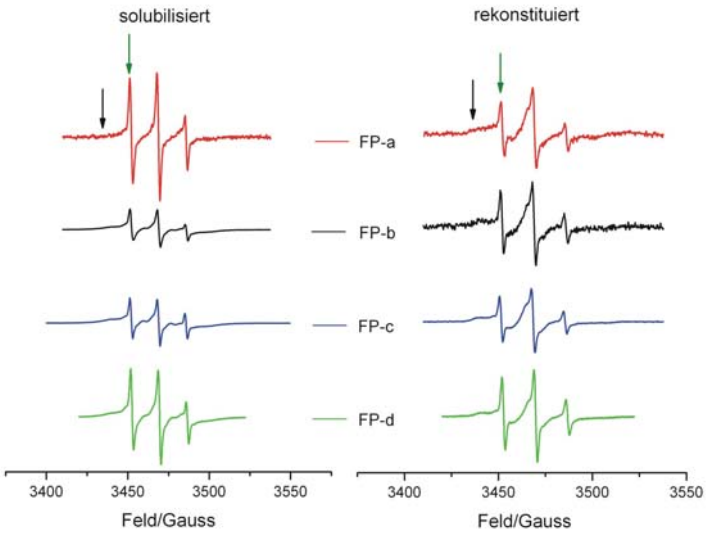


Abb. 3.4.9: Vergleich der solubilisierten und der rekonstituierten Probe der Fusionsproteine a (rot), b (schwarz), c (blau) und d (grün) bei RT in 150 mM Salz. Die Pfeile repräsentieren die mobile (grün) und immobile (schwarz) Komponente. Die Spektren sind Amplituden-normiert.

Die Spektren der solubilisierten Proben der Fusionsproteine zeigen die Anwesenheit von zwei Komponenten. Es sind sowohl eine mobile (grüner Pfeil) als auch eine immobile (schwarzer Pfeil) Komponente vorhanden. Zusätzlich sind bei den Chimären Austauschwechselwirkungen, d. h. Spin-Spin-Wechselwirkungen, in den RT-Spektren sichtbar. Bei der Chimäre a scheint keine deutliche immobile Komponente im solubilisierten Zustand zu existieren. Außerdem zeigt das Spektrum nur eine geringe Fraktion an Austauschwechselwirkung. Diese können experimentell bedingt nicht stärker gemessen werden, da die Probe eine zu geringe Spin-Labeling Effizienz aufweist. Die Fusionsproteine b, c und d besitzen im solubilisierten Zustand beide Komponenten.
Die Spektren der in PML rekonstituierten Proben (Abb. 3.4.9 rechts) zeigen ebenfalls zwei spektrale Komponenten (mobil und immobil). Das Fusionsprotein c zeigt im Vergleich zu den Chimären a, b und d nicht so einen großen Anteil der sehr mobilen Komponente. Hinweise auf Spin-Spin-Wechselwirkungen können in den rekonstituierten Proben nicht gefunden werden. Dieses könnte an experimentellen oder präparativen Problemen liegen, da zur Rekonstitution PM-Lipide verwendet werden und nicht *Np*-Lipide, die der natürlichen Umgebung der transmembranen Proteinteile entsprechen. Ein weiterer Hinweis für diese Problematik liefern die Ergebnisse der ESR-Messungen mit den rekonstituerten Proben des Transducers (s. 3.4.1). Eine Zusammenfasung ist in der Tabelle 3.4.2 dargestellt.

	solubilisiert			Rekonstituiert		
Chimäre	mobile	immobile	Austausch-	mobile	immobile	Austausch-
	Komponente		wechselwirkung	Komponente		wechselwirkung
a	+	-	gering	+	+	-
b	+	+	+	+	+	-
c	+	+	+	gering	+	-
d	+	+	+	+	+	-

Tabelle 3.4.2: Vergleich der mobilen und immobilen Komponente und der Austauschwechselwirkungen der Chimären im solubilisierten und rekonstituierten Zustand. (+ ≡ vorhanden, - ≡ nicht vorhanden).

Effekte der ionischen Stärke durch Raum-Temperatur ESR-Spektren

In weiteren ESR-Messungen wird der Einfluss der ionischen Stärke untersucht, um eventuell Aussagen zum Mechanismus der Signaltransduktion und der notwendigen, umgebenden Bedingungen für die Struktur und Funktion *in vivo* machen zu können. Die Proben werden in Puffer mit 4 M NaCl (nur FP-b, sonst 800 mM NaCl) getestet.
Als Beispiel sind in der Abbildung 3.4.10 die Spektren der solubilisierten Proben und der rekonstituierten Proben des Chimäre b dargestellt.

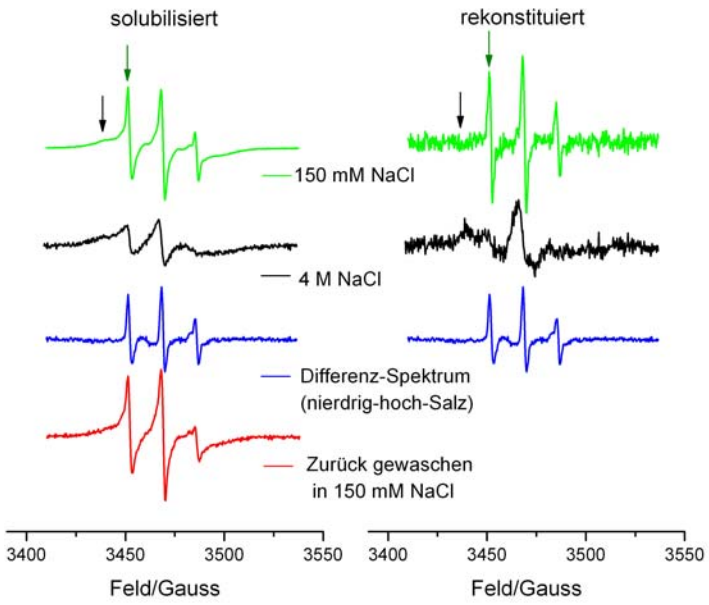


Abb. 3.4.10: Spektren der solubilisierten und rekonstituierten Proben des Fusionsroteins b in 150 mM und in 4M NaCl bei Raumtemperatur. Zusätzlich sind die Differenzspektren und die wieder in 150 mM Salz zurückgewaschene Probe im solubilisierten Zustand gezeigt. Die Pfeile repräsentieren die mobile (grün) und immobile (schwarz) Komponente. Spektren sind Spin normiert.

Die Chimäre b zeigt im solubilisierten Zustand unter Hoch-Salz Bedingungen bzw. 4 M NaCl eine drastische Änderung in ihrem Spektrum im Vergleich zum Niedrig-Salz Spektrum. Unter beiden Bedingungen ist die mobile (grüner Pfeil) und immobile (schwarzer Pfeil) Komponente erkennbar. Jedoch ist die mobile Komponente, in der sich Austauschwechselwirkungen erkennen lassen, sehr stark reduziert unter 4 M Salz. Das Differenzspektrum zeigt unter Hoch-Salz Bedingungen, dass die mobile Komponente nicht mehr nachweisbar ist. Wird die Hoch-Salz Probe wieder in 150 mM Salz zurück gewaschen erkennt man eine vollständige Reversibilität des Effektes, was auf ein Gleichgewicht zwischen der mobilen und immobilen Komponente hinweist. In der rekonstituierten Chimäre b ist unter 4 M Salz ebenfalls eine starke Änderung im Spektrum im Vergleich zum Niedrig-Salz (150 mM) sichtbar. Auch hier sind jeweils zwei Komponenten erkennbar, wobei die mobile Komponente unter Hoch-Salz geringer ist. Das Differenzspektrum zeigt auch in diesem Fall, ähnlich zu den Ergebnissen der solubilisierten Probe, eine starke Abnahme der mobilen Komponente.

Das Fusionsprotein d zeigt ein vergleichbares Verhalten zur Chimäre b. Auch die Fusionsproteine a und c verhalten sich im solubilisierten Zustand ähnlich. Dagegen weisen sie in rekonstituierter Form einen abweichenden Effekt auf. Unter Hoch-Salz Bedingungen wird nur eine kleine Änderung in den spektralen Eigenschaften im Verglich zu 150 mM NaCl sichtbar.Die mobile Komponente wird um einen kleinen Anteil reduziert. Durch diesen geringen Effekt scheint es, als ob die Konformation der Chimären a und c schon unter Niedrig-Salz Bedingungen stabil ist. Die Chimäre c ist aber im Gegensatz zum Fusionsprotein a reversibel, d. h. die Probe zeigt nach dem

Waschen der Hoch-Salz Probe zurück in Niedrig-Salz Puffer wieder das gleiche Spektrum wie unter 150 mM Salz Bedingungen. Die Tabelle 3.4.3 zeigt eine Zusammenfassung der Daten.

	solubilisiert		Rekonstituiert	
Chimäre	Salzabhängigkeit (Verringerung der mobilen Komponente)	Reversibilität (hoch → niedrig Salz)	Salzabhängigkeit (Verringerung der mobilen Komponente)	Reversibilität (hoch → niedrig Salz)
a	n.b.	n.b.	gering	-
b	+	+	+	n.b.
c	n.b.	n.b.	gering	+
d	+	+	+	n.b.

Tabelle 3.4.3: Zusammenfassung der Salzabhängigkeit der Chimären.
(+ ≡ vorhanden; - ≡ nicht vorhanden; n.b. ≡ nicht bestimmt).

Die Abbildung 3.4.11 verdeutlicht noch einmal die Auswirkungen des Hoch-Salzes auf die Chimäre b.

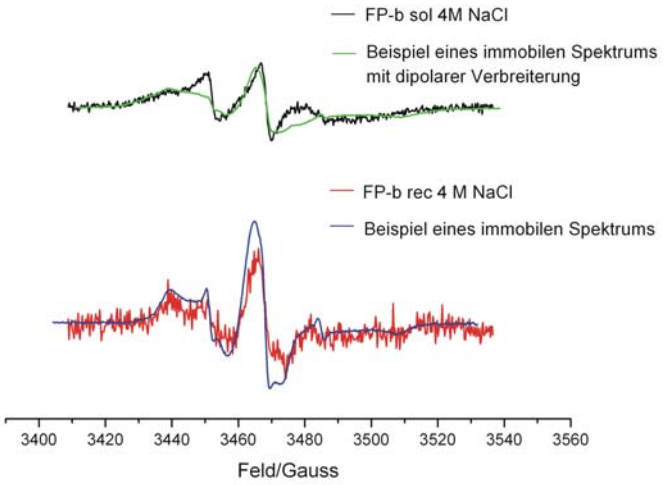


Abb. 3.4.11: Vergleich der Hoch-Salz Spektren der Chimäre b im solubilisierten (schwarz) und im rekonstituierten (rot) Zustand mit Beispielen eines immobilen Spektrums mit dipolarer Verbreiterung (*Np*SRII-L159R1 + *Np*HtrII-L90R1, rekonstituiert; grün) und ohne dipolare Verbreiterung (*Np*SRII-V17R1, rekonstituiert; blau).

Die Abbildung 3.4.11 zeigt ein Vergleich zwischen den Hoch-Salz Spektren des Fusionsproteins b im solubilisierten und im rekonstituierten Zustand und zwei Beispielen von immobilen Spin-Labeln mit dipolarer Verbreiterung (*Np*SRII-L159R1 + *Np*HtrII-L90R1, rekonstituiert) und ohne dipolare Verbreiterung (*Np*SRII-V17R1, rekonstituiert). In der solublisierten Hoch-Salz Probe der Chimäre b ist eine dipolare Verbreitung klar erkennbar. Daraus ergibt sich ein Abstand im Bereich von 1 nm. In der Hoch-Salz rekonstituierten Probe ist kein Hinweis für einen kurzen Abstand zwischen den Spins gegeben. Auch können keine starken Interaktionen beobachtet werden. Durch dieses unterschiedliche Verhalten wird angedeutet, dass die Chimäre deutlich

unterschiedliche Konformation in den verschiedenen Umgebungen besitzt. Dieses stimmt auch mit Ergebnissen überein, die für den verkürzten Tranducer *Np*HtrII-157 im Komplex mit *Np*SRII gefunden wurden (Klare *et al.*, 2006).

Temperatureffekte auf die ESR-Spektren

In weiteren Experimenten wird die Temperaturabhängigkeit untersucht. Zunächst wird jeweils von 20°C in 5°C Schritten bis 5°C gemessen. Dann wird erneut ein Spektrum bei 20°C aufgenommen, um die Reversibilität zu überprüfen. Als letztes wird die Temperatur bis 30°C in 5°C Schritten erhöht, um so den Temperatur-Bereich von 5°C - 30°C abzudecken. Beispielhaft werden die Spektren der Chimäre b in der Abbildung 3.4.12 in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt.

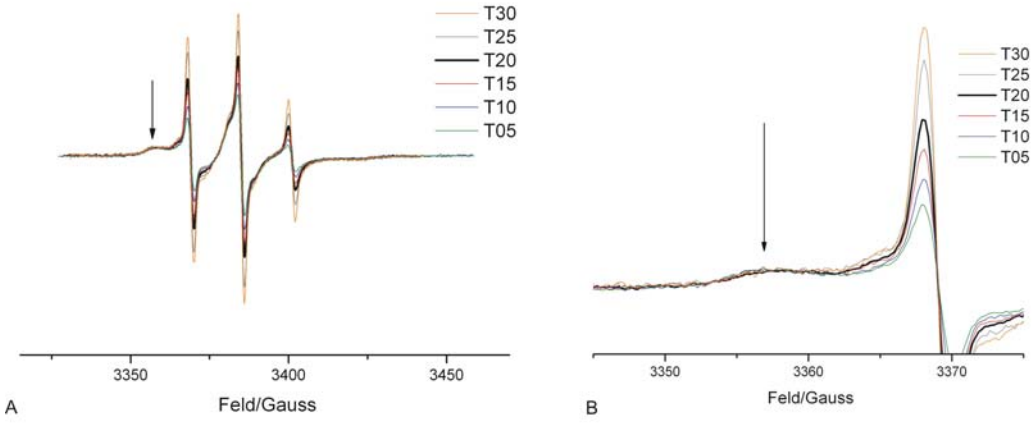


Abb. 3.4.12: Spektren der rekonstituierten Chimäre b in Abhängigkeit der Temperatur (A und B). B: Ausschnittvergrößerung der Spektren. Pfeil deutet die immobile Komponente an.

Der Temperatur-Effekt wird bei dem Fusionsprotein b im rekonstituierten Zustand getestet. Die Spektren sind auf die Amplitude der immobilen Komponente im niedrig-Feld (markiert durch den Pfeil) normiert. Auch eine Normierung auf die Amplitude der mobilen Komponente wäre möglich gewesen. Der Anteil der mobilen Komponente wird mit fallender Temperatur reduziert. Die Abbildung 3.4.12 B zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des Spektrums. Der Temperatureffekt der mobilen Komponente ist reversibel, da eine erneute Messung des Spektrums bei 20°C nach Beendigung der Temperaturuntersuchungen ein identisches Ergebnis zeigt wie die erste 20°C Messung. Dieses zeigt, dass die Veränderungen durch die Erniedrigung der Temperatur reversibel sind. Für die Chimären c und d können die gleichen Effekte beobachtet werden wie für das Fusionsprotein b. Die Chimäre a wird nicht getestet.

Die Daten werden anschließend nach dem Arrhenius Modell ausgewertet (Abb. 3.4.13), um die zum untersuchten Gleichgewicht gehörigen thermodynamischen Daten zu bestimmen.

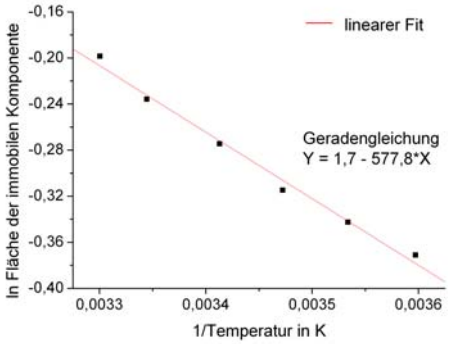


Abb. 3.4.13: Thermodynamische Auswertung der Spektren der Chimäre b nach Arrhenius, die bei den unterschiedlichen Temperaturen beobachtet werden. Der Graph der anderen Chimären ist ähnlich.

Es wird die Fraktion der Fläche der immobilen Komponente der Temperaturspekren in Bezug zur Gesamtfläche (Abb. 3.4.12 A) ermittelt. Anschließend wird der dekadische Logarithmus dieser Werte gegen die inverse Temperatur in Kelvin aufgetragen. Durch einen linearen Fit der aufgetragenen Werte wird mittels der Steigung und des Achsenabschnitts auf der Y-Achse die Geradengleichung ermittelt. Mit dieser können die thermodynamischen Daten berechnet werden. Die Tabelle 3.4.4 fasst diese Daten für die Chimären b, c und d zusammen.

Chimäre	Enthalpie ($kJmol^{-1}$)	Entropie ($Jmol^{-1}K^{-1}$)
b	5	14
c	3	9
d	2	6

Tabelle 3.4.4: Zusammenfassung der thermodynamischen Daten der Fusionsproteine b, c und d.

Aus dem Vergleich mit früheren Messungen des *Np*SRII/*Np*HtrII-157-S91R1 Komplexes mit den Werten 80 $Jmol^{-1}K^{-1}$ und 23 $kJmol^{-1}$, ergibt sich, dass die Werte bedeutend kleiner sind. Es wurde außerdem aus den früheren Messungen ein Gleichgewichts-Modell aufgestellt. Dieses besagt, dass das *Np*HtrII die intrinsische Eigenschaft besitzt 2 Komponenten, und zwar eine mobile und eine immobile, zu haben, die sich im Gleichgewicht befinden. Aus den Ergebnissen in dieser Arbeit kann festgestellt werden, dass dieses Modell auch für die Chimären b und d gültig ist.

Tieftemperatur-Messungen zur Bestimmug der Interspin-Abstände

Um nun die Konformation der verschiedenen Chimären und die Ausbildung eines 2:2 Komplexes im rekonstituierten und im solubilisierten Zustand zu untersuchen, werden Tief-Temperatur-Messungen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Experimente kann die Beobachtung der Austauschwechselwirkungen quantitativ bestätigt werden, indem der Abstand zwischen den

beiden benachbarten Positionen 173 im Komplex bestimmt wird. Auch hier wird als Beispiel das Spektrum des Fusionsproteins b dargestellt (Abb. 3.4.14).

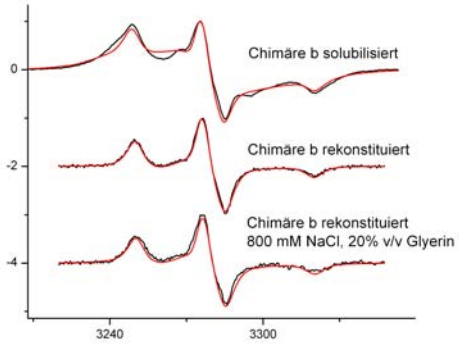


Abb. 3.4.14: Tief-Temperatur-Spektrum der Chimäre b (schwarz) in solubilisierter Form, in rekonstituierter Form und in Anwesenheit von 800 mM NaCl beim rekonstituierten Zustand. Fit (rot).

Die Tief-Temperatur-Spektren werden bei 160 K aufgenommen. Die solubilisierte Probe weist einen Spin-Spin-Abstand von 0,9 nm bei 30 % nicht interagierende Spins auf. Die rot gestrichelte Linie stellt den durchgeführten Fit dar. Bei der rekonstituierten Probe wird unter 150 mM Salz ein Abstand > 2 nm ermittelt. Dagegen zeigen sich bei Hoch-Salz Bedingungen (800 mM NaCl, eine höhere Konzentration ist bei den Tief-Temperatur-Messungen nicht möglich) keine relevanten Veränderungen, nur eine kleine Verbreiterung der Linien ist sichtbar. Die beste Simulation ergibt bei 15 % ig interagierender Spins einen Spin-Spin-Abstand von 0,9 nm. Die Zugabe des Salzes hat gezeigt, dass ca. 50 % der mobilen Spezies entfernt wird, so dass eine größere Fraktion an interagierender Spezies erwartet würde. Die Zugabe des Glycerols (zur Verhinderung der Bildung von Eiskristallen/Gefrierschutz) verursacht keine relevanten Unterschiede im Spektrum und kann deshalb vernachlässigt werden. Das Fusionsprotein c zeigt ähnliches Verhalten wie Fusionsprotein b. Die solubilisierte Probe zeigt einen Abstand von 0,9 nm (24 % interagierende Spins), wohingegen in der rekonstituierten Form ein Abstand von > 2 nm unter Niedrig-Salz gefunden wird.

Die Chimäre d zeigt das gleiche Verhalten. Es wird ebenfalls ein Abstand von 0,9 nm (33 % ige interagierende Spins) in der solubilisierten Probe berechnet. Im rekonstitiuerten Zustand unter Hoch-Salz erhält man einen Abstand von 0,9 nm und 17 % interagierende Spins. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.4.5 zusammengefasst.

	thermodynamische Daten		Solubilisiert		rekonstituiert			
					niedrig Salz		hoch Salz	
FP	Entropie ($Jmol^{-1}K^{-1}$)	Enthalpie ($kJmol^{-1}$)	Spin-Spin-Abstand in nm	inter-agierende Spins in %	Spin-Spin-Abstand in nm	inter-agierende Spins in %	Spin-Spin-Abstand in nm	inter-agierende Spins in %
b	-118	23	0,9	30	> 2	n.b.	0,9	15
c	-121	20	0,9	24	>2	n.b.	n.b.	n.b.
d	-133	19	0,9	33	n.b.	n.b.	0,9	17

Tabelle 3.4.5: Zusammenfassung der thermodynamischen Daten und der Spin-Spin-Abstände der untersuchten Chimären. (n. b. ≡ nicht bestimmt).

Tieftemperatur-Messungen zur Bestimmung eines Lichteffektes

Als letzte ESR-Messung wird der Einfluss von Licht auf das Verhalten der Chimäre b im Komplex mit *Np*SRII getestet (Abb. 3.4.15).

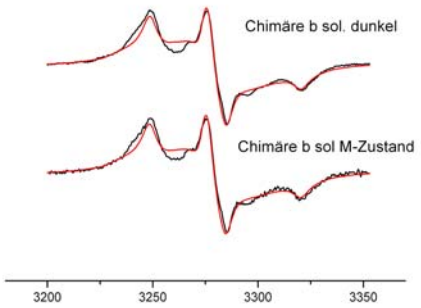


Abb. 3.4.15: Tief-Temperatur-Spektrum der Chimäre b (schwarz) im solubilisierten Zustand unter dunklen Bedingungen und im M-Zustand. Rot ist der Fit.

Die Tief-Temperatur-Messung des Fusionsproteins b wird mit der solubilisierten Probe durchgeführt. Die Probe wird zunächst unter Lichtausschluß gemessen. Anschließend wird von der gleichen Probe ein Spektrum unter Belichtung aufgenommen, indem das M-Intermediat durch kontinuierliche Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 500 nm während des Herunterkühlens der Probe von 273 K auf 160 K festgehalten wird. Die beiden Spektren sind vollkommen identisch, eine Konformationsänderung an dieser Position bei Aktivierung des Komplexes kann somit für Chimäre b nicht nachgewiesen werden.

