

Untersuchung der Struktur und Funktion von Sieben-Helix- Membranrezeptoren

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Chemie
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von Dipl. Chemikerin Swetlana Martell
aus Dortmund

Dortmund, August 2008

Meiner Mutter
&
Meiner Schwester

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.

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Engelhard
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Lippert

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

(Swetlana Martell)

Dortmund, August 2008

Teile diese Arbeit wurden bereits publiziert:

- Structural Analysis of a HAMP Domain. The linker region of the phototransducer in complex with sensory rhodopsin II, Bordignon E., Klare, J. P., Doebber M., Wegener A.A., Martell S., Engelhard M., Steinhoff H.-J., *JBC*, **280**, 46, 38767-38775, 2005.
- Analysis of Light-Induced Conformational Changes of *Natronomonas pharaonis* Sensory Rhodopsin II by Time Resolved Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, Bordignon E., Klare J. P., Holterhues J., Martell S., Krasnaberski A., Engelhard M., Steinhoff H.-J., *Photochemistry and Photobiology Journal*, **83**, 8-10, 2007.
- Interaction of a G Protein-coupled Receptor with a G Protein-derived Peptide Induces Structural Changes in both Peptide and Receptor: A Fourier-transform Infrared Study Using Isotopically Labeled Peptides, Vogel R., Martell S., Mahalingam M., Engelhard M., Siebert F., *JMB*, **366**, 1580-1588, 2007.
- Secondary Structure, Dynamics, and Topology of a Seven-Helix Receptor in Native Membranes, Studied by Solid-State NMR Spectroscopy, Etzkorn M., Martell S., Andronesi O. C., Seidel K., Engelhard M., Baldus M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 459-462, 2007.

Abkürzungen und Symbole

Abb	Abbildung
bp	Basenpaar
BR	Bakteriorhodopsin
CD	Zirkulardichroismus
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CheA	Chemotaxisprotein A
CheB	Chemotaxisprotein B
CheR	Chemotaxisprotein R
CheW	Chemotaxisprotein W
CheY	Chemotaxisprotein Y
CheZ	Chemotaxisprotein Z
CMC	kritische Mizellenkonzentration
DDM	N-Dodecyl- β -D-maltosid
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPL	<i>Expressed Protein Ligation</i>
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
GDP	Guanosindiphosphat
Gt	G-Protein Transducin
Gt α	α -Untereinheit des G-Protein Transducins
Gt α (340-350)	IKENLKDCGLF
GTP	Guanosintriphosphat
GZ	Grundzustand
<i>H. salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
Htr	halobakterieller Transducer des Rhodopsins
IPTG	Isopropylthiogalactosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie

kDa	Kilodalton
MCP	methyl accepting chemotaxis protein
MTSSL	(1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-methyl) methanthiosulfonat
NCL	<i>Native Chemical Ligation</i>
<i>N. pharaonis</i>	<i>Natronobacterium pharaonis</i>
<i>NpHtrII</i>	<i>N. pharaonis</i> Transducer des sensorischen Rhodopsins II
<i>NpSRII</i>	<i>N. pharaonis</i> sensorisches Rhodopsin II
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Peptidbindungsspektrum
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
Peptide 18	MLENLKDCGLF
PM	Purpurmembran
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDSL	site directed spin labeling
TM	Transmembrane Helix
TCEP	(Tris-(carboxyethyl)-phosphin
ü.N.	über Nacht
VÄ	Volumen-Äquivalent
v/v	volume/volume
<i>wt</i>	Wildtyp
w/v	weight/volume
w/w	weight/weight
ε	molarer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge des Lichtes

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

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	- 1 -
2. Material und Methoden.....	- 17 -
2.1 Chemikalien	- 17 -
2.2 Instrumentation	- 18 -
2.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	- 19 -
2.3.1 Bakterienstämme.....	- 19 -
2.3.2 Plasmide.....	- 19 -
2.3.3 Oligonukleotide.....	- 19 -
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	- 22 -
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	- 22 -
2.4.2 Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten	- 23 -
2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 23 -
2.4.4 Restriktion von DNA	- 26 -
2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten	- 26 -
2.4.6 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	- 26 -
2.4.7 DNA-Sequenzierung.....	- 27 -
2.4.8 Zellanzucht	- 27 -
2.5 Proteinchemische Methoden.....	- 28 -
2.5.1 Proteinexpression in <i>E. coli</i>	- 28 -
2.5.2 Zellaufschluss und Aufreinigung der Proteine	- 29 -
2.5.3 Spinmarkierung	- 30 -
2.5.4 Rekonstitution der Membranproteine in PM-Lipide.....	- 31 -
2.5.5 Präparation von Liposomen.....	- 31 -
2.5.6 <