3.5 Untersuchungen zur Funktionalität der *Np*HtrII/MCP2 Chimären

Um die Physiologie der Signaltransduktion näher zu studieren, wird in dieser Arbeit versucht die Funktionalität der Fusionsproteine, die aus dem N-terminalen Bereich des archaebakteriellen *Np*HtrII fusioniert mit dem C-terminalen Teil des *E. coli* Tar-Rezeptors bestehen, nachzuweisen. Es werden zwei verschiedene Ansätze verwendet, ein *in vitro* Phosphorylierungs-Assay und einen *in vivo* Versuch zur Phototaxis.

3.5.1 *In vitro* Phosphorylierungs-Assay

Der *in vitro* Phosphorylierungsversuch quantifiziert die Autophosphorylierungsaktivität der Histidin-Kinase CheA. Dieser Assay beruht auf der von Spudich & Trivedi benutzten Methode (Trivedi & Spudich, 2003) mit radioaktiven ATP (*). Die aufgereinigten Fusionsproteine im Komplex mit *Np*SRII oder der *Ec*Tar-Rezeptor werden zunächst in TKMD-Puffer + 0,05 % DDM (s. 2.6.7) über Nacht dialysiert. Anschließend werden sie in PC (L-α-Phosphatidylcholine, Dimyristoyl (C14:0)) Lipide rekonstituiert. Die Lipide werden in einem molaren Verhältnis von 150:1 (Lipide : *Np*SRII (Die Konzentartion wird über die Absorption von *Np*SRII bestimmt) oder Tar) eingesetzt. Die Lösung (Lipide + FP + *Np*SRII oder Tar) wird mit BioBeads versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die BioBeads werden abgetrennt und die Lösung mit Ultraschall behandelt bis sich die Proteine präzipitieren lassen. Die Proteinsuspension wird mit den entsprechenden aufgereinigten Signaltransduktions-Kaskaden Komponenten, dem Adapterprotein CheW, der Histidin-Kinase CheA, sowie in einigen Experimenten mit dem Response Regulator CheY im Reaktionsansatz vereinigt.
In einem ersten Versuchsteil wird der Tar-Rezeptor aus *E. coli* als positive Kontrolle getestet. Als Stimulus wird hier das chemische Substrat Aspartat zugefügt. Das Verhältnis zwischen den einzelnen Proteinen wird folgendermaßen gewählt, 1:2:5 (Trivedi & Spudich, 2003) und 1:4:12 (CheA : CheW : Tar-Rezeptor). Die Reaktion wird nach 10 und nach 30 sec durch Zugabe von 4 x LSB (s. 2.6.6) beendet.

	ohne Aspartat	mit Aspartat		ohne Aspartat	mit Aspartat	ohne Aspartat	mit Aspartat
Tar-Rezeptor			Tar-Rezeptor		265		61
01:02:05[(1)]		98	01:04:12[(1)]		211		49
		92			31		32
		98			111		114
	100	102			79		146
		85		100	95	100	51
		114			77		104
		81			39		122
		85			243		55
					69		99
					101		63

[(1)]Stöchiometrie (CheA : CheW : Rezeptor)

Tabelle 3.5.1: Quantitative Auswertung der Bandenintensität des CheA~P* beim Phosphorylierungs-Assay mit dem Tar-Rezeptor in zwei verschiedenen Stöchiometrien. Die Werte werden in Prozent angegeben, dabei wird das Ergebnis der Probe ohne Aspartat auf 100 % festgelegt und die Werte der Proben mit Aspartat entsprechend berechnet.

Die Tabelle 3.4.1 zeigt die quantitative Auswertung der Bandenintensität der CheA~P* Banden der einzelnen Versuche mit dem Tar-Rezeptor. Die Intensitäten werden in Prozent umgerechnet, wobei die Probe ohne Zugabe von Aspartat gleich 100 % gesetzt wird.

Es wird deutlich, dass die Werte sehr stark streuen und keine einheitliche Richtung einer Zu- oder Abnahme der Bandenintensität gefunden werden kann. Für eine positive Kontrolle sollten die Werte jedoch einheitlicher sein. Deshalb wird in diesem Versuchsteil keine weitere statistische Auswertung mit Standardabweichung durchgeführt.

Trotz der großen Varianz der Messwerte der positiven Kontrolle wird in einem weiteren Versuchsteil die Funktionalität der Chimären untersucht. Vielleicht liegt der Effekt der Lichtreaktion über dieser Varianz, so dass auswertbare Ergebnisse ermittelt werden. Zur Überprüfung der Chimäre wird die Autophosphorylierung der Histidin-Kinase CheA ausgenutzt, d. h. wird ein Lichtsignal vom Rezeptor *Np*SRII aufgenommen und an das Fusionsprotein weitergegeben, sollte dieses das Signal im Falle einer funktionsfähigen Chimäre zur Signal-Domäne weitergeleitet werden und dort das CheA aktivieren. Dazu werden pro Versuch drei verschiedene Ansätze durchgeführt (s. 2.6.7), bei denen die Proben mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen-Bereiche bestrahlt werden (Abb. 3.5.1).

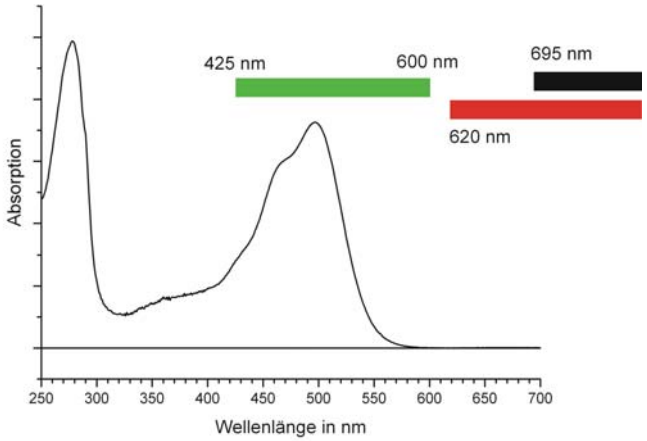


Abb. 3.5.1: Absorptionsspektrum des *Np*SRII mit dem Aktivierungsmaximum bei 498 nm. Die Balken repräsentieren den Wellenlängen Bereich der verwendeten Filter im Phosphorylierungs-Assay.

Die farbigen Balken (Abb. 3.5.1) repräsentieren den Wellenlängen-Bereich der verwendeten Filter zur Erstellung der Lichtsignale. Das Absorptionsspektrum zeigt die Absorption des Rezeptors *Np*SRII mit seinem Aktivierungs-Maximum bei 498 nm. Als negative Kontrolle wird das Filter, das Licht > 650 nm durchlässt, verwendet, um eventuelle Wärmeeffekte auszuschließen. Zusätzlich werden alle Fusionsproteine unter dunklen Bedingungen untersucht für die sowohl ein braunes Reaktionsgefäß, als auch ein Filter > 695 nm verwendet wird. Beide Filter lassen nur Licht passieren, das den Rezeptor nicht aktivieren kann. Theoretisch sollte nur das grüne Filter (425–600 nm) Licht hindurchlassen, das zu einer Aktivierung des *Np*SRII führt. In diesem Fall sollte das Signal auf die Chimäre übertragen werden und die Autophosphorylierung des CheA ansteigen. Die Reaktion wird nach 30 sec Bestrahlung gestoppt. Die Intensität der radioaktiv markierten (*) CheA~P-Bande wird anschließend auf einem SDS-Gel überprüft und mit Hilfe eines Phospho-Imagers ausgewertet.
Der Phosphorylierungs-Assay wird mit den Chimären a - e, 102, 116 und 223 durchgeführt. Abbildung 3.5.2 zeigt ein ausgewertetes Gel als Beispiel für den Phosphorylierungs-Assay.

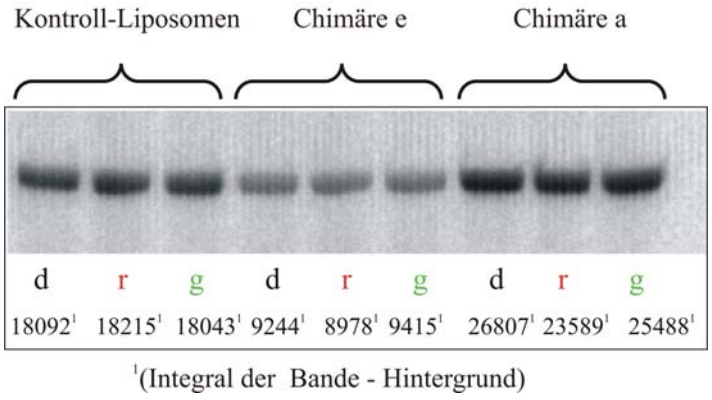


Abb. 3.5.2: Beispiel eines mit Hilfe des Phopho-Imagers ausgewerteten SDS-Gels des Phosphorylierungs-Assays. d = dunkles Filter > 695 nm; r = rotes Filter > 620 nm; grünes Filter (425 – 600 nm).

Die Banden repräsentieren das phosphorylierte* CheA. Die ersten drei Spuren werden mit Kontroll-Liposomen, Liposomen ohne rekonstituierten Rezeptor und ohne Fusionsprotein, durchgeführt. Jedoch erfolgt die Zugabe des CheA, CheW und des ATP*. Zusätzlich ist noch jeweils ein Versuch der zwei Chimären, e und a, dargestellt. Die unter jeder Spur erscheinende Zahl repräsentiert die quantitative Auswertung der Intensität der jeweiligen Bande (Integral der Bande – Hintergerund). Ist die Chimäre funktionell sollte die Bandenintensität bei einer Probe jeweils von links nach rechts zunehmen, da die Lichtanregung rechts (grüner Filter) am optimalsten ist, so dass es zu einer starken CheA Autophosphorylierung kommen sollte. Mit jedem Fusionsprotein wird dieser Versuch mindestens 6 x durchgeführt, so dass eine statistische Auswertung möglich ist. Die Tabelle 2.5.2 zeigt eine Auflistung der Werte der Bandenintensitäten aus den einzelnen Versuchen der Chimären und der Kontroll-Liposomen.

	dunkel	rot	grün
Kontroll-Liposomen	12977	12583	18223
	18463	19313	19248
	12224	13904	11683
	26269	27149	26301
	26453	26313	24413
	19405	20793	20973
	18092	18215	18044
	21560	17399	18222
	18817	18433	17649
FP-a	7096	6068	6211
	5386	5204	5776
	6740	6046	5764
	17298	15397	13700
	14642	14734	15237
	13042	13010	13356
	36514	34280	37232
	33711	36703	38800
	39022	33111	36366
	26807	23589	25488
FP-b	10636	12054	10716
	11186	11106	11318
	9636	11027	9225
	14157	13930	14628
	13381	15808	13565
	14702	14291	15623
FP-c	3235	2855	3376
	2752	2635	2826
	2693	2976	3430
	28781	30755	31316
	25554	29041	27851
	28034	34117	32816
	6409	6838	7184
	6344	6147	5868
	5677	6693	5890

	dunkel	rot	grün
FP-d	2700	2859	2593
	3274	2905	3040
		2816	2807
	50847	46479	44133
	50304	48944	49542
	38964	46182	48328
FP-e	45696	56009	55835
	54853	59896	58148
	58863	8807	59266
	51524	47814	49275
	48749	45435	48257
	55195	47236	47430
	8997	9120	9270
	9244	8978	9415
FP-102	23577	20579	21273
	21323	23194	25042
	45620	23254	21836
	54506	53398	54644
	52387	63017	58464
	52825	50549	56640
FP_116	23928	24329	24299
	24349	25860	24038
	26628	26349	25249
	2702	2393	2625
	2546	2458	2435
	1956	2342	2631
FP_223	68608	70545	72062
	70273	69292	70116
	63245	66373	69409
	2344	2281	2535
	2248	2776	2577
	1928	2554	2585

Tabelle 3.5.2: Auflistung der Werte der Bandenintensitäten aller durchgeführten Versuche der jeweiligen Fusionsproteine und der Kontroll-Liposomen. Die blauen Werte werden von der anschließenden Auswertung ausgeschlossen, da sie innerhalb ihres Versuches (Zeile) zu starke Abweichungen zeigen.

Aus dieser Tabelle (Tab. 3.5.2) lässt sich nur eine starke Streuung der Werte zwischen den einzelnen Versuchen (einzelne Zeilen) erkennen. Zur anschließenden Auswertung werden die

Bandenintensitäten jeweils durch die Stundenanzahl der Belichtung beim Phospho-Imager dividiert um eine Normierung auf 1 h Belichtungszeit zu erhalten. Zusätzlich werden die Werte eines Versuchstages summiert und durch die hundertfache Anzahl der Messwerte dividiert. Hieraus ergibt sich ein Radioaktivitäts-Faktor. Anschließend werden die auf 1 h Belichtungszeit normierten Werte durch diesen Faktor dividiert. Daraus ergeben sich auf die Belichtungszeit und auf 100 cpm/pmol Radioaktivität normierte Werte. Weiterhin wird der Mittelwert aus den verschiedenen Versuchen, jeweils für die Bedingungen dunkel, rotes und grünes Filter pro Chimäre, mit der entsprechenden Standardabweichung ermittelt. Der normierte Mittelwert der dunklen Probe wird auf 100 % gesetzt. Anschließend werden die prozentuallen Anteile der beiden entsprechenden Werte für den roten Filter und den grünen Filter relativ zum dunklen Filter berechnet.

Fusions-protein	rel. MW nor. auf 1h BZ u. 100 cpm/pmol RA	rel. MW nor. auf 1h BZ u. 100 cpm/pmol RA	rel. MW nor. auf 1h BZ u. 100 cpm/pmol RA	Standard-abweichung	Standard-abweichung
	dunkel	rot	grün	rot	grün
KL	100	102	101	14	15
FP-a		93	96	8	6
FP-b		106	102	6	8
FP-c		106	108	8	10
FP-d		95	94	3	7
FP-e		96	98	3	2
FP-102		102	104	9	6
FP-116		97	99	4	5
FP-223		106	108	7	2

Tablle 3.5.3: Statistische Auswertung der Bandenintensitäten der Phosphorylierungs-Experimente mit den Kontroll-Liposomen und den Chimären.

In der folgenden Abbildung 3.5.3 ist die graphische Darstellung dieser statistischen Auswertung dargestellt.

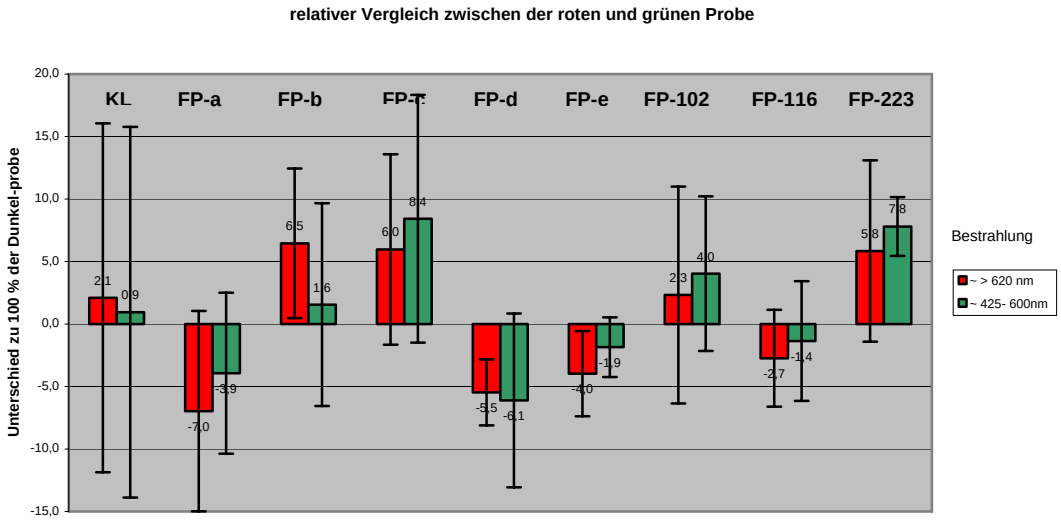


Abb. 3.5.3: Statistische Auswertung des relativen Vergleichs der roten und der grünen Probe im Verhältnis zu 100 % der Dunkel-Probe mit Angabe der Standardabweichung. Die Werte sind auf 1 h Belichtungszeit beim Phospo-Imager und 100 cpm/pmol Radioaktivität normiert.

Positive Werte entsprechen einer photophoben Antwort auf den Lichtreiz, negative Werte repräsentieren dagegen entsprechend die photophile Antwort. Betrachtet man die Standardabweichung zeigen alle Fusionsproteine keine signifikante Antwort im Verhältnis zu den Kontroll-Liposomen, so dass keine Aussage über die Funktionalität getroffen werden kann.
In einem nächsten Versuchsteil wird die Phosphatübergabe vom CheA auf den Response Regulator CheY analysiert. Der Versuchsaufbau entspricht dem ersten Teil des Phophorylierungs-Assays mit folgenden Änderungen: Zugabe des CheY mit einem 6,7 fachen molaren Überschuss im Verhältnis zum CheA und einer Belichtungszeit von 30 bzw. 10 sec. Mit den beiden Chimären c und d werden jeweils 3 Versuche durchgeführt. Die ermittelten Bandenintensitäten des CheY~P* werden nicht normiert, da alle Versuche unter den gleichen Bedingungen ausgeführt werden. Es erfolgt lediglich eine Umrechnung in Prozentsätze. Dazu werden die einzelnen Banden-Werte der dunklen Probe auf 100 % gesetzt und der prozentualle Anteil der übrigen Werte (rot und grünes Filter) für jeden Versuch einzeln ermittelt. Die Tabelle 3.5.4 zeigt die umgerechneten Prozentsätze der einzelnen Versuche.

	dunkel	rot	grün
FP-c 10"	100	109	115
		95	106
		91	93
FP-c 30"	100	120	115
		87	73
		102	116
FP-d 10"	100	106	72
		103	118
		95	102

Tabelle 3.5.4: Auflistung der prozentuellen Werte bezogen auf 100 % der Dunkel-Probe der CheY~P*-Banden des Phosphorylierungs-Assays der Chimären c und d.

Wie sich allerdings aus der Tabelle 3.5.4 erkennen lässt, streuen die Werte ebenfalls sehr stark. Dieses bedeutet, dass die Lichtinduzierte Reaktion der Proteine nicht stärker ist als die vorkommende Varianz in den Messwerten, so dass keine Aussage über die Funktionalität der Chimären mit Hilfe des Phosphorylierungs-Assays gemacht werden kann.

3.5.2 *In vivo* Untersuchungen zur Funktionalität der Chimären im Organismus *E. coli*

Die *in vitro* Phosphorylierungs-Versuche sollen durch physiologische Experimente ergänzt werden. Hierzu wird ein *in vivo* Schwimmversuch durchgeführt. Gleichzeitig dient dieser Versuch dem Aufbau eines Modellsystems der Phototaxis in dem Organismus *Escherichia coli*. Die bisher verwendeten *in vitro* Testsysteme könnten durch ihre künstlich hergestellten Bedingungen zu Artefakten führen. Ein *in vivo* System würde dieses ausschließen. Da noch kein geeignetes Expressionssystem im Archaebakterium *Natronomonas pharaonis* existiert, wird in dieser Arbeit versucht Phototaxis im Bakterium *E. coli* zu etablieren, wobei die im Kapitel 3.1.7 beschriebenen Chimären verwendet werden.

3.5.3 Phototaxismessungen bzw. Schwimmversuch-Messungen

Das Verhalten der Bakterien beim Schwimmversuch kann nur mit „schwimmfähigen“ bzw. mobilen Stämmen durchgeführt werden. Dieses wird durch Selektion bezüglich der Mobilität erreicht. Dazu erfolgt die Anzucht der Zellen auf Schwarmplatten. Bei diesen speziellen Agarplatten wird ein Zelltropfen auf die Mitte der Platte gesetzt. Die Inkubation bei 30°C führt zu einem Ausschwärmen der Bakterien, da sie dem Nährstoffangebot folgen. Vom äußersten Zellrand werden Bakterien entnommen und erneut auf die Mitte einer Schwarmplatte entlassen. Diese Methode wird ca. 4 - 6 Mal wiederholt bis die Zellen eine gute Mobilität aufweisen, die durch Mikroskopieren überprüft wird. Anschließend erfolgt eine Anzucht bei 120 – 150 rpm und 30°C im Flüssigmedium, Trypton-Medium (s. 2.5.1), das ein geringes Nahrungsangebot aufweist. Die Schwimmversuch-Messungen werden wie in Kapitel 2.8.7 beschrieben durchgeführt. Dabei sind die gemessenen Spannungs-Werte proportional zu der Zellzahl im Spot. Durch eine entsprechende Normierung können die Werte dargestellt und untereinander verglichen werden.
In einem ersten Versuchsteil werden mit dieser Apparatur (s. 2.8.7) Kontroll-Messungen durchgeführt. Das Archaebakterium *N. pharaonis* dient dabei als positive Kontrolle. Die Zellen besitzen den *Np*SRII-Rezeptor und die notwendigen Signaltransduktions Komponenten. Eine Selektion der Bakterien erfolgt ebenfalls auf Schwarmplatten mit einem Spezial-Medium (s. 2.5.1). Anschließend werden sie auf eine phototaktische Reaktion auf blau-grünes Licht der Wellenlänge 498 nm getestet. Die Zellen sollten eine photophobe Antwort zeigen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.5.4 dargestellt.

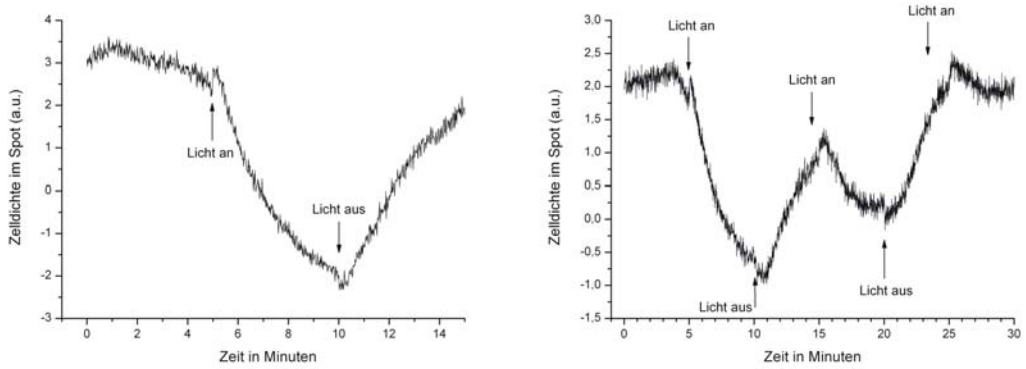


Abb. 3.5.4: Phototaxis-Kontroll-Messungen am Bakterium *N. pharaonis*. Das blau-grüne Licht wird nach 5 minütiger Basislinie angeschaltet und nach 5 min wieder ausgeschaltet. In der rechten Abbildung wird dieses Verfahren einmal wiederholt.

In beiden Versuchen wird eine 5 minütige Basislinie gemessen und anschließend das blau-grüne Licht für weitere 5 min angeschaltet. Die Zellen zeigen eine sehr deutliche Reaktion auf das Lichtsignal indem sie aus dem Lichtfleck heraus schwimmen, was durch einen starken Abfall der Kurve verdeutlicht wird. Durch die Ausschaltung des negativen Reizes wird ein Anstieg der Kurve beobachtet. Die Zellen schwimmen zurück in den Spot. Wenn das Lichtsignal erneut angeschaltet wird, fällt die Kurve, d. h. die Fluchtreaktion wird wiederholt hervorgerufen (Abb. 3.5.4 rechts). Nach dem Ausschalten des Signals beginnen die Bakterien zurück zu schwimmen und ein Anstieg der Kurve kann beobachtet werden. Dieses Verfahren lässt sich wiederholt durchführen.

In weiteren Kontroll-Messungen werden der *E. coli* Stamm RP437wt und der *E. coli* Stamm UU1250 ohne ein transformiertes Plasmid als negative Kontrollen gemessen. Die Durchführung dieser Experimente erfolgt wie in Kapitel 2.8.7 beschrieben. Die Zellen werden bis auf eine OD von 0,3 - 0,5 heran gezogen und dann mit IPTG und Retinal induziert. Die Phototaxis-Messungen erfolgen vor der Induktion und in bestimmten Zeitintervallen nach der Induktion. Als Beispiel für diese Experimente sind in der Abbildung 3.5.5 jeweils eine Messung für jeden Kontroll-Stamm dargestellt.

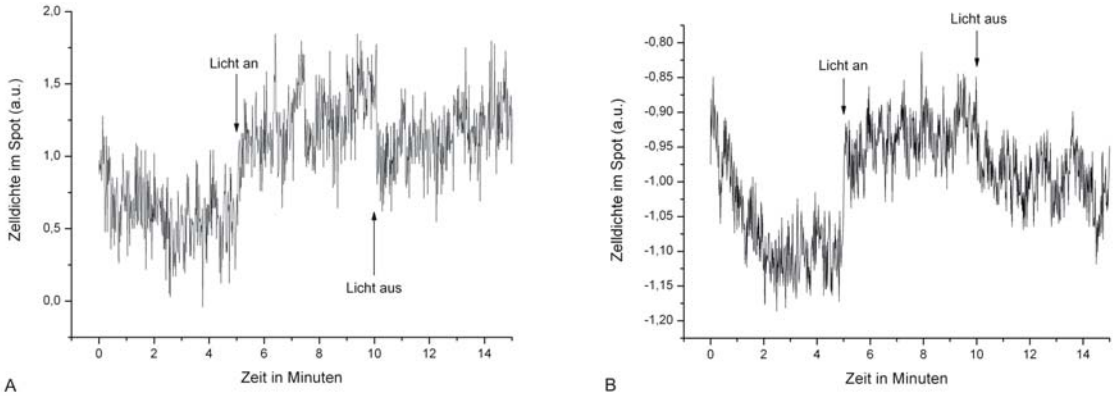


Abb. 3.5.5: Phototaxis-Messungen des *E. coli* Stammes RP437 2,5 h nach der Induktion (A) und der *E. coli* Stammes UU1250 2,5 h nach der Induktion (B). Beide Stämme zeigen eine Reaktion auf das blau-grüne Lichtsignal (Wright *et al*., 2006).

Die gezeigten Messungen der Stämme RP437 und UU1250 erfolgen 2,5 h nach der Induktion. Jedoch zeigen alle Messungen bei unterschiedlichen Zeiten nach Induktion, als auch bei der Messung vor Induktion ein gleiches Verhalten der Bakterien. Wie zu erkennen ist, zeigen beide Stämme eine sehr schwache Reaktion auf das blau-grüne Lichtsignal. Der anfänglich leichte Anstieg der Kurve nach Belichtung könnte zwei verschiedene Ursachen haben. Die erste Möglichkeit beruht auf einer Änderung der Lichtstreuung, die durch das Taumeln der Bakterien ausgelöst wird, so dass ein Anschein einer Akkumulation der Zellen in dem Lichfleck hervorgerufen wird. Zweitens könnte das Verhalten der Bakterien auf einer von Wright *et al.* postulierten Antwort von *E. coli* Wildtyp Zellen beruhen, wobei es sich um eine komplizierte Reaktion handelt (Wright *et al.*, 2006). Wright *et al.* berichtet, dass enterische Zellen bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 390 – 530 nm kräftig taumeln, dann graduell langsamer werden und schließlich paralysiert sind. Dadurch könnten die Bakterien durch zufälliges Hineinschwimmen in den Lichtfleck gefangen werden und es kommt zu einer tatsächlichen Anhäufung der Zellen.

Im zweiten Teil des Schwimmversuch-Experimentes werden die Chimären (s. Aufzählung unten) getestet. Dazu werden von allen Chimären jeweils entweder Messungen bei 30, 60, 90, 120, und 150 min oder 60, 120, 180, 240 min nach der Induktion mit IPTG und Retinal durchgeführt. Folgende Stämme werden getestet:

E. coli RP437 mit
1. pSM_CT_pTrcNpSRII_a und pTrc_*Np*HtrIIMCP2_237_266 (a)
2. pSM_CT_pTrcNpSRII_a und pTrc_*Np*HtrIIMCP2_237_248 (b)
3. pSM_CT_pTrcNpSRII_a und pTrc_*Np*HtrIIMCP2_223_248 (c)
4. pSM_CT_pTrcNpSRII_a und pTrc_*Np*HtrIIMCP2_237_228 (d)
5. pSM_CT_pTrcNpSRII_a und pTrc_*Np*HtrIIMCP2_223_228 (e)
6. pSM_CT_pTrcNpSRII_a und pSM_Fus_HtrIIMCP2_123_254 (Hippler-Mreyen, 2003a)
7. pSM_CT_pTrcNpSRII_a und pSM_Fus_HtrIIMCP2_116_247 (Hippler-Mreyen, 2003a)
8. pSM_CT_pTrcNpSRII_a und pTrc_*Np*HtrIIwt_His (Mennes, 2003)
9. pACYC_pTrc_*Np*SRII-pTrc-FP-a
10. pACYC_pTrc_*Np*SRII-pTrc-FP-b
11. pACYC_pTrc_*Np*SRII-pTrc-FP-c
12. pACYC_pTrc_*Np*SRII-pTrc-FP-d
13. pACYC_pTrc_*Np*SRII-pTrc-FP-e

Die Abbildung 3.5.6 zeigt die Ergebnisse der Phototaxis-Messungen der Stämme 1 – 8.

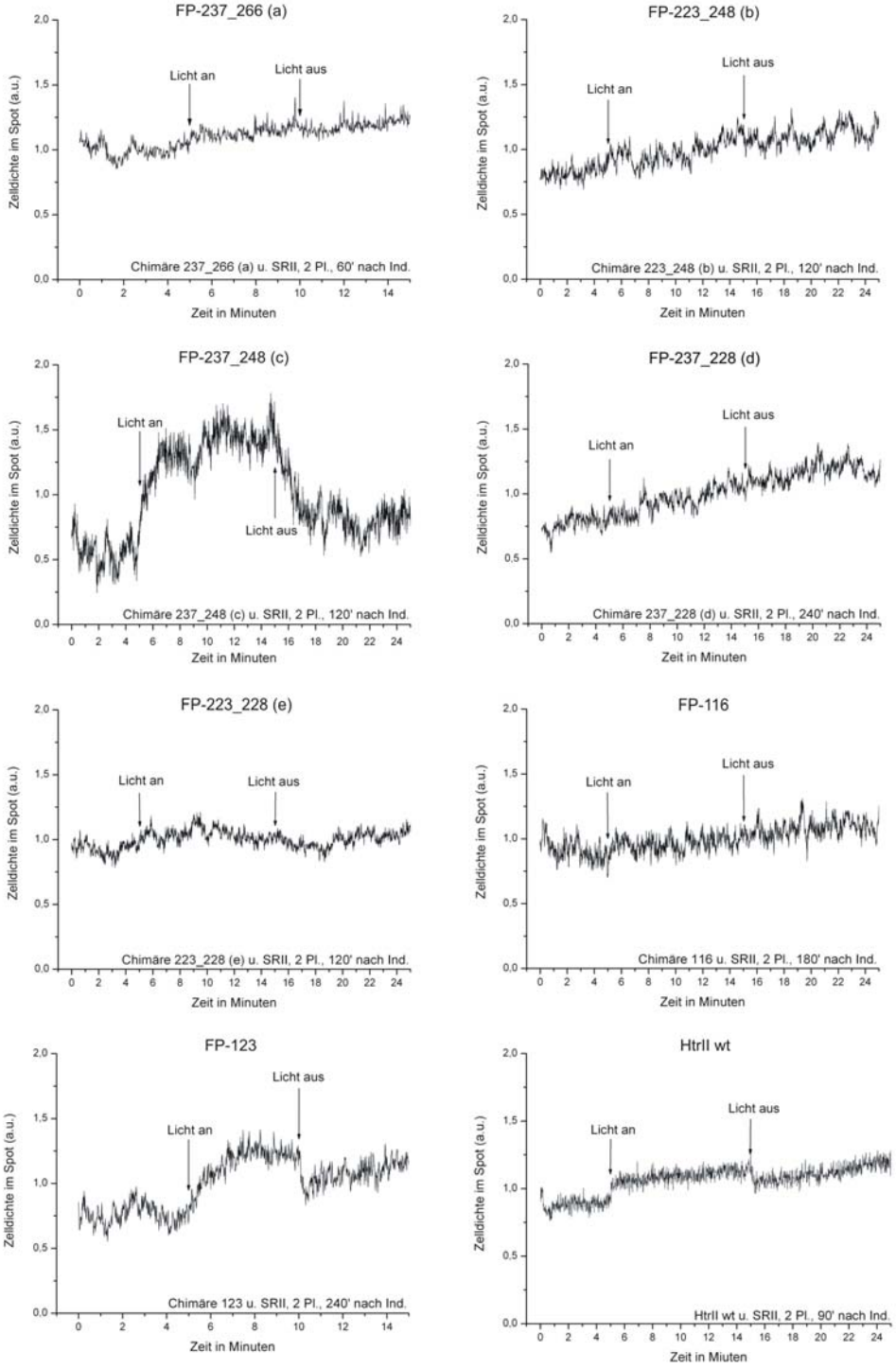


Abb. 3.5.6: Phototaktische Messungen der Fusionsproteine mit *Np*SRII auf zwei Plasmiden im *E. coli* RP437 Stamm nach Induktion mit IPTG und Retinal.

Bei den Messungen wird eine 5 minütige Basislinie gemessen. Dann erfolgt eine blau-grüne Licht Bestrahlung der Zellen für 5 oder 10 min bevor es wieder für 5 oder 10 min ausgeschaltet wird. Die Experimente in der Abbildung 3.4.24 werden alle mit den RP437 Stämmen, die die Chimäre und *Np*SRII auf zwei Plasmiden besitzen, durchgeführt. Bei den Fusionsproteinen c und 123 lässt sich eine schwache Reaktion auf das Licht erkennen, die analog zum Verhalten der negativen Kontrollen ist. Die restlichen Chimären zeigen jedoch keine sichtbare Änderung in ihrem

Schwimmverhalten. Die fehlende schwache Antwort auf das Lichtsignal, analog zur negativen Kontrolle, könnte vielleicht auf eine geringe photophobe Reaktion der Zellen hinweisen.
Phototaxis-Messungen der Stämme mit dem Fusionsproteine a bis e und dem *Np*SRII-Gen auf einem Plasmid sind in der Abbildung 3.5.6 dargestellt.

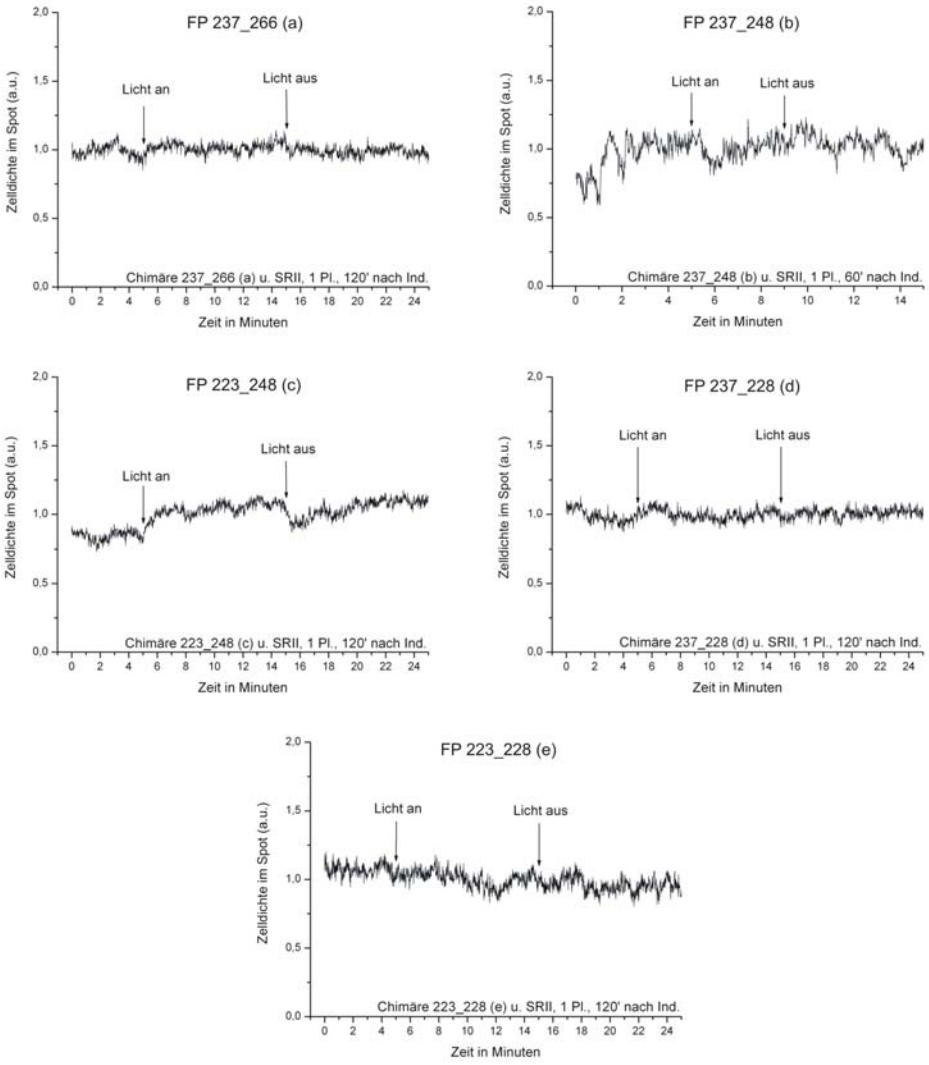


Abb. 3.5.6 Messungen der phototaktischen Reaktion der Bakterien mit dem Fusionsprotein und dem *Np*SRII auf einem Plasmid im *E. coli* RP437 Stamm nach Induktion mit IPTG und Retinal.

Auch in diesen Fällen wird eine Basislinie von 5 min gemessen bevor die Beleuchtung angeschaltet wird. Diese Inkubation erfolgt analog zu den vorigen Messungen für 5 oder 10 min. Anschließend wird das Lichtsignal ausgeschaltet und das Experiment weitere 5 oder 10 min verfolgt. Die Ergebnisse entsprechen den bereits gemachten Beobachtungen, dass die Chimäre c eine schwache Reaktion auf das Licht, analog zu den negativen Kontrollen, zeigt und dass bei den restlichen Fusionsproteinen keine Änderung im Schwimmverhalten sichtbar ist.
Weder der *in vitro* Phosphorylierungs-Assay, noch der *in vivo* Schwimmversuch zur Phototaxis zeigen eindeutige Ergebnisse bezüglich der Funktionalität der Chimären.

4 Diskussion

In der archaebakteriellen Phototaxis wird ein Lichtsignal aus der Umgebung von Rezeptoren, den sensorischen Rhodopsinen, aufgenommen und durch einen noch unbekannten Mechanismus auf die jeweils entsprechenden Transducer-Moleküle übertragen. Diese Proteine, die eine große Homologie zu den Chemotaxis-Rezeptoren aufweisen, leiten das Signal weiter und aktivieren eine Signaltransduktionskaskade, die identisch zu dem Zwei-Komponenten-System der Chemotaxis aus *E. coli* ist.

In dieser Arbeit sollen Informationen über die Struktur des *Np*HtrII ermittelt und die Bindung zum Rezeptor-Molekül untersucht werden. Dazu soll der Transducer HtrII aus *Natronomonas pharaonis* heterolog im Modellorganismus *E. coli* exprimiert werden. Bisher gibt es lediglich strukturelle Informationen über den transmembranen Bereich des *Np*HtrII, so dass weitergehende Informationen über die Signalweiterleitung ins Zellinnere nur aus den Homologievergleichen zur Chemotaxis zugänglich sind. Zudem konnten bisher nur verkürzte Transducer-Fragmente heterolog in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt werden, wodurch die Aussagekraft von *in vitro* Studien eingeschränkt ist.

Zur Aufklärung dieser Daten sollen Gelfiltrations-Experimente, CD-Spektroskopie und Photozyklus-Messungen eingesetzt werden. Hinweise auf die Struktur des Proteins sollen zudem durch FTIR-Messungen erhalten werden.

Die Bindung des Transducers an den Rezeptor soll zusätzlich durch ITC-Messungen untersucht werden.

Des Weiteren werden in dieser Arbeit Kristallisations-Ansätze zur Strukturaufklärung vom *Np*HtrII, als auch von zytoplasmatischen Konstrukten des Transducers durchgeführt.

Ein zusätzlicher Teil dieser Arbeit beruht auf der Anwendung der ESR-Spektroskopie mit side-directed spin labeling, die eine Basis für das Verständnis der Signalweiterleitung im *Np*HtrII liefern soll.

In einem letzten Teil dieser Arbeit soll die Physiologie der Signaltransduktion näher untersucht werden. Hierzu sollen Fusionsproteine auf ihre Funktionalität geprüft werden mittels eines *in vitro* Phosphorylierungs-Assays und eines *in vivo* Schwimmversuchs.

4.1 Struktur- und Bindungs- Charakterisierung des *Np*HtrII

Zur Charakterisierung des *Np*HtrII werden ein stabiles Expressionssystem und ein Aufreinigungsprotokoll benötigt. Ein geeignetes Expressionssystem im natürlichen Wirt *N. pharaonis* existiert bis jetzt noch nicht. Außerdem würde eine Zellanzucht der Archaebakterien sehr lange dauern. Eine Isolierung ohne Überexpression scheidet ebenfalls aus, da der Transducer nur in einer geringen Kopienzahl von ca. 430 Kopien in der Zelle vorkommt (Otomo et al., 1989). Daher erfolgt die Expression mit Hilfe des pET-Systems heterolog im Bakterium *E. coli*. Dieses erlaubt weiterhin eine schnelle und einfache Zugänglichkeit für Modifikationen, wie Mutationen oder Deletionen.

Durch die Klonierung eines C-terminalen His-Tags an das Gen des Transducers, kann eine einfache und schnelle Aufreinigung mittels Ni-Affinitätschromatographie analog zu der Aufreinigung der verkürzten *Np*HtrII-Fragmente (Hippler-Mreyen, 2003; Wegener, 2000) erfolgen. Die Ausbeute des Transducers liegt mit 0,6 - 0,9 mg pro Liter Zellkultur in der Größenordnung wie sie auch für die verkürzten Fragmente *Np*HtrII$_{101}$ und *Np*HtrII$_{82}$ (Hippler-Mreyen, 2003) und für das von Hohenfeld *et al.* (Hohenfeld *et al*., 1999) isolierte *Np*SRII-His erhalten wurden. Im Gegensatz zu früheren Versuchen von Wegener (Wegener, 2000) den Transducers aufzureinigen, werden in dieser Arbeit Protease-Inhibitoren zum resuspendierten Zellpellet zugefügt, um einer vorzeitigen Degradation durch endogene Proteasen vorzubeugen. Das *Np*HtrII kann dadurch mit einer Reinheit > 90 % aufgereinigt werden.

Erste Strukturuntersuchungen des *Np*HtrII-Moleküls werden mit Hilfe von spektroskopischen Methoden durchgeführt. Durch CD Analysen kann gezeigt werden, dass der solubilisierte Transducer eine ähnliche Sekundärstruktur-Verteilung aufweist wie die aufgereinigten und solubilisierten Chemorezeptoren, wie z.B. der Tar-Rezeptor *(Foster et al.,* 1985) oder der Trg-Rezeptor (Burrows *et al*., 1989) aus *E. coli*, die beide einen α-helikalen Anteil von ca. 80 % aufweisen. Da eine große Homologie zwischen den archaebakteriellen Transducern und den eubakteriellen Chemorezeptoren besteht, kann dementsprechend vermutet werden, dass der Transducer eine korrekte Faltung aufweist. FTIR-Messungen unterstützen dieses Ergebnis, da auch hier große Bereiche mit einer α-helikalen Sekundärstruktur vorhergesagt werden.

Aus der weiteren Charakterisierung des Transducers mit Hilfe von Gelfiltrations-Experimenten wird die Anwesenheit von verschiedenen oligomeren Spezies nachgewiesen.

Eine Oligomerisierung in solubilisierter Form findet sowohl für den Transducer, als auch für den Rezeptor-Transducer-Komplex statt.

Zusätzlich wird eine Bindung des Transducers an den *Np*SRII-Rezeptor beobachtet, welche durch Phototzyklus- und ITC-Messungen bestätigt wird. Durch diese nachgewiesene Komplex-Bildung mit dem Rezeptor wird die Annahme einer korrekten Faltung des Proteins zusätzlich für den transmembranen bzw. in die Rezeptorbindung involvierten Teil unterstützt.

Aus den Gelfiltrations-Experimenten können detaillierte Informationen gewonnen werden. Es wird deutlich, dass der Transducer nicht in monomerer Form vorkommt, sondern eine hohe Bereitschaft zur Oligomerisierung zeigt. Sogar die dimere Form, die aus einem coiled coil Bündel besteht, kommt nur zu 16 % des Gesamtvorkommens vor. Stattdessen formt der Transducer eher höhere, oligomere Spezies, die als „Trimers of Dimers“ und als größere Oligomere dieser Einheit bestimmt werden. Eine klare Bevorzugung haben die „Trimers of Dimers“, die laut Untersuchungen an den Chemorezeptoren eine funktionelle Einheit darstellen (Francis *et al.*, 2004;Kim *et al.*, 1999). Aber auch die höheren oligomeren Aggregate aus den Dimeren sind stark vertreten. Ein Grund für diese Oligomerisierung könnte in unspezifischen Bindungen begründet liegen. Die sehr langen zytoplasmatischen coiled coil Bündel könnten miteinander in unspezifischen Kontakt treten. Jedoch wahrscheinlicher ist eine Clusterbildung der Transducer auf Grund von spezifischen Interaktionen an der Signal-Domäne. Ein weiterer Hinweis für spezifische Wechselwirkungen wird durch die bestehende Oligomerisierung des Transducers im Komplex mit *Np*SRII verdeutlicht. Auch unter diesen Bedingungen werden höhere, oligomere Formen gebildet, deren relative Verteilung sogar signifikant geändert wird. Die größeren Aggregate nehmen stark zu. Zusätzlich scheint das *Np*HtrII-Dimer nicht mehr zu existieren. Weiterhin wird durch die Bindung des Transducers an den Rezeptor in solubilisierter Form keine 1:1 Stöchiometrie gefunden, die von verschiedenen anderen Studien, wie z.B. ITC-Messungen, mit verkürzten Transducer-Fragmenten, denen fast die komplette zytoplasmatische Domäne fehlt (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003) nachgewiesen wurde. Die Abwesenheit dieses erwarteten 1:1 Komplexes weist demnach daraufhin, dass das „Clustering“ bzw. Zusammenlagern des Rezeptor-Transducer-Komplexes zu höheren oligomeren Spezies durch die Anwesenheit des *Np*SRII nicht gestört, sondern eventuell sogar gefördert wird.

Zusätzlich wird durch eine weitere Beobachtung deutlich, dass sowohl der Transducer, als auch die *Np*HtrII/*Np*SRII-Komplexe eine Zeitabhängigkeit und eine Temperaturabhängigkeit aufweisen. Bei beiden Formen erhöht sich die Aggregat-Bildung nach einer längeren Inkubationszeit und/oder einer höheren Temperatur. Außerdem ist beachtenswert, dass selbst nach längerer Zeitspanne nicht das komplette freie *Np*SRII verbraucht worden ist, sondern immer noch freie Formen existieren. Dieses könnte andeuten, dass die Clusterbildung einen komplizierten Vorgang repräsentiert, bei dem die spezifischen Interaktionen genauestens überprüft werden.

Die Ergebnisse aus den Gelfiltrations-Experimenten müssen allerdings mit Vorsicht interpretiert werden, da sie, auf Grund von methodischen Begrenzungen, nicht unter physiologischen Salz-Konzentrationen durchgeführt wurden. Zusätzlich lassen sich keine genauen Aussagen über die Zusammenlagerung der höheren Aggregate treffen. Trotzdem kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die Formung der Transducer-, als auch der Rezeptor-Transducer-Cluster eine intrinsische Eigenschaft dieser Proteine ist, da sie eine große Homologie zu den Chemotaxis-Rezeptoren aufweisen. Für die MCPs wurde diese Art von Clusterbildung postuliert,

wodurch große Signalkomplexe zusätzlich mit den entsprechenden Che-Proteinen der anschließenden Zwei-Komponenten-Kaskade entstehen (Kim *et al*., 2002) (Abb. 4.1 A).

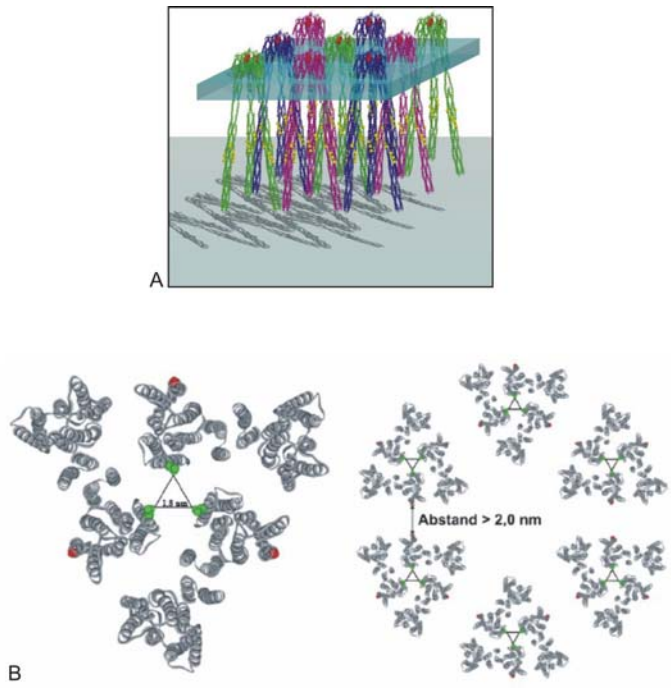


Abb. 4.1: A: Modell der Cluster-Bildung bei den Chemorezeptoren nach Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2002). Jedes „Trimer of Dimer“ ist ein einer Farbe gekennzeichnet.
B: Modell der möglichen Anordnung der Cluster-Bildung aus „Trimers of Dimers“ des *Np*SRII/*Np*HtrII-Komplexes (Martell, 2005).

Die „Trimer of Dimer“ scheinen auch im Falle der Photorezeptor-Transducer-Komplexe eine natürliche Einheit zu sein, die eine klare Priorität zur Selbstorganisation zu höheren geordneten Clustern besitzen. Ein Modell dieser Cluster-Bildung wurde auch schon von S. Martell (Martell, 2005) aufgestellt, bei dem sich 18 Komplex-Dimere bestehend aus 6 „Trimer of Dimers“ zu einem höheren Cluster zusammen lagern (Abb. 4.1 B). Es kann spekuliert werden, dass eines der beobachteten höheren oligomeren Aggregate diesen Komplex repräsentieren könnte. Die Abweichung der kleineren beobachteten Cluster im Gelfiltrations-Experiment könnte vielleicht durch die Verwendung von Detergenz-Molekülen anstatt von natürlichen Lipiden verursacht werden. Diese bilden eine künstliche Mizelle als Modell der Membran in der Zelle und stellen somit keine natürliche Umgebung der Proteine dar.

Zusätzlich könnte vielleicht die Beobachtung, dass besonders der Transducer eine deutliche Tendenz zeigt, schon bei mikromolaren Konzentrationen zu präzipitieren, einen weiteren Hinweis für eine Clusterbildung des Proteins geben. Der präzipitierte Transducer könnte dabei durch unlösliche, höher geordnete Cluster, gebildet werden. Andererseits könnte die Präzipitation des Proteins in den Aufbewahrungs-Bedingungen begründet sein, da der Transducer sowohl unter

niedrig-Salz, als auch in Detergenzien gelagert wird, die nicht den natürlichen Umgebungsbedingungen entsprechen.

Auch aus den neuesten ESR-Messungen an Transducer-Cysteinmutanten lassen sich gewisse Andeutungen für eine Zusammenlagerung von mehreren Molekülen finden, die später genauer erläutert werden. Es müssen jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die die Organisation dieser Proteine in ihrer natürlichen Lipid-Umgebung analysieren, um die Fragen zur Organisation des Rezeptor-Transducer-Komplexes angemessen beantworten zu können.

Aus den Ergebnissen der Photozyklus-Messungen wird ein weiterer Hinweis für die Bindung des Transducers an den Rezeptor geliefert. In solubilisierter Form hat das *Np*HtrII im Komplex mit *Np*SRII keinen zu detektierbaren Effekt auf den Photozyklus. Im Gegensatz dazu hat der verkürzte Transducer *Np*HtrII-157 im Komplex einen geringfügigen, aber nachweisbaren Effekt auf das Verhalten des Photozykluses. Diese Änderung wurde auch schon von Klare *et al.* (Klare *et al*., 2006) beobachtet und durch eine im solubilisierten Zustand mögliche Zurückfaltung des verkürzten zytoplasmatischen Teils erklärt (Helix 1 der ersten HAMP-Domäne). Dadurch könnte eine zusätzliche Bindungsstelle zum Rezeptor entstehen, die einen messbaren Einfluss auf den Photozyklus ausüben könnte. In rekonstituierter Form des Proteins wird dagegen kein abweichender Effekt im Vergleich zur Rezeptor-Probe beobachtet. In diesem Zustand könnte die Rückfaltung der verkürzten Helix durch die starrere Umgebung der Lipid-Doppelschicht verhindert werden, so dass keine zusätzliche Bindung zum *Np*SRII besteht, was durch ESR-Daten nachgewiesen wurde (Bordignon *et al*., 2005).

Wird nun das *Np*HtrII im Komplex mit dem Rezeptor betrachtet, lässt sich im solubilisierten Zustand kein Effekt auf den Photozyklus im Vergleich zum *Np*SRII beobachten, aber stattdessen wird eine deutliche Änderung in der rekonstituierten Form des Komplexes sichtbar. Dieses gegensätzliche Verhalten des Transducers im Vergleich zu dem verkürzten *Np*HtrII-157 könnte sich folgendermaßen erklären lassen. In solubilisierter Form bilden die Transducer-Moleküle ein Dimer mit einer coiled-coil Struktur im zytoplasmatischen Bereich, analog zu den Chemorezeptoren auf Grund der hohen Homologie in diesem Bereich. Dadurch ist eine Rückfaltung der Helices auf den Rezeptor nicht möglich, so dass keine zusätzliche Interaktion mit dem *Np*SRII besteht. Dadurch könnte kein zusätzlicher Einfluss auf den Photozyklus entstehen. Im rekonstituierten Zustand bleibt die coiled-coil Struktur der zytoplasmatischen Domäne zwar bestehen, so dass auch hier keine Zurückfaltung dieser Helices stattfinden kann, aber durch die starrere Lipid-Umgebung wird die Interaktion zwischen Transducer und Rezeptor verstärkt. Zusätzliche Wechselwirkungen die den Photozyklus des *Np*SRII beeinflussen sind nicht direkt nachweisbar. Allerdings könnten weitere Interaktionen entweder durch eine fehl gefaltet Konformation des Proteins, oder durch eine korrekte Faltung der HAMP-Domänen verursacht werden, die in solubilisierter Form eine unstrukturierte Konformation besitzen könnten. Durch die Formung der HAMP-Domänen könnte wiederum ein zusätzlicher Kontakt zum *Np*SRII entstehen, wodurch es zu dem beobachteten Effekt auf den Photozyklus kommen

könnte. Die korrekt gefaltete Struktur der HAMP-Domänen könnte vielleicht durch ein teils zurückgefaltetes 4-Helix-Bündel charakterisiert sein, wie es auch schon für die HAMP-Domäne aus dem Organismus *Archaeoglobus fulgidus* beschrieben wurde (Hulko *et al.*, 2006).

Diese Erklärung könnte zudem durch die Beobachtungen von Weis *et al.* (Weis *et al.*, 2003) unterstützt werden, der eine Verdickung an der Membran gefunden hat. Dadurch konnte eine ~ 190 Å lange zytoplasmatische Domäne im Serin-Rezeptor beobachtet werden. Diese Verkürzung des Rezeptor steht im Gegensatz zu dem Modell von Kim *et al.* (Kim *et al.*, 1999), der eine ~ 260 Å lange zytoplasmatische Region vorhergesagt hat. Der Unterschied in der Länge könnte durch die spezielle Konformation der HAMP-Domäne zustande kommen.

Zur weiteren Charakterisierung des Transducers werden in dieser Arbeit kalorimetrische Experimente durchgeführt. Es sollen die Bindung an den Rezeptor *Np*SRII und der entsprechende Bindungsparameter bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen vier wesentliche Aspekte, die die Rezeptor-Transducer-Interaktion betreffen:

1) Es wird keine 1:1 Stöchiometrie beobachtet.

2) Bei geringer Ionenstärke (150 mM NaCl) wird eine vierfach geringere Bindungsaffinität für den Transducer im Vergleich zu vorigen Untersuchungen an dem C-terminal verkürzten Transducer-Fragment *Np*HtrII-157 beobachtet.

3) Eine hohe Ionenstärke (4 M NaCl) führt zu einer Zunahme der Bindungsaffinität.

4) Der enthalpische Beitrag zur freien Energie der Komplex-Bildung ist bei hoher Ionenstärke reduziert.

Aus vorigen Untersuchungen mit den verkürzten Transducer-Fragmenten, z. B. *Np*HtrII-157, (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003) wird eine 1:1 Stöchiometrie für den *Np*SRII/*Np*HtrII-Komplex gefunden. Im Gegensatz zu dieser Stöchiometrie wird in den ITC-Messungen dieser Arbeit mit dem *Np*HtrII nur ein 0,5:1 bzw. 1:2 (*Np*SRII : *Np*HtrII) Verhältnis beobachtet. Hoch-Salz Bedingungen scheinen eine Veränderung in der Stöchiometrie zu bewirken, da dort ein Verhältnis von 0,72:1 bzw. 1,44:2 (*Np*SRII : *Np*HtrII) gefunden wird. Diese Beobachtung wird von den Ergebnissen der Gelfiltrations-Experimente unterstützt, da dort eine Dimer-Bildung des Transducers bestimmt wird. Falls diese Dimere auch die interagierende Spezies darstellen, würde das bedeuten, dass nur eine Bindungsstelle für den *Np*SRII-Rezeptor vorhanden ist. Offensichtlich ist der Transducer in DDM-solubilisierter Form nicht vollständig aktiv, so dass er nicht die erwartete 2:2 Stöchiometrie eingehen kann. Deshalb kann sich in den ITC-Messungen nur ein *Np*SRII-Molekül mit einem HtrII-Dimer (1:2) zusammenlagern. Auch die Beobachtungen bei den Gelfiltrations-Experimenten bei 45°C stimmen gut mit dieser Annahme überein, da trotz einer theoretisch kalkulierten Konzentration für einen 1:1 Komplex immer noch Fraktionen mit freiem *Np*SRII vorhanden sind.

Die etwas erhöhte Stöchiometrie unter Hoch-Salz Bedingungen gibt erneut einen Hinweis auf eine unterschiedliche Konformation des Proteins und der damit verbundenen Clusterbildung in Abhängigkeit der Ionenstärke.

Der zweite Punkt kann direkt mit der Tatsache in Verbindung gebracht werden, dass der Transducer *Np*HtrII-157 im solubilisierten Zustand nachgewiesenermaßen nur in monomerer Form existiert (Wegener *et al.*, 2001). Daraus ergibt sich, wie schon oben beim Effekt auf den Photozyklus erwähnt, dass der membran-assoziierte Teil des C-terminal verkürzten Transducer mit dem Rezeptor-Molekül interagiert anstatt in einer Interaktion mit seinem Gegenpart im Transducer-Dimer involviert zu sein. Diese zusätzliche Rezeptor-Transducer Interaktion ist verantwortlich für die höhere Bindungsaffinität, die bei dem monomeren, verkürzten Transducer (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003) im Vergleich zu dem dimeren vollständigen Transducer beobachtet wird. Das *Np*HtrII weist eine coiled-coil Konformation im zytoplasmatischen Bereich auf, so dass die zusätzliche Interaktion mit dem Rezeptor fehlt.

Der dritte und vierte Punkt zeigt, dass die Rezeptor-Transducer Bindung offenbar stark abhängig ist von der Ionenstärke im umgebenden Puffer. Bei hohen Salzkonzentrationen, die die natürliche Umgebung des Proteins widerspiegeln, wird eine höhere Bindungsaffinität mit fast ausschließlich entropischen Beiträgen zur freien Energie der Bindung beobachtet. Dieses weist daraufhin, dass elektrostatische Wechselwirkungen eine große Rolle bei den Ereignissen während einer Protein-Protein Interaktion spielen. Schon in der Literatur wurde von Effekten der Ionenstärke auf Protein-Liganden- (Waldron *et al.*, 2005) und auf Protein-Nukleinsäure-Interaktionen (Kozlov & Lohman, 1998; Lohman *et al.*, 1996; Overman & Lohman, 1994) berichtet. Diese Berichte zeigen reduzierte ΔH Werte während einer Zunahme der Ionenstärke wie in dem Fall dieser Arbeit mit dem Transducer. Allerdings sind diese reduzierten Bindungsenthalpien normalerweise mit einer Abnahme der Bindungsaffinität verknüpft, also ohne eine Kompensation durch ein steigendes ΔS. Eine Frage, die sich daraus ableitet, ist, was diesen signifikant ansteigenden, entropischen Gewinn verursacht?

Ein entropischer Beitrag zur Bindung bei hohen Ionen-Konzentrationen könnte durch die Freisetzung von Anionen und/oder Kationen, die spezifisch an die Bindungs-Oberfläche gebunden sind, während der Protein-Protein Bindung entstehen. Dieses ist allerdings ziemlich unwahrscheinlich für den in der Membran verankerten Teil der Bindungs-Oberfläche. Jedoch sind mögliche Ionen-Bindungsstellen auf der zytoplasmatischen Oberfläche beider Proteine, also des Transducers und des Rezeptors, vorhanden, die für zusätzliche Interaktionen zwischen diesen Teilen des Rezeptors und des Transducers sorgen könnten. Diese Wechselwirkungen wurden schon früher vermutet (Royant *et al.*, 2001), aber ein experimenteller Beweis für diese Interaktion fehlt bis heute. Eine Bindung von Ionen an die Protein-Oberflächen könnte nicht nur durch spezifische Bindungsstellen verursacht werden, sondern durch die allgemein negative Ladung der Oberfläche. Ionen könnten daran binden und durch die coiled-coil Form des Transducers kompensiert werden. Die Freisetzung der Ionen von der Bindungs-Oberfläche während der Bindung könnte auch das geringe negative ΔH für die Bindung erklären, da die Freisetzung der Ionen von einer Bindungsstelle mit einem $\Delta H > 0$ assoziiert ist. Dieses kann auch durch eine

Hydratisierung von Ionen erklärt werden. Natürlich müssen weitere Experimente, die die Frage versuchen zu beantworten, ob Ionen spezifisch an die Proteine gebunden sind und während einer Protein Zusammenlagerung entlassen werden, durchgeführt werden, um diese Annahme zu testen. Im Gegensatz zum Transducer zeigt der verkürzte Transducer keine signifikante Abhängigkeit bezüglich der Ionenstärke (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003). Ein Grund könnte sein, dass dieser durch die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne keine negativen Ladungen mehr aufweist an denen die Ionen binden könnten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen demnach, dass die Interaktionen zwischen *Np*SRII und seinem entsprechenden Transducer-Molekül viel komplexer sind, als bisherige kristallographische, ESR und ITC Untersuchen an verkürzten Transducer-Fragmenten andeuten. Einen zusätzlichen Hinweis liefern auch die Beobachtung aus den Photozyklus-Messungen und den Gelfiltrations-Experimenten. Die Beweise auf eine Abhängigkeit der Ionenstärke, sowie mögliche Interaktionen zwischen den zytoplasmatischen Teilen der beiden Proteine, *Np*SRII und Transducer, im funktionellen Komplex könnte entscheidende Hinweise bezüglich des Mechanismus der Signal-Weiterleitung liefern.

Zusammenfassend kann vermerkt werden, dass der Transducer *Np*HtrII erfolgreich heterolog im Modellorganismus *E. coli* exprimiert und anschließend mit Hilfe eines Affinitäts-Tags aufgereinigt werden kann. Mit Hilfe unterschiedlicher Methoden ist deutlich geworden, dass der Transducer eine α-helikale Konformation besitzt. Die Struktur ist jedoch Salzabhängig. Diese Ionenstärke-Abhängigkeit kann neben einer Temperaturabhängigkeit auch bei der Bildung von oligomeren Formen sowohl beim *Np*HtrII, als auch beim Transducer-Rezeptor-Komplex beobachtet werden. Daraus könnte gemutmaßt werden, dass die vollständig korrekt gefaltete Konformation des *Np*HtrII, als auch die Komplex-Bildung, erst unter annähernd nativen Bedingungen ausgebildet werden.

4.2 Modell des *Np*HtrII, insbesondere der Linker-Region

Vom *Np*SRII/*Np*HtrII-Komplex konnte bislang nur die Kristallstruktur vom transmembranen Bereich des Komplexes (Gordeliy *et al.*, 2002) bis zur Aminosäure 82 des Transducers bestimmt werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, auf Grund der großen Homologie zu den Chemorezeptoren, vergleichende Analysen mit den bestehenden Daten aus Kristallstrukturanalysen der Chemorezeptoren durchzuführen. Hier wurden Röntgenstrukturdaten des zytoplasmatischen Bereichs des Serin-Rezeptors (Kim *et al.*, 1999) und des MCP_{1143} von *Thermotoga maritima* (Park *et al.*, 2006) gelöst. Jedoch sind erste Informationen über den Zwischenbereich dieser Domänen, erst kürzlich veröffentlicht worden (Hulko *et al.*, 2006), wobei allerdings die Signifikanz der Ergebnisse für die hier beschriebenen Transducer noch fragwürdig ist.

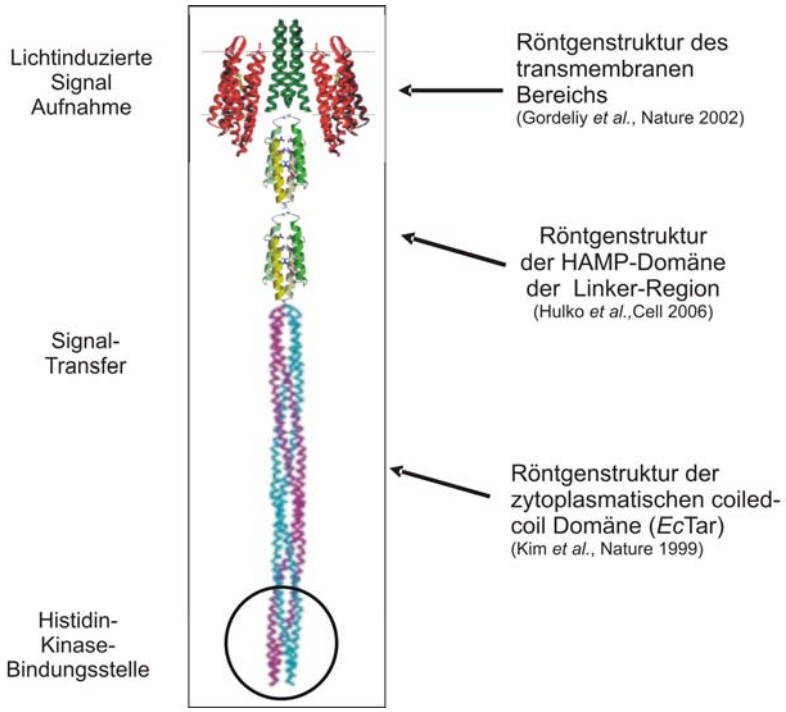


Abb. 4.2: Schematisches Modell des *Np*HtrII-Transducers mit den bereits gelösten Kristallstrukturen des transmembranen Bereichs und der zytoplasmatischen coiled-coil Domäne des Tsr-Rezeptors.

Strukturelle Daten über den Linker-Bereich sind insbesondere wichtig, da ihm eine zentrale Bedeutung für den Signalweiterleitungsmechanismus innerhalb des Transducer-Dimers zukommt. Die in dieser Region befindlichen HAMP-Domänen müssen zusätzlich eine allgemeine Bedeutung besitzen, da sie in sehr vielen verschiedenen Organismen zu finden sind. Die verwendeten Sekundärstrukturvorhersagen für diesen Bereich deuten eine coiled-coil Struktur und α-Helix für die Linker-Region an.

Zur Aufklärung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des noch unklaren Linker-Bereichs des Transducers existieren bislang zwei Modelle. Das erste Modell wurde von Bordignon *et al.* postuliert (Bordignon *et al.*, 2005). Es beruht auf den Ergebnissen von ESR-Messungen, bei denen durchgehend die Aminosäuren von der Position 78 bis zur Position 101 und zusätzlich einige ausgewählte weiter entfernte Aminosäuren im Linker-Bereich untersucht worden sind. Bis zur Position 94 wird in der AS-1 eine helikale Region identifiziert, die durch eine hohe dynamische Domäne und damit von einer undefinierten Struktur gefolgt wird. Diese tritt deutlich in die wässrige Phase des umgebenden Zytoplasmas ein. Zusammengefasst wird die Gesamtarchitektur der AS-1 Sequenz als ein „molten globular“ Typ des coiled-coil Bündels beschrieben.

Das zweite Modell wurde kürzlich mit der Veröffentlichung der ersten Struktur einer HAMP-Domäne von Hulko *et al.* (Hulko *et al.*, 2006) postuliert. Hulko zeigt, dass sich die in dem Linker-Bereich befindliche HAMP-Domäne im Dimer zu einem parallelen, vier-helikalen coiled-coil formt, wie es durch Sekundärstrukturvorhersagen vorausgesagt wurde. Die zwei Helices jedes Monomers sind gleich lang, durch einen Helix-Turn gegeneinander versetzt und sind durch einen Loop von 13 Aminosäuren miteinander verbunden.

Auf Grund der großen Homologie zwischen den HAMP-Domänen verschiedener Organismen, kann davon ausgegangen werden, dass die HAMP-Domänen im Linker-Bereich des Transducers ebenfalls eine coiled-coil Form bilden. Zusätzliche Hinweise für diesen möglichen Aufbau im *Np*HtrII lassen sich eventuell aus dem Sequenzalignment (s. 3.1.15) ableiten. Ein mögliches Modell für den Transducer könnte folgendermaßen aussehen (s. Abb. 4.2). An die zweite transmembrane Helix könnte sich ebenfalls eine solche HAMP-Domänen Struktur anschließen, bestehend aus ca. 5 Helix-Windungen langes paralleles „coiled-coil“-Motiv, das die beiden Transducer-Moleküle in engen Kontakt bringt. Anschließend könnte ein ca. 13 Reste ungeordneter Bereich folgen. Dieser könnte dann in ein für die Chemorezeptoren übliches anti-paralleles „coiled-coil“ übergehen, was auch durch das Auftreten eines typischen Heptaden-Musters (Le Moual & Koshland, Jr., 1996) gekennzeichnet ist. Aus den Sequenzvergleichen ist zusätzlich bekannt, dass die Transducer-Proteine zwei HAMP-Domänen in dem Linker-Bereich besitzen. Das Phänomen, das Proteine mehrere HAMP-Domänen hintereinander geschaltet besitzen, ist auch schon in anderen Proteinklassen bekannt (Aravind & Ponting, 1999).

Da bislang nur Modelle über den Linker-Bereich des Transducers existieren und keine vollständigen strukturellen Daten zur Verfügung stehen, sollten in dieser Arbeit Erkenntnisse über die Struktur des fehlenden Bereichs gewonnen werden. Mit Hilfe von zwei verschiedenen Ansätzen wird versucht Informationen über den Linker-Bereich zu gewinnen.

Zum einen wird der Transducer in Kristallisations-Versuchen eingesetzt. Wenn Röntgenstrukturdaten von diesem Protein gelöst werden, würde zum ersten Mal wahrscheinlich eine komplette Struktur des Transducers aus *Natronomonas pharaonis* vorhanden sein mit der eine Aufklärung des Signaltransfers erleichtert würde. Jedoch könnte es auch passieren, dass ein

Artefakt aufgelöst würde, der durch methodisch bedingte Einflüsse wie z. B. eine zu enge Kristallpackung, entstehen könnte, so dass das Protein in eine unnatürliche Form gezwungen würde. Optimierungsarbeiten an den Kristallisationsansätzen könnten diesen Nachteil eventuell beheben, so dass der Transducer seine natürliche Konformation einnehmen könnte. Ein weiterer Nachteil in der Kristallisation des *Np*HtrII besteht darin, dass es sich um ein komplettes Membranprotein handelt. Zusätzlich besitzt das Protein einen sehr großen zytoplasmatischen Bereich, so dass eine vollständige Röntgenstrukturauswertung sehr schwierig sein wird.

Als weitere Alternative zum vollständigen Transducer werden in dieser Arbeit zytoplasmatische Transducer-Fragmente hergestellt, die ebenfalls in Kristallisations-Versuchen eingesetzt werden. Aus Untersuchungen an den Chemorezeptoren wurden schon erfolgreiche Kristallisationen von zytoplasmatischen Fragmenten, wie z.B. vom Tsr-Rezeptor (Kim *et al.*, 1999) oder vom MCP_{1143} aus *T. maritima* (Park *et al.*, 2006), nachgewiesen. Die Auswahl der Schnittstellen beruht, wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben, auf ESR-Daten. Die beiden Konstrukte *Np*HtrII-L82C-534 und *Np*HtrII-K96C-534 decken den, auf Grund unvollständiger Daten aus Kristallisationsversuchen und ESR-Messungen, fehlenden Bereich im Transducer-Molekül ab. So würde ein lückenloser Anschluss an die existierenden Informationen geknüpft. Das dritte Transducer-Konstrukt *Np*HtrII-130-534 beginnt erst am Ende der 1. HAMP-Domäne. Dieses Fragment entspricht einem Konstrukt des Chemorezeptors aus *T. maritima* (Park *et al.*, 2006). Das zytoplasmatische Protein bildet laut Röntgenstrukturanalysen ein Dimer mit einem 225 Å langen vier-Helix-Bündel und einem Durchmesser von ~ 20 Å. Beide Untereinheiten bestehen aus zwei Helices, CD1 und CD2, die durch einen kurzen, hoch konservierten U-Turn (U-Schleife) an der Bündelspitze miteinander verbunden sind (Abb. 4.3).

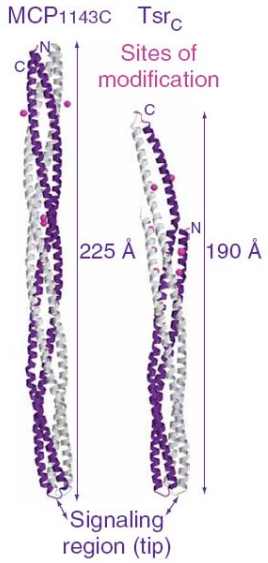


Abb. 4.3: Strukturen der zytoplasmatischen Fragmente des *T. maritima* MCP_{1143C} und des *E. coli* Tsr_C (Park *et al.*, 2006). Der MCP_{1143C} ist länger als der Tsr_c und besitzt mehr separierte Methylierungsstellen (lila Punkte).

Im Gegensatz zu dem in der Struktur des MCP_{1143C} vollständig durchgehenden vier-Helix-Bündel könnte es nach Park *et al.* sein, dass das zytoplasmatische *E. coli* Tsr-Fragment kein komplett zusammen hängendes Helix-Bündel am N-Terminus auf Grund der Verkürzung an dieser Region zeigt. Aus dem Vergleich dieser Daten zum hier verwendeten Konstrukt können gewisse Erwartungen bezüglich der Kristallstruktur des *Np*HtrII-Fragmentes entnommen werden.
Zusätzlich scheint die Aminosäure an der Position 130 aber nach ESR-Daten sehr flexibel zu sein, wodurch die Kristallstruktur gestört werden könnte, bzw. zu einer anderen Kristallstruktur als die erwartete „Trimer of Dimer“ Konformation führen könnte.
Der vorliegende Stand der Experimente zeigt, dass sich in den Ansätzen des vollständigen Transducers Kristalle bilden, so dass eine Strukturaufklärung vielleicht möglich wird. Jedoch sind diese bisher noch zu klein, um Röntgenstrukturdaten zu erhalten, so dass Optimierungsarbeit notwendig ist.

4.3 Untersuchungen zur *Np*HtrII-Struktur und Weiterleitung des Signals

Die ESR-Messungen am Transducer *Np*HtrII und seiner Cysteinmutanten sollen zum einen der Strukturaufklärung des Transducer dienen und zum anderen einen Beitrag zur Klärung der Signaltransduktion innerhalb des Rezeptor/Transducer Komplexes leisten. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten ESR-Experimenten handelt es sich zunächst um anfängliche Messungen, die auf jeden Fall weitergeführt und vertieft werden müssen.
Zur Interpretation der ESR-Daten kann ein in der Literatur postuliertes Modell eines coiled coil des Vimentin-Proteins heran gezogen werden (Hess *et al.*, 2002) (Abb. 4.4).

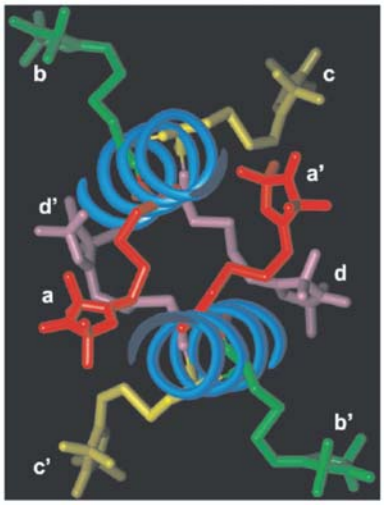


Abb. 4.4: Schematische Darstellung des coiled-coil Rückgrades mit den Positionen der Spin-Label. Die α-Helices eines jeden Monomers assoziiert innerhalb eines Dimers sind in blau dargestellt (Hess *et al.*, 2002).

In der Abbildung 4.4 wird das α-helikale Rückgrad jedes einzelnen Monomers innerhalb des Vimentin-Dimers blau dargestellt. Die von Hess *et al.* verwendeten Spin-gelabelten Cysteine an den Positionen a - d eines Monomers sind farblich kodiert. Mit Hilfe der bestehenden Kristall-Struktur des Cortexillin wurde die coiled-coil Form des Vimentins bestimmt. Die Positionen a und d bzw. a' und d' sind im Inneren der Struktur lokalisiert, was mit den Vorhersagen des Heptaden-Musters übereinstimmt. Die beiden anderen Reste b und c sind an weiter nach außen gerichteten Positionen lokalisiert. Die inneren Spin-Label sind nach Hess *et al.* in der Lage Interspin-Wechselwirkungen durchzuführen. Positionen b und c sind für Spin-Spin-Kontakte zu weit entfernt und damit am Limit des messbaren Abstandes.
Vergleicht man dieses Modell mit den in dieser Arbeit bestimmten praktischen Daten könnte entnommen werden, dass die CysteinmutanteA349C im Heptaden-Muster an den Positionen a oder d im Dimer lokalisiert sein könnte, da sie eine starke Austauschwechselwirkung aufweist.

Diese Annahme stimmt gut mit den Sekundärstrukturvorhersagen (s. Abb. 3.1.15) für diese Position überein.

Die ESR-Messungen an den Cysteinmutanten des Transducers geben erste Hinweise auf die vorhandene Struktur des Transducers und die Signalweiterleitung innerhalb der zytoplasmatischen Domäne, so dass auch unabhängig von dem Modell von Hess *et. al.* ein eigenes Struktur-Modell für die Signal-Domäne aufgestellt werden kann. Die ESR-Daten für ein vollständig eigenständiges Modell des *Np*HtrII reichen noch nicht aus. Die Abbildung 4.5 veranschaulicht die mögliche Anordnung bzw. Struktur des Transducer-Dimers am Ende der Signal-Domäne.

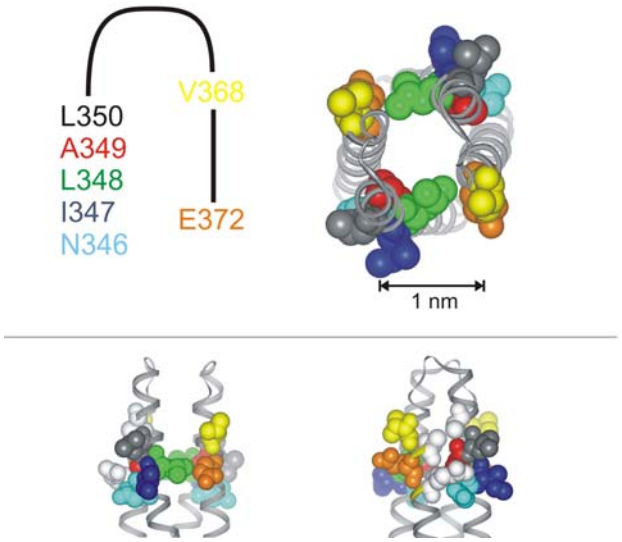


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der mit ESR untersuchten Positionen der Cysteinmutanten (farbige Codierung) des *Np*HtrII mit Blick vom Zytoplasma und der Seitenansicht als mögliches Modell des Endes der Signal-Domäne des Transducers.

Die Abbildung beruht auf den Daten der Sekundärstruktur des Serin-Chemorezeptors, die in dem Bereich der Signal-Domäne eine nahe zu 100 %ige Homologie zu den Transducern zeigen. Es ist daher anzunehmen, dass auch der *Np*HtrII strukturelle Ähnlichkeiten aufweist. Es wird deutlich, dass die Positionen L348 und A349 ins Innere des coiled-coil zeigen und eine geringere Mobilität und eine stärkere Austauschwechselwirkung aufweisen müssten. Dieses stimmt auch gut mit den ESR-Daten aus den solubilisierten Proben unter Hoch-Salz überein (s. 3.4.2). Die Proben zeigen geringe Austauschwechselwirkungen und weisen zudem eine schwache Mobilität auf. Die anderen Positionen weisen laut des Heptaden-Musters zunehmend nach außen. Damit sollten theoretisch die Mobilitäten zunehmen und die Austauschwechselwirkungen abnehmen. Auch dieses passt mit den unter Hoch-Salz Bedingungen gemessenen Spektren überein. Ein weiterer Hinweis für diese coiled-coil Form geben zudem die Mobilitätsmessungen, die einen Anfang einer Periodizität andeuten.

Werden nun die Niedrig-Salz Proben mit dem hier aufgestellten Modell (Abb. 4.5) verglichen, kann keine vollständige Übereinstimmung erkannt werden, da die Proben unterschiedliche Austauschwechselwirkungen und damit eine andere Struktur aufweisen. Dieses deutet an, dass der Transducer unter geringer Ionenstärke eine andere Konformation aufweist, bei der die beiden Proteine im Dimer nicht so fest aneinander gebunden sind.

Zusätzlich lässt sich auch in den erhaltenen Daten für die solubilisierten *Np*SRII/*Np*HtrII-Komplexe der Cysteinmutanten des Transducers eine starke Salzabhängigkeit erkennen. Unter Hoch-Salz Bedingungen zeigen alle untersuchten Positionen stärkere Austauschwechselwirkungen als bei mittlerer Ionenstärke. Auch in den Mobilitäts-Messungen lässt sich die Abhängigkeit beobachten. Die Mobilitäten nehmen mit steigender Salzkonzentration insgesamt ab, wobei die Positionen L350C und V368C am Ende eines Turns am stärksten betroffen sind. Die Abhängigkeit des Transducers von der Ionenstärke scheint ein wichtiger Gesichtspunkt für die Strukturausbildung und Funktion zu sein, die auch schon in anderen Experimenten, z. B. Gelfiltrations-Experimente, ITC- und Photozylus-Messungen, gefunden wurde.

Die Austauschwechselwirkungen lassen sich durch eine Spektrenverbreiterung erkennen. Die Verbreiterung wird durch eine Zunahme in dem hyperfeinen anisotropen Beitrag oder durch die dipolare Kopplung zwischen benachbarten (< 2 nm) Spin-Labeln oder durch beides verursacht. Durch die starken Austauschwechselwirkungen wird wahrscheinlich ein Hinweis auf eine Clusterbildung gegeben, da sich die Daten mit sehr starken Austauschwechselwirkungen an Positionen b und c des Heptaden-Musters nicht mit dem einfachen 4-Helix-Bündel Modell (Abb. 4.5) erklären lassen. Normalerweise sollten sie in einem Dimer nur geringe Austauschwechselwirkungen zeigen, da sie nach außen weisen und dort genug Platz zur freien Bewegung wäre. Würde sich allerdings ein Cluster ausbilden, wie es in dieser Arbeit schon durch Gelfiltrations-Experimente und durch die Homologie zu den Chemotaxis-Rezeptoren angedeutet wird, würden die Spin-Label eines 4-Helix-Bündels mit den Labeln eines benachbarten Dimers in Kontakt kommen.

Ein weiterer Punkt ist die Untersuchung von Effekten der Bindung des Rezeptors an den Transducer auf ausgewählte Positionen der zytoplasmatischen Domäne. Hier wird ein Vergleich des Verhaltens der Spin-markierten Positionen im Transducer und im *Np*HtrII/*Np*SRII-Komplex durchgeführt. Die Position S62 zeigt keinerlei Beeinflussung durch die Bindung des Rezeptors. Nur leichte Abweichungen sind in den beiden Spektren beobachtbar. Dieses könnte bedeuten, dass der Rezeptor nicht an die Cysteinmutante gebunden hat, vermutlich bedingt durch die Anwesenheit der Spin-Label-Seitenkette im Bindungs-Interface. Auch an der Position C173 hat die Bindung des Rezeptors keinen sichtbaren Einfluss auf das ESR-Spektrum. Diese Position liegt weiter entfernt von der zur Bindung benötigten Region des Transducers im zytoplasmatischen Bereich, so dass kein Effekt erwartet wird. Interessant dabei ist zudem, dass die Position 173 nicht irgendwo auf der zytoplasmatischen Domäne liegt, sondern in dem für

archaebakterielle Transducer spezifischen Bereich, was daraufhin deutet, dass diese Region eine von der Bindung des Rezeptors unabhängige Funktion besitzt.

Im Gegensatz dazu wird allerdings wieder in der zytoplasmatischen Domäne an der Position L350 und V368 eine Veränderung durch die Anwesenheit des *Np*SRII festgestellt. Die Spin-Label an diesen Positionen werden immobiler, so dass die Konformation durch die Bindung starrer wird. Jedoch konnte an diesen Stellen bisher noch nicht überprüft werden, ob der Transducer noch freien Spin-Label enthält, der zu diesen Spektren führen würde oder ob es sich tatsächlich um eine Beeinflussung handelt. Das Ergebnis der Messung an der Position E372 widerspricht der Annahme, dass die Bindung des Rezeptors einen Effekt auf die in der Signal-Domäne gelegenen Positionen ausübt. An dieser Stelle wird kein Einfluss des Rezeptors auf den Transducer beobachtet, obwohl sich diese Position nur 4 Aminosäuren entfernt von V368 befindet, die eine Änderung zeigt. Zudem sind beide Aminosäuren fast identisch im Transduer-Dimer orientiert. Um diese Diskrepanz klären zu können müssen weitere ESR-Messungen durchgeführt werden, insbesondere an den Positionen zwischen diesem Bereich.

Die Ergebnisse der ESR-Messungen mit den rekonstituierten Proben bezüglich der Austauschwechselwirkungen und der Zugänglichkeiten des Spin-Labels können nicht eindeutig interpretiert werden. Die fast völlig identischen Spektren der Positionen I347 bis L350 kommen vermutlich durch Schwierigkeiten bei der Probenpräparation zustande, d. h. die Mutanten könnten eine Fehlfaltung oder einen Funktionsverlust erfahren. Nach dem coiled-coil Modell (s. Abb. 4.5) sollten die Spektren, als auch die Zugänglichkeitsparameter unterschiedliche Formen bzw. Werte aufweisen, da die Spin-Label in einem Helix-Turn lokalisiert sind und damit verschiedene Bewegungsfreiräume haben sollten. Durch diese Ergebnisse könnte ein weiterer Hinweis auf eine komplexe Clusterbildung gegeben sein, so dass das hier aufgestellte Transducer-Dimer-Modell für die Auswertung nicht mehr ausreichend ist.

Der zweite Teil der ESR-Messungen beschäftigt sich mit den Untersuchungen des natürlichen Cysteins einiger Fusionsproteine, die aus dem N-terminalen Bereich des *Np*HtrII fusioniert mit dem C-terminalen Bereich des *Ec*Tar-Rezeptors bestehen, an der Position 173. Diese Position repräsentiert nach entsprechenden Sekundärstruktur-Vorhersagen die Position d im Heptaden-Muster. Der Spin-Label an dieser Position ist demnach erwartungsgemäß im Inneren der coiled-coil Konformation und sollte deshalb eine geringe Mobilität aufweisen. Wie auch schon oben erwähnt, wird von Spin-Labeln an den Positionen a und d des Heptaden-Musters ein Abstand von 1.0-1.5 nm nach Hess *et al.* (Hess *et al.*, 2002) erwartet (Abb. 4.4). Ein Vergleich mit dem Wildtyp Transducer an dieser Position kann auf Grund fehlender Daten noch nicht durchgeführt werden.

Die Chimären b und d sind beide durch eine große Fraktion der mobilen Komponente in 150 mM Salz charakterisiert, die durch die Zugabe von erhöhten Salzkonzentrationen unterdrückt werden kann. Dieser Effekt ist bei der Chimäre b reversibel und bei der Chimäre d nicht. Die Fusionsproteine a und c sind nur durch eine kleine Fraktion der mobilen Komponente unter

Niedrig-Salz Bedingungen charakterisiert. Auch eine Erhöhung der Salzkonzentration führt zu keiner signifikanten Änderung im ESR-Spektrum, wodurch ein Hinweis gegeben wird, dass diese Proteine schon unter 150 mM Salz ihre wahrscheinlich korrekte Konformation besitzen oder dass sie eine Fehlfaltung aufweisen, die selbst durch die erhöhte Ionenstärke nicht aufgehoben werden kann. Eine solche Fehlfaltung könnte durch eine ungeeignet gewählte Schnittstelle entstehen.
Jedoch muss bei den Interpretationen der Daten berücksichtigt werden, dass es sich um ein Fusionsprotein handelt, deren Ursprung in verschiedenen Organismen liegt. Da Archaebakterien an hochsaline Umgebungen angepasst sind, stellen die Bedingungen des Hoch-Salzes natürliche Zustände für den *Np*SRII/*Np*HtrII Komplex-Teil dar. Im Gegensatz dazu sind *E. coli* Zellen an Niedrig-Salz Bedingungen abgestimmt, so dass der Tar-Teil der Chimäre nicht an andere Umgebungen angepasst ist. Demzufolge kann sich der *Np*HtrII-Teil in Anwesenheit von Hoch-Salz richtig falten und zeigt eine entsprechende Salzabhängigkeit, wie sie schon in früheren Experimenten für den verkürzten Transducer gefunden wurde (nicht publizierte Ergebnisse). Zusätzlich zeigt auch der in dieser Arbeit aufgereinigte Transducer eine Salzabhängigkeit. Jedoch ist es noch unklar, ob der fusionierte Tar-Teil in erhöhter Ionenstärke eine natürliche Konformation einnehmen kann, so dass die Frage nach einer gesamten korrekten Faltung der Fusionsproteine unter Hoch-Salz auch Gegenstand weiterer ESR-Messungen sein muss.
Aus Messungen mit dem verkürzten Transducer gibt es Hinweise auf die Anwesenheit eines Gleichgewichtes zwischen zwei Konformationen der HAMP Domänen im *Np*SRII/*Np*HtrII-157-Komplex, welches durch eine Änderung der Temperatur verlagert werden kann (Bordignon *et al.*, 2005). Daraus wurde geschlossen, dass dieses Gleichgewicht eventuell der Grund sein könnte, dass bei den Röntgenstrukturdaten nur Daten bis zur Aminosäure 82 beobachtet werden konnten, da es für den nachfolgenden Bereich mindestens zwei verschiedene Konformationen gibt. Zusätzlich weist diese Region eine undefinierte Struktur auf, die von Bordignon *et al.* als ein „molten globular“ Typ bezeichnet wird. Dieses Gleichgewicht sollte auch in den Fusionsproteinen b, c und d untersucht werden. Auch hier ergeben die Ergebnisse Hinweise auf ein bestehendes Gleichgewicht zwischen der mobilen und immobilen Komponente, die auch bei den Cysteinmutanten des Transducers gefunden werden. Dieses könnte ähnliche Eigenschaften der Fusionsproteine zum Wildtyp Transducer andeuten. Die niedrigeren thermodynamischen Daten der Fusionsproteine im Vergleich zu den Werten des verkürzten Transducers könnten auf eine verminderte Funktion der Chimären hinweisen.
Aus den Tieftemperatur-Messungen kann das Vorhandensein einer coiled-coil Form geschlossen werden. Jedoch zeigt sich eine eng aneinander liegende Form (Abstand 0,9 nm) nur im solubilisierten Zustand und rekonstituiert unter Hoch-Salz Bedingungen. Eine weiter geöffnete Form (Abstand > 2 nm) des wahrscheinlich immer noch vorhandenen coiled-coils findet sich im rekonstituierten Zustand unter Niedrig-Salz. Dieses weist auf eine unterschiedliche Konformation des Proteins oder auf eine veränderte Cluster-Bildung des langen zytoplasmatischen Bereichs unter den jeweiligen Umständen hin.

Mit Hilfe der ESR-Daten aus dieser Arbeit können erste Anhaltspunkte, die zur Klärung der Struktur und der Signalweiterleitung beitragen, geliefert werden. Aber die Daten reichen noch nicht aus um ein vollständiges Bild vom archaebakteriellen Signaltransfer zu erhalten.
Bislang existieren in der Literatur verschiedene Modelle wie das Signal weitergeleitet wird. Die Abbildung 4.6 zeigt die verschiedenen Ansätze.

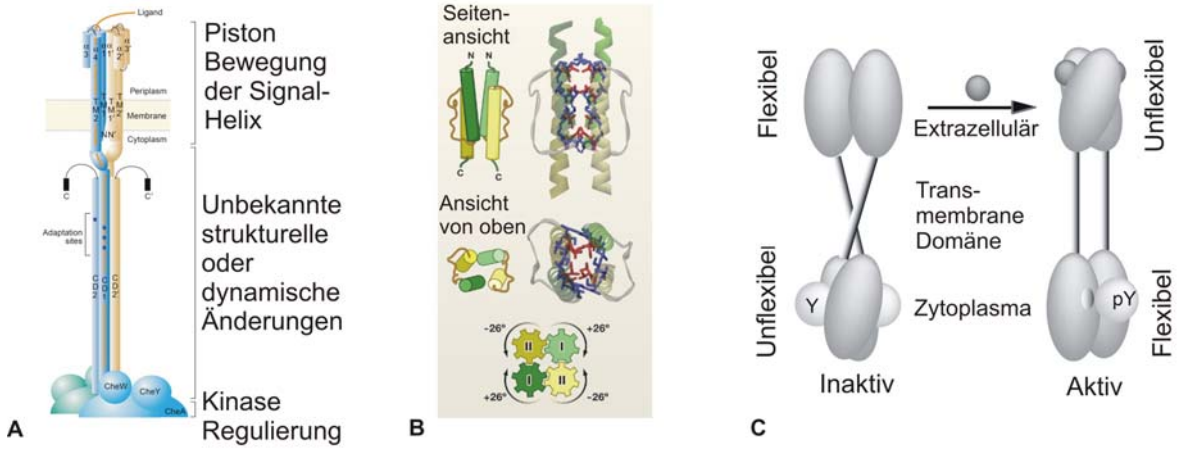


Abb. 4.6: Modelle der Signalweiterleitung.
A: „Swinging piston“ Modell (Falke & Hazelbauer, 2001).
B: “Gear shift” (Zahnrad) Modell (Hulko *et al.*, 2006)
C: “Flexible rotation” (Flexible Rotations) Modell (Moriki *et al.*, 2001)

Falke und Hazelbauer postulieren das „Swinging piston“ Modell, bei dem die Signal-Helix eine Piston-Bewegung, d. h. eine gleitende abwärts Bewegung, in der Transmembranen Domäne durchführt. Weiterfolgend wird das Signal über unbekannte strukturelle oder dynamische Änderungen bis zur Histidin-Kinase Aktivierung weitergeleitet (Falke & Hazelbauer, 2001). Das zweite existierende Modell beschreibt einen „Gear shift“. Hierbei wird eine Rotationsbewegung der vier einzelnen Helices in entgegen gesetzter Richtung um 26° durchgeführt, die aus der beobachteten Konformation eine kanonische coiled-coil Form herstellt. Durch diesen Wechsel in der Konformation des Proteins soll das Signal ins Zellinnere weiter geleitet werden (Hulko *et al.*, 2006). Moriki *et al.* bevorzugt ein Modell, das als „Flexible rotation“ bezeichnet wird. In diesem Modell kommt es durch die Bindung eines Liganden zu einer unflexibeln Konformation der Ligandenbindungs-Domäne. Gleichzeitig rotiert das coiled-coil Bündel, so dass die unflexible Struktur der Signal-Domäne in eine flexible Konformation umgewandelt wird (Moriki *et al.*, 2001).
Unter Einbezug der in dieser Arbeit erhaltenen Daten, kann keines der drei Modelle diskriminiert werden.

4.4 Funktionsuntersuchungen der Transducer-Chemorezeptor-Chimären

Die archaebakterielle Phototaxis weist eine hohe Homologie zu der eubakteriellen Chemotaxis auf. Dieses betrifft sowohl die Sequenz der Transducer bzw. Chemorezeptoren, als auch ihre strukturellen Eigenschaften. Die weiter folgende Zwei-Komponenten-Signaltransduktionskaskade besitzt ebenfalls eine hohe Homologie. Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit Chimären hergestellt werden, die aus dem C-terminalen Bereich des Transducers *Np*HtrII fusioniert mit dem N-terminalen Teil des Tar-Rezeptors aus *E. coli* bestehen und deshalb in der Lage sein sollten phototaktische Reaktionen im Modellorganismus *E. coli* auszulösen.

Es wurden schon sehr früh funktionsfähige Fusionsproteine der hier betrachteten Proteinklassen hergestellt. Krikos *et al.* entwickelten 1985 Chimären aus den beiden Chemotaxisrezeptoren Tar und Tsr, die beide chemotaktische Antworten zeigten *(Krikos et al.*, 1985). Weiterhin wurden 1989 von Utsumi *et al.* Chimären zwischen Tar und EnvZ, einer transmembranen Histidin-Kinase aus *E. coli*, (Utsumi *et al.*, 1989) und 1994 von Baumgartner & Hazelbauer Chimären, die aus dem Chemorezeptor Trg und EnvZ bestehen hergestellt (Baumgartner *et al*., 1994). In beiden Fällen waren fast alle Fusionsproteine funktionell. 1999 entwickelten Zhang *et al.* auch Chimären aus archaebakteriellen Transducer-Proteinen (Zhang *et al.*, 1999). Sie stellten verschiedene Fusionsproteine aus dem *Hs*HtrI und dem *Hs*HtrII her, wobei sie herausfanden, dass die transmembranen Helices vom *Hs*HtrI und *Hs*HtrII ihre Spezifität bezüglich der Interaktion mit dem Rezeptor *Hs*SRI bzw. *Hs*SRII definieren. Die restlichen Transducer-Domänen können, mit nur geringem oder keinem Effekt, Signale vom Rezeptor aufzunehmen, entfernt oder ausgetauscht werden. Jung *et al.* (2001) gelang es Chimären zu entwickeln, die sich aus zwei Proteinteilen aus verschiedenen Organismen zusammensetzen. Er stellte Fusionsproteine her, die aus dem *Np*HtrII fusioniert mit dem *Se*Tar- bzw. *Ec*Tsr-Rezeptor bestehen. Zusätzlich waren diese Chimären kovalent über ein Linker–Peptid mit dem *Np*SRII-Gen verbunden (Jung *et al*., 2001).

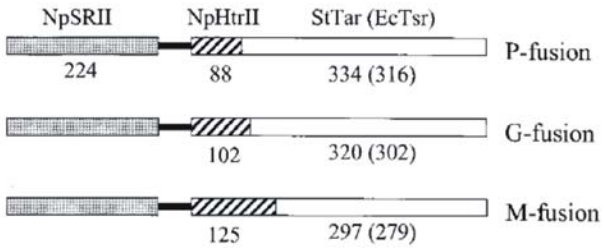


Abb. 4.7: Schematische Darstellung der Fusionsproteine nach Jung *et al.*. Die Nummern repräsentieren die Positionen der Aminosäuren an den Schnittstellen (Jung *et al.*, 2001).

Alle Fusionsproteine konnten in *E. coli* exprimiert werden und für die M-Fusionen detektierte man schwache, phototaktische Reaktionen. Etwas später wurde dieses Ergebnis durch *in vitro* Phosphorylierungsversuche bestätigt (Trivedi & Spudich, 2003). Mit diesen Chimären konnten allerdings keine Aussagen über die Bindungs- bzw. Komplexbildungs-Eigenschaften gemacht werden, da beide Proteine in einem Konstrukt exprimiert wurden. Zudem könnten durch diese Fusion andere Eigenschaften, wie z.B. eine Dynamik gestört werden oder Einschränkung der konformationellen Beweglichkeit stattfinden, so dass das gemessene Signal nur sehr klein wäre im Vergleich mit dem natürlichen Signal. Diese Beispiele belegen aber dennoch, dass es im Bereich der Chemo- und Phototaxis theoretisch möglich ist, funktionsfähige Chimären zu entwickeln.

Deshalb sollten die in dieser Arbeit hergestellten Fusionsproteine unabhängig vom Rezeptor *Np*SRII kloniert und exprimiert werden, so dass sich beide Proteine lediglich über die natürliche Komplexbildung zusammenlagern. Aus den Bindungsstudien des Rezeptors mit verkürzten Transducer-Fragmenten (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003) und den Untersuchungen aus dieser Arbeit kann von einer Zusammenlagerung ausgegangen werden. Zusätzlich werden alle verwendeten Fusionsproteine, mit Ausnahme der Chimäre 102_233, so konstruiert, dass es theoretisch möglich sein sollte das vom Rezeptor aufgenommene Lichtsignal ins Innere der Zelle weiterzuleiten.

Erste Funktionalitätsuntersuchungen der Chimären sind durch einen *in vitro* Phosphorylierungs-Assay durchgeführt worden. Die einzelnen Versuchsreihen weisen eine starke Streuung auf, so dass keine eindeutigen Ergebnisse vorliegen. Zwar konnte durch Auswertung der Daten auf den ersten Blick eine Reaktion bei den Chimären c, 102 und 223 (photophobe Antwort) und bei der Chimäre d (photophile Antwort) beobachtet werden (s. 3.5.1), jedoch wenn die Standardabweichung mit in die Betrachtung einbezogen wird, lässt sich bei allen Fusionsproteinen keine eindeutige Reaktion erkennen. Neben der mangelnden Reproduzierbarkeit der einzelnen Versuchsreihen kann auch eine große Streuung bei den Kontrollversuchen (Tar-Rezeptor und Kontroll-Liposomen) beobachtet werden. Beim *in vitro* Phosphorylierungs-Assay handelt es sich eigentlich um einen etablierten Versuch, der schon anscheinend erfolgreich bei Chimären, wie bereits oben erwähnt, angewendet (Trivedi & Spudich, 2003) wurde. Jedoch zeigen Trivedi and Spudich keine Kontrollversuche, so dass die Aussagekraft der experimentellen Versuche nicht überprüft werden kann. Zudem ist aus ihren Daten nicht sichtbar, wie häufig die einzelnen Versuchsreihen durchgeführt wurden, so dass ein Vergleich zu den hier ermittelten statistischen Ergebnissen nicht uneingeschränkt möglich ist.

Weiterhin kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass in dieser Arbeit ein methodisches Problem vorliegt, das bei Trivedi und Spudich nicht vorlag. Ein Problem liegt möglicherweise in der Signaltransduktionskaskade des Zwei-Komponenten-Systems mit Che-Proteinen, da das CheA seine gebundene Phosphatgruppe sehr schnell wieder verliert. So könnte es durch die verwendeten Reaktionsbedingungen zu einem Verlust des Phosphates kommen bevor die Reaktion fixiert wurde. Weiterhin könnte es an der verwendeten Messapparatur oder an dem

Lichtsignal liegen. Trivedi und Spudich verwendeten anstatt einer Kaltlichtlampe eine Halogen-Lampe mit 100 W.

Eine alternative Methode zur Funktionalitätsbestimmung der Fusionsproteine stellen die *in vivo* Schwimmversuche dar. Diese Phototaxis-Messungen an *E. coli* Zellen sollen zudem Informationen zur Physiologie der Signaltransduktion ermitteln. Dazu werden die Fusionsproteine gemeinsam mit dem Rezeptor *Np*SRII im schwimmfähigen *E. coli* RP437 Stamm exprimiert. Da die Anwesenheit dieser beiden Proteine in den *E. coli* Zellen nachgewiesen worden ist (s. 3.1.15), sollte eine Signalaufnahme und Weiterleitung ins Innere der Zelle grundsätzlich möglich sein.

Die Ergebnisse der Schwimmversuchs-Messungen können nur sehr spekulativ diskutiert werden, da keine deutlichen Reaktionen entsprechend der positiven Kontrolle beobachtet werden können. Allerdings kann eine photophobe Antwort der Chimären c und 123 ausgeschlossen werden, da sie eindeutig das gleiche Verhalten zeigen wie die beiden negativen Kontrollen der Stämme RP437 und UU1250. Mit diesen Stämmen wurde mit der Phototaxis-Apparatur die Blaulicht-Reaktion der Bakterien nachgewiesen, die von Wright *et. al.* postuliert wird (Wright *et al.*, 2006). Aus der Antwort der Chimären c und 123 könnte vermutet werden, dass diese beiden Fusionsproteine nicht funktionell sind. Allerdings steht dieses Ergebnis im Gegensatz zu den Beobachtungen aus dem Phosphorylierungs-Assay, wenn diese überhaupt interpretiert werden können, indem die Chimäre c anscheinend eine photophobe Antwort durchführt.

Bei den restlichen untersuchten Fusionsproteinen zeigen die Zellen keine zu den negativen Kontrollen analoge Antwort auf den Lichtreiz der Wellenlänge 498 nm. Ihr Schwimmverhalten scheint sich im ersten Moment trotz des negativen Signals nicht von dem Verhalten während der Basislinien Aufnahme zu unterscheiden, so dass es erst den Anschein macht, als ob diese Chimären ebenfalls ihre Funktion nicht ausüben könnten. Es wäre aber denkbar, dass gerade diese Proteine funktionsfähig in Bezug auf die Phototaxis sind, da sie sich eben nicht wie die negativen Kontrollen verhalten. Die Zellzahl im Spot bleibt konstant, wodurch eine gewisse, sehr schwache photophobe Reaktion interpretiert werden könnte. Eine eindeutige photophobe Antwort wie sie bei den *Natronomonas pharaonis* Bakterien beobachtet wird, ist aber nicht sichtbar. Dieses könnte daran liegen, dass der verwendete *E. coli* Stamm ein Wildtyp-Stamm bezüglich der Chemotaxis ist, so dass auch alle Chemotaxis-Rezeptoren und der Aerotaxis-Rezeptor vorhanden sind, die ebenfalls Signale aus der Umgebung aufnehmen können. Das Phototaxis-Signal könnte in diesen Antworten untergehen. Ein weiterer Grund für die schlechte Auswertbarkeit der Reaktionen könnte eine schädigende Wirkung des IPTGs auf die Bakterienkultur sein. Es ließen sich unter dem Lichtmikroskop viele Zellen beobachten, die ihre Zellteilungs-Fähigkeit verloren hatten. Diese Zellen werden durch die Bildung eines sehr langen Zellkörpers, teilweise bis zum 10 fachen der normalen Länge, identifiziert. Solche Bakterien sind entsprechend in ihrer Mobilität stark eingeschränkt. Zusätzlich kann das zugefügte Retinal, wie auch schon Spudich vermutet hatte, eine schädigende Wirkung auf die Zellen ausüben (Jung *et al.*, 2001). Diesem

Problem könnte in zukünftigen Experimenten entgangen werden, indem ein *E. coli* Stamm verwendet wird, der das Retinal endogen herstellt, so dass eine zusätzliche Zugabe der Chemikalie in das Medium von außen nicht mehr notwendig wäre (von Lintig & Vogt, 2000). Eine weitere Schädigung kann durch die Einlagerung der überexprimierten Proteine in die Zellmembran verursacht werden.

Eine Ursache für die nicht eindeutigen Ergebnisse könnte zudem die Messapparatur liefern. Diese wurde für *H. salinarum* Zellen optimiert. Da *E. coli* aber eine andere Zellgröße, als auch ein unterschiedliches Schwimmverhalten besitzt, könnte die Detektierbarkeitsgrenze ungeeignet sein.

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden scheinen nicht geeignet zu sein, um die Funktionalität der Fusionsproteine zu überprüfen. Deshalb ist es notwendig durch weiterführende Experimente diese Funktionalität zu testen. Dazu werden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von D. Oesterhelt Experimente geplant, die auf der direkten Beobachtung von Zellen beruhen. Dieses „cell tracking“ System erlaubt es einzelne Zellen und nicht nur, wie im Schwimm-Versuch komplette Zellpopulationen, zu untersuchen. So könnte das direkte Schwimmverhalten der Zelle beobachtet werden und Änderungen in der Frequenz des Umschaltens des Flagellenmotors mit in die Beobachtungen einbezogen werden.

5 Zusammenfassung

Das Archaebakterium *Natronomonas pharaonis* besitzt die Fähigkeit zur Phototaxis. Diese wird unter Anderem durch das sensorische Rhodopsin *Np*SRII vermittelt, welches auf blau-grünes Licht reagiert und das Signal weiter an den entsprechend gebundenen Transducer *Np*HtrII leitet. Dieser wiederum überträgt den Reiz auf ein, zur eubakteriellen Signaltransduktion analoges, Zwei-Komponenten-System, wodurch es zu einer photophoben Reaktion des Bakteriums kommt.
Im Rahmen dieser Arbeit kann durch ein T7-Transkriptionssystem die Überexpression des *Np*HtrII in *E. coli* durchgeführt werden. Eine anschließende Aufreinigung mittels Ni-Affinitätschromatographie liefert das Protein mit einer Reinheit > 90 %. Die anschließende Charakterisierung des Proteins schließt sowohl Strukturstudien, als auch Bindungsstudien mit ein.
CD-spektroskopische Daten, sowie auch FTIR-Experimente, liefern Hinweise auf eine vorwiegend α-helikale Struktur des Proteins, die zudem eine Abhängigkeit von der umgebenden Ionenstärke zeigt. Durch Gelfiltrations-Experimente kann nachgewiesen werden, dass der Transducer sowohl Dimere als auch höher oligomere Komplexe ausbildet, von denen einer ein putatives „Trimer of Dimer“, die die funktionelle Einheit bei den Chemorezeptoren darstellen, repräsentieren könnte. In Anwesenheit des Rezeptors werden die gleichen Spezies beobachtet. Jedoch ändert sich die relative Verteilung und sie werden entsprechend der Bindung des Rezeptors zu höheren Molekulargewichten verschoben. Der Transducer, als auch im *Np*HtrII/*Np*SRII-Komplex, zeigt zudem eine Temperatur- und Zeitabhängigkeit bezüglich der Bildung höher oligomerer Komplexe. Laserblitz-Absorptions-Spektroskopische Untersuchungen zeigen, dass der Transducer im solubilisierten Zustand keinen Einfluss auf die Kinetik des Photozykluses ausübt, jedoch in rekonstituierter Form, im Gegensatz zu dem verkürzten *Np*HtrII-157-Protein, einen nachweisbaren Effekt hervorruft. Durch Bindungsstudien des Transducers an den Rezeptor mittels isothermer Titrationskalorimerie kann bei mittlerer Ionenstärke eine Dissoziationskonstante von ca. 0,6 µM und in Anwesenheit von 4 M NaCl eine etwas stärkere Bindung mit einer k_D von ca. 0,2 µM beobachtet werden.
Des Weiteren werden in dieser Arbeit Probenpräparationen für Kristallisationsversuche zur Strukturaufklärung durchgeführt. Neben der Verwendung des Transducers werden zu diesem Zweck auch zytoplasmatische Transducer-Konstrukte kloniert und exprimiert.
Um weitere Hinweise auf die Struktur des Proteins und zur Signalweiterleitung zu erhalten, werden ESR-spektroskopische Untersuchungen am *Np*HtrII und an ortsspezifischen, speziell im Bereich der CheA-Interaktions-Domäne, Spin-markierten Cysteinmutanten durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die strukturellen Eigenschaften, welche sich aus dem Vergleich mit den Chemorezeptoren ergeben und liefern zudem Hinweise auf ausgeprägte dynamische Eigenschaften, sowie eine starke Abhängigkeit von der umgebenden Ionenstärke des

untersuchten Bereiches. Zudem kann mittels dieser Methode erstmals Reiz-induzierte strukturelle Änderungen im Bereich der CheA-Bindungs-Domäne des *Np*SRII/*Np*HtrII-Komplexes nachgewiesen werden.

Des Weiteren werden Chimären, die aus dem N-terminalen Teil des *Np*HtrII fusioniert mit dem C-terminalen Bereich des *E. coli* Tar-Rezeptors bestehen, ESR-spektroskopisch untersucht. Die Ergebnisse zeigen die Anwesenheit von zwei Komponenten mit verschiedenen dynamischen Eigenschaften, die sich in einem Salz- und Temperaturabhängigen Gleichgewicht befinden.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte versucht werden die Physiologie der Signaltransduktion näher zu charakterisieren. Die Funktionalität der neu entwickelten Chimären und schon bestehender Fusionsproteine wird getestet, indem *in vitro* Phosphorylierungs-Versuche durchgeführt werden. Bei diesen sollte die Autophosphorylierungs-Aktivität der Histidin-Kinase CheA ausgenutzt werden. Des Weiteren werden phototaktische Messungen *in vivo* durchgeführt. *E. coli* Bakterien, die das Fusionsprotein und den Rezeptor enthaltenen, sollten auf ihre Reaktion auf blau-grünes Licht untersucht werden. Beide Methoden liefern keine eindeutigen Ergebnisse und sind demnach nicht geeignet, um die Funktionalität der Chimären zu untersuchen.

6 Summary

The archaeon *Natronomonas pharaonis* has the ability to do phototaxis. This function is mediated by the sensory rhodopsin *Np*SRII, which reacts on blue-green light and transfers this signal to the corresponding transducer protein *Np*HtrII. The signal is then transmitted to a signal transduction cascade, a two-component-system, homologous to the eubacterial chemotaxis system, thereby inducing a photophobic response of the bacterium.

In this work the overexpression of the *Np*HtrII could be accomplished by utilizing the T7-transcription-system. Applying Ni-affinity-chromatography, the protein could be obtained with > 90 % purity. Subsequently, structural studies as well as investigations on the interaction with the receptor *Np*SRII were carried out to characterize the protein.

CD-spectroscopical data and FTIR-experiments indicate an α-helical structure of the protein, which additionally depends on the ionic strength. Gelfiltration analysis proved that *Np*HtrII forms a dimer as well as higher oligomeric complexes. One of these oligomers is likely to account for a "Trimer of Dimer", which is thought to be a functional unit in case of the chemoreceptors. In the presence of the receptor the same species are visible with a devious relative distribution and a slightly higher apparent molecular weight, corresponding to the binding of the receptor. The transducer as well as in the complex shows a temperature- and time-dependency with regard to the formation of higher oligomeric complexes. Laser-absorption-spectroscopy experiments demonstrate no significant effects of the solubilized transducer on the photocycle kinetics of *Np*SRII. On the other hand, if the proteins are reconstituted into purple membrane lipids, a significant effect can be detected, in contrast to what was observed for the shortened transducer *Np*HtrII-157. Binding-studies of the transducer to the receptor by using isothermal titration calorimetry, revealed a dissociation constant of 0,6 µM at medium ionic strength. In the presence of 4 M NaCl stronger binding with a k_D around 0,2 µM can be observed.

Further on in this work protein preparations for crystallisation experiments were performed. Beside the transducer, cytoplasmic transducer-constructs were cloned and expressed for this purpose.

To obtain more information on the structure of the protein and on the signal transfer, EPR measurements have been carried out. For that, spin labeled native *Np*HtrII as well as cysteine mutants, especially in the CheA binding region, were tested. The results confirm the structural properties, which were found by comparison with the chemoreceptors. Additionally, there are hints for specific dynamic properties of the protein and for a strong dependency on the ionic strength of the environment. Moreover, with this method for the first time light induced structural changes in the CheA binding region of the receptor/transducer complex could be observed.

Furthermore, chimeras consisting of the N-terminal part of the *Np*HtrII fused to the C-terminal part of the *E. coli* Tar-receptor were analysed by using EPR spectroscopy, revealing the presence

of two components with different dynamic properties, being in a salt- and temperature-dependence equilibrium.

In the last part of this work, endeavours have been made to characterize the physiology of the signaltransduction. Therefore the above mentioned chimeras and new ones were tested for their functionality. This was done by means of an *in vitro* phosphorylation assay as well as an *in vivo* experiment. In the phosphorylation assay the autophosphorylation activity of the histidine kinase CheA was tried to assay. The phototactic *in vivo* measurements were carried out with *E. coli* bacteria expressing the fusion protein and the receptor. These cells were tested if they show a reaction to the blue-green light. Both approaches didn`t show a clear result, so that they are not suited to test the functionality of the chimeras.

7 Literaturverzeichnis

Alam,M. & Hazelbauer,G.L. (1991) Structural Features of Methyl-Accepting Taxis Proteins Conserved between Archaebacteria and Eubacteria Revealed by Antigenic Cross-Reaction. *J.Bacteriol.* **173**, 5837-5842.

Alam,M. & Oesterhelt,D. (1984) Morphology, function and isolation of halobacterial flagella. *J.Mol.Biol.* **176**, 459-475.

Alexandrov,K., Simon,I., Yurchenko,V., Iakovenko,A., Rostkova,E., Scheidig,A.J., & Goody,R.S. (1999) Characterization of the ternary complex between Rab7, REP-1 and Rab geranylgeranyl transferase. *FEBS Journal* **265**, 160-170.

Ames,P., Studdert,C.A., Reiser,R.H., & Parkinson,J.S. (2002) Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in Escherichia coli. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **99**, 7060-7065.

Aravind,L. & Ponting,C.P. (1999) The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol.Lett.* **176**, 111-116.

Baumgartner,J.W., Kim,C., Brissette,R.E., Inouye,M., Park,C., & Hazelbauer,G.L. (1994) Transmembrane signalling by a hybrid protein: communication from the domain of chemoreceptor Trg that recognizes sugar-binding proteins to the kinase/phosphatase domain of osmosensor EnvZ. *J.Bacteriol.* **176**, 1157-1163.

Birnbaumer,L., Yatani,A., VanDongen,A.M., Graf,R., Codina,J., Okabe,K., Mattera,R., & Brown,A.M. (1990) G protein coupling of receptors to ionic channels and other effector systems. *Soc.Gen.Physiol.Ser.* **45**, 169-183.

Bogomolni,R.A. & Spudich,J.L. (1982) Identification of a third rhodopsin-loke pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **79**, 6250-6254.

Bordignon,E., Klare,J.P., Doebber,M.A., Wegener,A.A., Martell,S., Engelhard,M., & Steinhoff,H.J. (2005a) Structural Analysis of a HAMP Domain: THE LINKER REGION OF THE PHOTOTRANSDUCER IN COMPLEX WITH SENSORY RHODOPSIN II. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 38767-38775.

Bordignon,E., Klare,J.P., Doebber,M.A., Wegener,A.A., Martell,S., Engelhard,M., & Steinhoff,H.-J. (2005b) Structural Analysis of a HAMP Domain: The Linker Region of the Phototransducer in Complex with Sensory Rhodopsin II. *J.Biol.Chem.* **280**, 38767-38775.

Borkovich,K.A., Kaplan,N., Hess,J.F., & Simon,M.I. (1989) Transmembrane Signal Transduction in Bacterial Chemotaxis Involves Ligand-Dependent Activation of Phosphate Group Transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**, 1208-1212.

Bowie,J.U., Pakula,A.A., & Simon,M.I. (1995) The three-dimensional structure of the aspartate receptor from Escherichia coli. *Acta Crystallographica Section D* **51**, 145-154.

Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.

Brinkmann,U., Mattes,R.E., & Buckel,P. (1989) High-level expression of recombinant genes in Escherichia coli is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* **85**, 109-114.

Brownleader,M.D., Byron,O., Rowe,A., Trevan,M., Welham,K., & Dey,P.M. (1996) Investigations into the molecular size and shape of tomato extensin. *Biochem.J.* **320**, 577-583.

Buck,L. & Axel,R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-187.

Burrows,G.G., Newcomer,M.E., & Hazelbauer,G.L. (1989) Purification of receptor protein Trg by exploiting a property common to chemotactic transducers of Escherichia coli. *J.Biol.Chem.* **264**, 17309-17315.

Chen,X. & Koshland,D.E. (1995) The N-terminal Cytoplasmic Tail of the Aspartate Receptor Is Not Essential in Signal Transduction of Bacterial Chemotaxis. *J.Biol.Chem.* **270**, 24038-24042.

Chen,X. & Spudich,J.L. (2002) Demonstration of 2:2 Stoichiometry in the Functional SRI-HtrI Signaling Complex in *Halobacterium* Membranes by Gene Fusion Analysis. *Biochemistry* **41**, 3891-3896.

Chervitz,S.A. & 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., & Hess,B. (1996) Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys.J.* **71**, 2329-2345.

Chizhov,I., Schmies,G., Seidel,R.P., Sydor,J.R., Lüttenberg,B., & 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.

Conley,M.P., Wolfe,A.J., Blair,D.F., & Berg,H.C. (1989) Both CheA and CheW Are Required for Reconstitution of Chemotactic Signaling in Escherichia Coli. *J.Bacteriol.* **171**, 5190-5193.

Crowe,J., Dobeli,H., Gentz,R., Hochuli,E., Stuber,D., & Henco,K. (1994) 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol.Biol.* **31**, 371-387.

Ehresmann,B., Imbault,P., & Weil,J.H. (1973) Spectrophotometric Determination of Protein Concentration in Cell Extracts Containing tRNA's and rRNA's. *Anal.Biochem.* **54**, 454-463.

Engelhard M., Schmies G., & Wegener A.A. (2003) Archeabacterial Phototaxis. In: *Photoreceptors and Light Signalling,* A.Batschauer (ed), pp. 1-39. Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Falke,J.J. & Hazelbauer,G.L. (2001) Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends Biochem.Sci.* **26**, 257-265.

Foster,D.L., Mowbray,S.L., Jap,B.K., & Koshland,D.E., Jr. (1985) Purification and characterization of the aspartate chemoreceptor. *J.Biol.Chem.* **260**, 11706-11710.

Francis,N.R., Wolanin,P.M., Stock,J.B., DeRosier,D.J., & Thomas,D.R. (2004) Three-dimensional structure and organization of a receptor/signaling complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **101**, 17480-17485.

Gordeliy,V.I., Labahn,J., Moukhametzianov,R., Efremov,R., Granzin,J., Schlesinger,R., Büldt,G., Savopol,T., Scheidig,A.J., Klare,J.P., & Engelhard,M. (2002) Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex. *Nature* **419**, 484-487.

Hargrave,P.A. & McDowell,J.H. (1992) Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein.linked receptors. *FASEB Journal* **6**, 2323-2331.

Henderson,R. & Schertler,G.F.X. (1990) The structure of bacteriorhodopsin and its relevance to the visual opsins and other seven-helix G-protein coupled receptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* **326**, 379-389.

Hess,J.F., Bourret,R.B., & Simon,M.I. (1991) Phosphorylation Assays for Proteins of the Two-Component Regulatory System Controlling Chemotaxis in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **200**, 188-204.

Hess,J.F., Voss,J.C., & FitzGerald,P.G. (2002) Real-time Observation of Coiled-coil Domains and Subunit Assembly in Intermediate Filaments. *J.Biol.Chem.* **277**, 35516-35522.

Hippler-Mreyen S. (2003a) Funktionelle Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaebakteriellen Photorezeptors NpSRII mit seinem Transducer NpHtrII durch heterologe Expression in E.coli. In: pp. 1-133. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Hippler-Mreyen S. (2003b) **Funktionelle Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaebakteriellen Photorezeptors NpSRII mit seinem Transducer NpHtrII durch heterologe Expression in E.coli** . In: pp. 1-133. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Hippler-Mreyen,S., Klare,J.P., Wegener,A.A., Seidel,R., Herrmann,C., Schmies,G., Nagel,G., Bamberg,E., & Engelhard,M. (2003) Probing the Sensory Rhodopsin II Binding Domain of its Cognate Transducer by Calorimetry and Electrophysiology. *J.Mol.Biol.* **330**, 1203-1213.

Ho,S.N., Hunt,H.D., Horton,R.M., Pullen,J.K., & Pease,L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.

Hohenfeld,I.P., Wegener,A.A., & 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.

Hou,S., Brooun,A., Yu,H.S., Freitas,T., & Alam,M. (1998) Sensory rhodopsin II transducer HtrII is also responsible for serine chemotaxis in the archaeon *halobacterium salinarum*. *J.Bacteriol.* **180**, 1600-1602.

Hubbell,W.L. & Altenbach,C. (1994) Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling. *Curr.Opin.Struc.Biol.* **4**, 566-573.

Hulko,M., Berndt,F., Gruber,M., Linder,J.U., Truffault,V., Schultz,A., Martin,J., Schultz,J.E., Lupas,A.N., & Coles,M. (2006) The HAMP Domain Structure Implies Helix Rotation in Transmembrane Signaling. *Cell* **126**, 929-940.

Jung,K.-H., Spudich,E.N., Trivedi,V.D., & Spudich,J.L. (2001) An Archaeal Photosignal-Transducing Module Mediates Phototaxis in Escherichia coli. *J.Bacteriol.* **183**, 6365-6371.

Kates,M., Kushawa,S.C., & Sprott,G.D. (1982) Lipids of Purple Membrane from Extreme Halophiles and of Methanogenic Bacteria. *Methods Enzymol.* **88**, 98-111.

Kehry,M.R., Doak,T.G., & Dahlquist,F.W. (1984) Stimulus-induced changes in methylesterase activity during chemotaxis in Escherichia coli. *J.Biol.Chem.* **259**, 11828-11835.

Kim,K.K., Yokota,H., & 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., & Kim,K.K. (2002) Dynamic and clustering model of bacterial chemotaxis receptors: Structural basis for signaling and high sensitivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **99**, 11611-11615.

Klare,J.P., Bordignon,E., Doebber,M., Fitter,J., Kriegsmann,J., Chizhov,I., Steinhoff,H.J., & Engelhard,M. (2006) Effects of Solubilization on the Structure and Function of the Sensory Rhodopsin II/Transducer Complex. *J.Mol.Biol.* **356**, 1207-1221.

Klare,J.P., Bordignon,E., Engelhard,M., & Steinhoff,H.-J. (2004) Sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin: Light activated helix F movement. *Photochemical and Photobiological Sciences* **3**, 543-547.

Klare,J.P. & Engelhard,M. (2004) Sensorische Rhodopsine: Modellsystem für transmembrane Signaltransduktion. *Biospektrum* **2/2004**, 150-153.

Klostermeier,D., Seidel,R.P., & Reinstein,J. (1998) Functional Properties of the Molecular Chaperone DnaK from *Thermus thermophilus*. *J.Mol.Biol.* **279**, 841-853.

Koch M.K. (2005) Investigations on halobacterial transducers with respect to membrane potential sensing and adaptive methylation. In: pp. 1-171. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Kozlov,A.G. & Lohman,T.M. (1998) Calorimetric studies of E. coli SSB protein-single-stranded DNA interactions. Effects of monovalent salts on binding enthalpy. *J.Mol.Biol.* **278**, 999-1014.

Krikos,A., Conley,M.P., Boyd,A., Berg,H.C., & Simon,M.I. (1985) Chimeric chemosensory transducers of Escherichia coli. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **82**, 1326-1330.

Le Moual,H. & Koshland,D.E., Jr. (1996) Molecular Evolution of the C-terminal Cytoplasmic Domain of a Superfamiliy of Bacterial Receptors Involved in Taxis. *J.Mol.Biol.* **261**, 568-585.

Levit,M.N., Grebe,T.W., & Stock,J.B. (2002) Organization of the Receptor-Kinase Signaling Array That Regulates Escherichia coli Chemotaxis. *J.Biol.Chem.* **277**, 36748-36754.

Lohman,T.M., Overman,L.B., Ferrari,M.E., & Kozlov,A.G. (1996) A Highly Salt-Dependent Enthalpy Change for Escherichia coli SSB Protein-Nucleic Acid Binding Due to Ion-Protein Interactions. *Biochemistry* **35**, 5272-5279.

Maddock,J.R. & Shapiro,L. (1993) Polar Location of the Chemoreceptor Complex in the *Escherichia coli* Cell. *Science* **259**, 1717-1723.

Marshall,C.B., Chakrabartty,A., & Davies,P.L. (2005) Hyperactive Antifreeze Protein from Winter Flounder Is a Very Long Rod-like Dimer of {alpha}-Helices. *J.Biol.Chem.* **280**, 17920-17929.

Martell S. (2005) Untersuchungen zur Signaltransduktion in der archaebakteriellen Phototaxis mittels ortspezifisch spinmarkierten Rezeptor-Proteinen. In: pp. 1-82. Universität Dortmund, FB Chemie / Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie.

Marwan,W. & Oesterhelt,D. (2000) Archaeal vision and bacterial smelling: Sensory Control of the swimming behaviour by two component signaling and fumarate. *ASM-News* **66**, 83-89.

Mehan,R.S., White,N.C., & Falke,J.J. (2003) Mapping Out Regions on the Surface of the Aspartate Receptor That Are Essential for Kinase Activation. *Biochemistry* **42**, 2952-2959.

Mennes N. (2003) Transducer Chimären: Entwicklung von phototaktisch aktiven *Escherichia coli* Bakterien. In: pp. 1-83. Fachbereich Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Milburn,M.V., Prive,G.G., Milligan,D.L., Scott,W.G., Yeh,J.I., Jancirak,J., Koshland,D.E., & 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.

Milligan,D.L. & Koshland,D.E., Jr. (1988) Site-directed cross-linking. Establishing the dimeric structure of the aspartate receptor of bacterial chemotaxis. *J.Biol.Chem.* **263**, 6268-6275.

Moriki,T., Maruyama,H., & Maruyama,I.N. (2001) Activation of Preformed EGF Receptor Dimers by Ligand-induced Rotation of the Transmembrane Domain. *J.Mol.Biol.* **311**, 1011-1026.

Müller,K.H. & Plesser,T. (1991) Variance reduction by simultaneous multi-exponential analysis of data sets from different experiments. *Eur.Biophys.J.* **19**, 231-240.

Otomo,J., Marwan,W., Oesterhelt,D., Desel,H., & Uhl,R. (1989) Biosynthesis of the two halobacterial light sensors P480 and sensory rhodopsin and variation in gain of their signal transduction chains. *J.Bacteriol.* **171**, 2155-2159.

Overman,L.B. & Lohman,T.M. (1994) Linkage of pH, Anion and Cation Effects in Protein-Nucleic Acid Equilibria : Escherichia coli SSB Protein-Single Stranded Nucleic Acid Interactions. *J.Mol.Biol.* **236**, 165-178.

Park,S.Y., Borbat,P.P., Gonzalez-Bonet,G., Bhatnagar,J., Pollard,A.M., Freed,J.H., Bilwes,A.M., & Crane,B.R. (2006) Reconstruction of the chemotaxis receptor-kinase assembly. *Nature Structural and Molecular Biology* **13**, 400-407.

Perazzona,B. & Spudich,J.L. (1999) Identification of Methylation Sites and Effects of Phototaxis Stimuli on Transducer Methylation in Halobacterium salinarum. *J.Bacteriol.* **181**, 5676-5683.

Racker,E. & Stoeckenius,W. (1974) Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *J.Biol.Chem.* **249**, 662-663.

Royant,A., Nollert,P., Edman,K., Neutze,R., Landau,E.M., Pebay-Peyroula,E., & Navarro,J. (2001) X-ray structure of sensory rhodopsin II at 2.1-A resolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **98**, 10131-10136.

Rudolph,J. & Oesterhelt,D. (1995) Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon Halobacterium salinarium. *EMBO J.* **14**, 667-673.

Rudolph,J. & Oesterhelt,D. (1996) Deletion Analysis of the *che* Operon in the Archaeon *Halobacterium salinarium*. *J.Mol.Biol.* **258**, 548-554.

Rudolph,J., Tolliday,N., Schmitt,C., Schuster,S.C., & Oesterhelt,D. (1995) Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *EMBO J.* **14**, 4249-4257.

Schäfer,G., Engelhard,M., & Müller,V. (1999) Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **63**, 570-620.

Schägger,H. & 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.

Scharf,B.E., Fahrner,K.A., Turner,L., & Berg,H.C. (1998) Control of direction of flagellar rotation in bacterial chemotaxis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**, 201-206.

Schmies,G., Lüttenberg,B., Chizhov,I., Engelhard,M., Becker,A., & Bamberg,E. (2000) Sensory Rhodopsin II from Haloalkaphilic *Natronobacterium pharaonis*: Light-Activated Proton Transfer Reactions. *Biophys.J.* **78**, 967-976.

Seidel,R.P., Scharf,B.E., Gautel,M., Kleine,K., Oesterhelt,D., & 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.

Skulachev,V.P. (1993) Interrelations of bioenergetic and sensory functions of the retinal proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* **26**, 177-199.

Spudich,J.L. (1998) Variations on a molecular switch - transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins. *Mol.Microbiol.* **28**, 1051-1058.

Spudich,J.L. & Bogomolni,R.A. (1984) Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature* **312**, 509-513.

Spudich,J.L. & Bogomolni,R.A. (1988) Sensory Rhodopsins of Halobacteria. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **17**, 193-215.

Spudich,J.L. & Stoeckenius,W. (1979) Photosensory and Chemosensory Behaviour of *Halobacterium Halobium*. *Photobiochem.Photobiophys.* **1**, 43-53.

Spudich,J.L., Yang,C.-S., Jung,K.-H., & Spudich,E.N. (2000) Retinylidene Proteins: Structures and Functions from Archaea to Humans. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **16**, 365-392.

Sreerama,N. & Woody,R.W. (2000) Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Anal.Biochem.* **287**, 252-260.

Stoeckenius,W., Wolff,E.K., & Hess,B. (1988) A Rapid Population Method for Action Spectra Applied to *Halobacterium halobium*. *J.Bacteriol.* **170**, 2790-2795.

Studier,F.W. & Moffat,B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol.Biol.* **189**, 113-130.

Szurmant,H., Muff,T.J., & Ordal,G.W. (2004) Bacillus subtilis CheC and FliY Are Members of a Novel Class of CheY-P-hydrolyzing Proteins in the Chemotactic Signal Transduction Cascade. *J.Biol.Chem.* **279**, 21787-21792.

Tindall,B.J. & Trüper,H.G. (1986) Ecophysiology of the aerobic halophilic archaebacteria. *System.Appl.Microbiol.* **7**, 202-212.

Toniolo,C. & Bonora,G.M. (1975) Structural aspects of small peptides. A circular dichroism study of monodisperse protected homo-oligomers derived from <FONT SIZE='-2'>L</FONT>-alanine. *Die Makromolekulare Chemie* **176**, 2547-2558.

Trivedi,V.D. & Spudich,J.L. (2003) Photostimulation of a Sensory Rhodopsin II/HtrII/Tsr Fusion Chimera Activates CheA-Autophosphorylation and CheY-Phosphotransfer in Vitro. *Biochemistry* **42**, 13887-13892.

Utsumi,R., Brissette,R.E., Rampersaud,A., Forst,S.A., Oosawa,K., & Inouye,M. (1989) Activation of Bacterial Porin Gene Expression by a Chimeric Signal Transducer in Response to Aspartate. *Science* **245**, 1246-1249.

von Lintig,J. & 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.

Waldron,T.T., Schrift,G.L., & Murphy,K.P. (2005) The Salt-dependence of a Protein-Ligand Interaction: Ion-Protein Binding Energetics. *J.Mol.Biol.* **346**, 895-905.

Wegener A.A. (2000) Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaebakteriellen Lichtrezeptors pSRII mit seinem Transducerprotein pHtrII. In: pp. 1-174. Fachbereich Chemie der Universität Dortmund.

Wegener,A.A., Chizhov,I., Engelhard,M., & Steinhoff,H.-J. (2000) 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., & Steinhoff,H.-J. (2001) Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis. *EMBO J.* **20**, 5312-5319.

Weis,R.M., Hirai,T., Chalah,A., Kessel,M., Peters,P.J., & Subramaniam,S. (2003) Electron Microscopic Analysis of Membrane Assemblies Formed by the Bacterial Chemotaxis Receptor Tsr. *J.Bacteriol.* **185**, 3636-3643.

Wright,S., Walia,B., Parkinson,J.S., & Khan,S. (2006) Differential Activation of Escherichia coli Chemoreceptors by Blue-Light Stimuli. *J.Bacteriol.* **188**, 3962-3971.

Yao,V.J. & 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.

Zhang,W., Brooun,A., McCandless,J., Banda,P., & Alam,M. (1996a) Signal transduction in the Archaeon *Halobacterium salinarium* is processed through three subfamilies of 13 soluble and membrane-bound transducer proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**, 4649-4654.

Zhang,W., Brooun,A., Mueller,M.M., & Alam,M. (1996b) 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,X.-N., Zhu,J., & Spudich,J.L. (1999) The specifity of interaction of archaeal transducers with their cognate rhodopsins is determined by their transmembrane helices. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **96**, 857-862.

8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
AS 1	Amphiphatische Sequenz 1
bp	Basenpaar
BR	Bakteriorhodopsin
Che A	Chemotaxisprotein A
Che B	Chemotaxisprotein B
Che C	Chemotaxisprotein C
Che R	Chemotaxisprotein R
Che W	Chemotaxisprotein W
Che Y	Chemotaxisprotein Y
Che Z	Chemotaxisprotein Z
CPM	counts per minute. Strahlung pro Minute.
Da	Dalten
DDM	N-Dodecyl-β-D-maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Erhylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
EtOH	Ethanol
FPLC	fast protein liquid chromatography
GPCR	G- Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HMW	high moleular weight
H_2O	Wasser
HPLC	high performance liquid chromatography
HR	Halorhodopsin
H. salinarum (H.s)	*Halobacterium salinarum*
Htr	halobakterieller Transducer

IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Bertani
LMW	low molecular weight
MCP	methyl accepting chemotaxis protein
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MTSL	1-Oxyl-2,2,5,5-tetrametylpyrrolin-3-methyl-metan-thiosulfonat-Label
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
N. pharaonis (N.p.)	*Natronobacterium pharaonis*
OD	optische Dichte
P	Phosphat-Rest
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglucol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Ionenkonzentration
PVDF	Polyvenyidenfluorid
RT	Raumtemperatur
s. Abb.	siehe Abbildung
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
SRI	sensorisches Rhodopsin I
SRII	sensorisches Rhodopsin II
Tar	Aspartat-Rezeptor
TM	Transmembrane Helix
Trg	Galaktose-Rezeptor
Tsr	Serin-Rezeptor
TY	Trypton yeast
Upm	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp

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

Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

9 Anhang

Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide	**Beschreibung**
pTXB3_N_His_TEV mut NcoI	In den pTXB3 – Vektor wird ein N-terminaler His-Tag mit folgender TEV-Schnittstelle eingefügt.
pTXB3_N_His_TEV_TGT mut NcoI	Die SapI-Schnittstelle im pTXB3_N_His_TEV mut NcoI wird mutiert zu TGT als Anfangstriplett des Proteins.
pTXB3_N_His_TEV_TCG mut NcoI	Die SapI-Scnittstelle im pTXB3_N_His_TEV mut NcoI wird mutiert zu TCG als Anfangstriplett des Proteins.
pTXB3_N_His_TEV_L82C-534	Zytoplasmatisches Fragment L82C-534 von *Np*HtrII als N-terminales His-TEV-Konstrukt.
pTXB3_N_His_TEV_K96C-534	Zytoplasmatisches Fragment K96C-534 von *Np*HtrII als N-terminales His-TEV-Konstrukt.
pTXB3_N_His_TEV_130-534	Zytoplasmatisches Fragment 130-534 von *Np*HtrII als N-terminales His-TEV-Konstrukt.
pET_HtrII_C173S_His	*Np*HtrII mit Mutation C173S als C-terminales His-Tag-Konstrukt.
pET_HtrII_S62C_His	*Np*HtrII mit Mutation C173S und S62C als C-terminales His-Tag-Konstrukt.
pET_HtrII_N346C_His	*Np*HtrII mit Mutation C173S und N346C als C-terminales His-Tag-Konstrukt.
pET_HtrII_I347C_His	*Np*HtrII mit Mutation C173S und I347C als C-terminales His-Tag-Konstrukt.
pET_HtrII_L348C_His	*Np*HtrII mit Mutation C173S und L348C als C-terminales His-Tag-Konstrukt.
pET_HtrII_A349C_His	*Np*HtrII mit Mutation C173S und A349C als C-terminales His-Tag-Konstrukt.
pET_HtrII_L350C_His	*Np*HtrII mit Mutation C173S und L350C als C-terminales His-Tag-Konstrukt.
pET_HtrII_V368C_His	*Np*HtrII mit Mutation C173S und V368C als C-terminales His-Tag-Konstrukt.
pET_HtrII_E372C_His	*Np*HtrII mit Mutation C173S und E372C als C-terminales His-Tag-Konstrukt.

pET_HtrII_E469C_His	*Np*HtrII mit Mutation C173S und E469C als C-terminales His-Tag-Konstrukt.
pET_HtrII_Q470C_His	*Np*HtrII mit Mutation C173S und Q470C als C-terminales His-Tag-Konstrukt.
pUCBM20_Tar-Teil	Teil des Tar-Gens von XbaI-Schnittstelle bis zum Ende des Gens.
pUCBM20_Tar-Teil_Mut_NdeI	Teil des Tar-Gens von XbaI-Schnittstelle bis zum Ende des Gens mit mutierter NdeI-Schnittstelle.
pET_*Np*HtrIIMCP2_237_266 (a)	FP zwischen *Np*HtrII und MCP2 aus *E. coli* mit den AS 1–237 vom HtrII und 266–553 vom MCP2.
pET_*Np*HtrIIMCP2_237_248 (b)	FP zwischen *Np*HtrII und MCP2 aus *E. coli* mit den AS 1–237 vom HtrII und 248–553 vom MCP2.
pET_*Np*HtrIIMCP2_223_248 (c)	FP zwischen *Np*HtrII und MCP2 aus *E. coli* mit den AS 1 – 223 vom HtrII und 248 – 553 vom MCP2.
pET_*Np*HtrIIMCP2_237_228 (d)	FP zwischen *Np*HtrII und MCP2 aus *E. coli* mit den AS 1 – 237 vom HtrII und 228 – 553 vom MCP2.
pET_*Np*HtrIIMCP2_223_228 (e)	FP zwischen *Np*HtrII und MCP2 aus *E. coli* mit den AS 1 – 223 vom HtrII und 228 – 553 vom MCP2.
pTXB3_N_His_TEV_CheA	CheA aus *E. coli* als N-terminales His-TEV-Konstrukt.
pTXB3_N_His_TEV_CheW	CheW aus *E. coli* als N-terminales His-TEV-Konstrukt.
pTXB3_N_His_TEV_CheY	CheY aus *E. coli* als N-terminales His-TEV-Konstrukt.
pTXB3_N_His_TEV_FP-a	FP-a als N-terminales His-TEV-Konstrukt.
pTXB3_N_His_TEV_FP-b	FP-b als N-terminales His-TEV-Konstrukt.
pTXB3_N_His_TEV_FP-c	FP-c als N-terminales His-TEV-Konstrukt.
pTXB3_N_His_TEV_FP-d	FP-d als N-terminales His-TEV-Konstrukt.
pTXB3_N_His_TEV_FP-e	FP-e als N-terminales His-TEV-Konstrukt.
pET_Tar_Mut	Tar-Gen mit mutierter NdeI-Schnittstelle.
pTrc_Tar_Mut	Tar-Gen mit mutierter NdeI-Schnittstelle.
pTrc_mut_NdeI_weg	Die NdeI-Schnittstelle im pTrc-99A Vektor ist entfernt worden.
pTrc_mut_NdeI_NcoI-NdeI	Die NcoI-Schnittstelle ist im pTrc_mut_NdeI_weg zur NdeI-Schnittstelle mutiert.
pTrc_*Np*HtrIIMCP2_237_266 (a)	FP-a im pTrc_mut_NdeI_NcoI-NdeI Vektor.
pTrc_*Np*HtrIIMCP2_237_248 (b)	FP-b im pTrc_mut_NdeI_NcoI-NdeI Vektor.
pTrc_*Np*HtrIIMCP2_223_248 (c)	FP-c im pTrc_mut_NdeI_NcoI-NdeI Vektor.

pTrc_*Np*HtrIIMCP2_237_228 (d)	FP-d im pTrc_mut_NdeI_NcoI-NdeI Vektor.
pTrc_*Np*HtrIIMCP2_223_228 (e)	FP-e im pTrc_mut_NdeI_NcoI-NdeI Vektor.
pACYC_pTrc_*Np*SRII	Das *Np*SRII-Gen mit vorgeschaltetem pTrc-Promotor.
pACYC_pTrc_*Np*SRII-pTrc-FP-a	Das FP-a und das SRII-Protein stehen beide jeweils hinter einem pTrc-Promotor auf einem Plasmid.
pACYC_pTrc_*Np*SRII-pTrc-FP-b	Das FP-b und das SRII-Protein stehen beide jeweils hinter einem pTrc-Promotor auf einem Plasmid.
pACYC_pTrc_*Np*SRII-pTrc-FP-c	Das FP-c und das SRII-Protein stehen beide jeweils hinter einem pTrc-Promotor auf einem Plasmid.
pACYC_pTrc_*Np*SRII-pTrc-FP-d	Das FP-d und das SRII-Protein stehen beide jeweils hinter einem pTrc-Promotor auf einem Plasmid.
pACYC_pTrc_*Np*SRII-pTrc-FP-e	Das FP-e und das SRII-Protein stehen beide jeweils hinter einem pTrc-Promotor auf einem Plasmid.

Oligonukleotide

Alle im Folgenden aufgeführten Oligonukleotide werden von der Firma MWG (Göttingen) oder Metabion (Martinsried) bezogen.

Die Mutationen im pTXB3_N_His_TEV mut NcoI Vektor werden mit den im Folgenden beschriebenen Oligonukleotiden durchgeführt:

Name	Orientierung	Sequenz
SapI_TGT_f	hin	5′–TCT ACT TCC AGT GTC GAA GAG CTG–3′
SapI_TGT_r	rev	5′–CAG CTC TTC GAC ACT GGA AGT AGA–3′
SapI_TCG_f	hin	5′–CTA CTT CCA GTC GCG AAG AGC TG–3′
SapI_TCG_r	rev	5′–CAG CTC TTC GCG ACT GGA AGT AG–3′
XbaI_His_TEV_f	hin	5′–ATT CCC CTC TAG AAA TAA TTT TG–3′
BamHI_His_TEV	rev	5′–TTA GCA GCC GGA TCC TAT TAT–3′

Zur Konstruktion von zytoplasmatischen Frag. des *Np*HtrII finden diese Primer Verwendung:

Name	Orientierung	Sequenz
SapI_L82C-534 _NpHtrII_f	hin	5′-ACT CGT TGG CTC TTC GTG TGG CGG TGA C-3′
SapI_K96C-534 _NpHtrII_f	hin	5′-TTT CAA CGC GCT CTT CGT GTG CCT CGC G–3′
SapI_130-534 _NpHtrII_f	hin	5′-TTC GAC GAG AGC TCT TCG TCG GTG CGG A–3′
BamHI_553_ NpHtrII_r neu	rev	5′-GTG GTG GTG GGA TCC TTA ATC ATC CCC–3′

Zur Einführung von Cystein-Mutationen in den *Np*HtrII-His dienen diese Primer:

Folgende Oligonukleotide werden zur Entfernung des natürlichen Cysteins benutzt:

Name	Orientierung	Sequenz
AgeI_HtrII_f	hin	5′–CGC GAC CGG TGA TGC CGC A–3′
HtrII_SacI_R	rev	5′–TTC GTT GAG CTC TTC CAT CG–3′
FP_C173S_f	hin	5′–TGA TGG ACC GCT CTG CCG AC–3′
FP_C173S_r	rev	5′–GTC GGC AGA GCG GTC CAT CA–3′

Als flankierende Primer der PCR dienen folgende:

Name	Orientierung	Sequenz
HtrII_PstI_f:	hin	5′–GGA ACT GCA GGC CGA AGC–3′
HindIII_HtrII_r	rev	5′–GGC CGC AAG CTT TAT TAG TG–3′
AgeI_HtrII_f	(s. oben)	
HtrII_SacI_R	(s. oben)	

In den Mutationsprimern ist das der neu eingeführten Aminosäure entsprechende Codon jeweils durch Unterstreichung hervorgehoben:

Mutation	Orientierung	Sequenz
S62C	hin	5′–CGG CAG TAT GCG CCA TTC TCG–3′
	rev	5′–CGA GAA TGG CGC ATA CTG CCG–3′
N346C	hin	5′–CCG AGC AGA CGT GCA TCC TCG–3′
	rev	5′–CGA GGA TGC ACG TCT GCT CGG–3′
I347C	hin	5′–CAG ACG AAC TGC CTC GCG CTG–3′
	rev	5′–CAG CGC GAG GCA GTT CGT CTG–3′
L348C	hin	5′–GAC GAA CAT CTG CGC GCT GAA–3′
	rev	5′–GTT CAG CGC GCA GAT GTT CGT C–3′
A349C	hin	5′–AAC ATC CTC TGC CTG AAC GCC TC–3′
	rev	5′–GAG GCG TTC AGG CAG AGG ATG TT–3′
L350C	hin	5′–ATC CTC GCG TGC AAC GCC TCT AT–3′
	rev	5′–ATA GAG GCG TTG CAC GCG AGG AT–3′
V368C	hin	5′–GCT TCG CGT GCG TCG CCG AC–3′
	rev	5′–GTC GGC GAC GCA CGC GAA GC–3′
E372C	hin	5′–TCG TCG CCG ACT GCG TCA AGG C–3′
	rev	5′–GCC TTG ACG CAG TCG GCG ACG A–3′
E469C	hin	5′–GCG ACA TCC TGT CAG ACT GCA AG–3′
	rev	5′–CTT GCA GTC TGA CAG GAT GTC GC–3′
Q470C	hin	5′–GAC ATC CGA ATG TAC TGC AAG C–3′
	rev	5′–GCT TGC AGT ACA TTC GGA TGT C–3′

Zur Klonierung der Fusionsproteine werden folgende Primer verwendet:

Die Amplifikation des Tar-Teils erfolgt mit diesen Oligonukleotiden:

Name	Orientierung	Sequenz
Tar_XbaI_f	hin	5′–TGA TTA TCT AGA TTA TGG CAA TAC–3′
Htr/Tar-Stop HindIIIr	rev	5′–AGT AAA AGC TTA TCA AAA TGT TTC CCA–3′

Zur Mutation der NdeI-Schnittstelle im Tar-Gen werden folgende Primer verwendet:

Name	Orientierung	Sequenz
Tar_XbaI_f	(s.o.)	
Tar768bpT/Cmut_f	hin	5′-GCG TTT CAC ACA TGC AAC GCT C–3′
Tar768bpT/Cmut_r	rev	5′-GAG CGT TGC ATG TGT GAA ACG C–3′
Tar_AgeI_r	rev	5′-GCA CCG AAC CGG TAT CAA CG–3′

Flankierende Primer der PCR der einzelnen Teile der Chimären:

Name	Orientierung	Sequenz
NpHtrII_NdeI_f	hin	5′-AAT AAC ACC ATA TGT CGC TGA AC–3′
Htr/Tar-StopHindIIIr	(s.o.)	

Schnittstellen-Oligonukleotide:

Schnittst.	Orientierung	Sequenz
237_266	hin	5′–GGT CAT GGA GGC CAG CAC TCA TGT CCG CGA AG–3′
	rev	5′–CTT CGC GGA CAT GAG TGC TGG CCT CCA TGA CC–3′
237_248	hin	5′–GGT CAT GGA GGC CAG CGG CGA CCT GGC GCA G–3′
	rev	5′–CTG CGC CAG GTC GCC GCT GGC CTC CAT GAC C–3′
223_248	hin	5′–GGT CTC CGA GGA CGC AGG CGA CCT GGC GCA G–3′
	rev	5′–CTG CGC CAG GTC GCC TGC GTC CTC GGA GAC C–3′
237_228	hin	5′–GGT CAT GGA GGC CAG CCG CGA AAT CGC CGG TG–3′
	rev	5′–CAC CGG CGA TTT CGC GGC TGG CCT CCA TGA CC–3′
223_228	hin	5′–GGT CTC CGA GGA CGC ACG CGA AAT CGC CGG TG–3′
	rev	5′–CAC CGG CGA TTT CGC GTG CGT CCT CGG AGA CC–3′

Zur Herstellung des pTXB3_N_His_TEV mut NcoI werden phosphorylierte Primer verwendet:

Name	Orientierung	Sequenz
NcoI_His_link_f	hin	5′–PHO-CAT GGA TGC ACC ACC ACC ACC ACC ACG GTG GTG GTG GT–3′
link_TEV_SapI_SpeI_f	hin	5′–PHO-GAG AAC CTC TAC TTC CAG ATG CGA AGA GC–3′
NcoI_His_link_r	rev	5′–PHO-CCA CCA CCG TGG TGG TGG TGG TGG TGC ATC–3′
link_TEV_SapI_SpeI_r	rev	5′–PHO-GCA GCT CTT CGC ATC TGG AAG TAG AGG TTC TCA CCA–3′

Für die Amplifizierung der Che-Proteine aus *E. coli* und der Chimären dienen folgende Oligonukleotide:

Che	Orientierung	Sequenz
A	hin	5′–CAC ACA CAC GCT CTT CGA TGA GCA TGG ATA TAA–3′
	rev	5′–CGC GGA TCC TCA GGC GGC GGT GTT CG–3′
W	hin	5′–CAC ACA CAC GCT CTT CGA TGA CCG GTA TGA CGA ATG–3′
	rev	5′–CGC GGA TCC TTA CGC CAC TTC TGA CGC–3′
Y	hin	5′–CAC ACA CAC GCT CTT CGA TGG CGG ATA AAG AAC TT–3′
	rev	5′–CGC GGA TCC TCA CAT GCC CAG TTT CTC A–3′
FP	hin	5′–CAC ACA CAC GCT CTT CGA TGT CGC TGA ACG TAT CAC–3′
	rev	5′–CGC GGA TCC TTA TCA AAA TGT TTC CCA GTT–3′

Zur Amplifizierung und gleichzeitiger Mutation der NdeI-Schnittstelle im Tar-Gen Teil wurden folgende Primer verwendet:

Name	Orientierung	Sequenz
NdeI_Tar_for	hin	5′–GGA ATT CCA TAT GAT TAA CCG TAT CCG CGT –3′
Tar_AgeI_r	(s.o.)	
Htr/Tar-StopHindIIIr	(s.o.)	

Zur Einführung der Mutationen, d.h. Entfernung der NdeI-Schnittstelle und Umwandlung der NcoI in eine NdeI-Schnittstelle, im pTrc-99A Vektor wird das QuikChange site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene mit folgenden Oligonukleotiden verwendet:

Name	Orientierung	Sequenz
pTrc_NdeI_weg_f	hin	5′–CGG TAT TTC ACA CCG CAA ATG GTG CAC TCT CAG TAC–3′
pTrc_NdeI_weg_r	rev	5′–GTA CTG AGA GTG CAC CAT TTG CGG TGT GAA ATA CCG–3′
pTrc_NcoI/NdeI_Mut_f	hin	5′–TTT CAC ACA GGA AAC AGA CAT ATG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG G–3′
pTrc_NcoI/NdeI_Mut_r	rev	5′–CCC CGG GTA CCG AGC TCG AAT TCA TAT GTC TGT TTC CTG TGT GAA A–3′

Die Umklonierung der Fusionsproteine und des SRII-Proteins auf ein Plasmid wird mittels folgender Primer durchgeführt:

Name	Orientierung	Sequenz
EcoRI_ pTrcSRII_f	hin	5′–TCA CTG CAG AAT TCG TGT CG–3′
SRII_SacII_r	rev	5′–TGC CGC GGT TAC TAG TCG GCG AC–3′

Zur Kontrolle der durch PCR amplifizierten Produkte werden folgende Primer zur Sequenzierung verwendet:

Name	Orientierung	Sequenz
T7-prom Primer	hin	5′–TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG–3′
T7-term Primer	rev	5′–GCT AGT TAT TGC TCA GCG G–3′
T7 term intern rev	rev	5′–GGA TAT AGT TCC TCC TTT CAG–3′
Mittleres NpHtrII	hin	5′–TAC AGG AGG CGG CAG TAT–3′
pHtrII-D115C-5'	hin	5′–CCG TCG CGA GTG CGA AAT CGG C–3′
RPS_09	rev	5′–CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG–3′
M13 -40	hin	5′–GTT TTC CCA GTC ACG AC–3′
M13 rev	rev	5´-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3′
M13 uni	hin	5′-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3′
cheA_882_for	hin	5′–ACT GGA CCC GGT TAA TCA T–3′
cheA_1082_rev	rev	5′–TCA GTA GAA CTG CCC ACC A–3′
Seq_SRII_rev	rev	5′–CGC CAC CAC TGA TTT GAG–3′
FP_E400C_f	hin	5′–GTG GCG GGT TGC GTG CGT AAT–3′
NpHtrII_A122C_for	hin	5′–CGA CCT CTA TTG TGC CTT CGA CG–3′
NpHtrII_A290_for	hin	5′–CCG AAA CGG GCG AAG CC–3′
NdeI_Tar_f	hin	5′–GGA ATT CCA TAT GAT TAA CCG TAT CCG CGT AG–3′

Als zusätzliche Sequenzierungsprimer werden auch Primer benutzt, die schon zur PCR Amplikation gebraucht wurden.

Danksagungen

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Engelhard für die sehr interessante Aufgabenstellung und für seine ständige Unterstützung während der gesamten Zeit.
Für die offizielle Betreuung der Arbeit an der Heinrich-Heine-Universität bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. G. Büldt vom IBI-2 im Forschungszentrum Jülich.
Bei Herrn Prof. Dr. D. Willbold möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferats bedanken.
Herrn Prof. Dr. R. S. Goody danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am MPI Dortmund durchzuführen.
Für die große Hilfe bei molekularbiologischen Problemen möchte ich mich recht herzlich bei Herr Dr. R. Seidel bedanken.
Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Igor Chizhov für die Photozyklus-Messungen und die ständige Bereitschaft kinetische Messungen zu diskutieren und zu interpretieren.
Prof. Dr. F. Siebert und seiner Gruppe sei ein großer Dank für die gute Zusammenarbeit und insbesondere Sven Reisdorf für die FTIR-Messungen.
Für eine gute Zusammenarbeit sei auch Herrn Prof. Dr. H.-J. Steinhoff und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Enrika Bordignon, Meike Döbber, Julia Holterhues und Dr. J. Klare gedankt. Auch für die prächtige Unterstützung und Interpretation bei den ESR-Messungen.
Stefan Grudzianek danke ich für die Einführung in die Problematik der CD-Spektroskopie.
Ein besonderes Dankeschön geht an Valentin Gordeliy aus der Arbeitsgruppe von Prof. G. Büldt, der die Kristallisation des Transducers durchführt hat.
Ein ganz großes Dankeschön geht auch an Dr. Johann Klare, der mir immer bei jeglichen Problemen zur Seite stand und mir viele Denkanstöße bei Interpretationen gegeben hat.
Ich möchte mich weiterhin besonders bei Annika Göppner, Anke Reulen und Martina Wischnewski für ihre große Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor bedanken.
Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Engelhard, der „Bürogemeinschaft“ und Sascha Gentz für viele nette Stunden und auch ihre Hilfsbereitschaft bei vielen Problemen.
Der gesamten Abteilung III des MPI Dortmund möchte ich für eine gute und freundliche Arbeitsatmosphäre danken.
Besonders möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren große und ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
Meinem Freund Georg möchte ich ebenfalls einen herzlichen Dank sagen für seine Motivation und Verständnis. Ohne ihn hätte mir oftmals die Kraft gefehlt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Nadine Mennes
Geburtsdatum:	03.06.1979
Geburtsort:	Hamm
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch

Schulbildung

08/1985 – 07/1989	Besuch der Talschule
08/1989 – 06/1998	Besuch des Galilei-Gymnasiums mit dem Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

01/1998 – 08/2003	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Abschluss: Diplom Biologin Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund: „Transducer Chimären: Entwicklung von phototaktisch aktiven Escherichia coli Bakterien.“

Dissertation

Seit 10/2003	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund als Promotionsstudentin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Dissertation: “Strukturelle und funktionelle Untersuchungen des Transducers HtrII aus *Natronomonas pharaonis* und von HtrII/Tar-Chimären.“

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Dortmund, den 27.11.2006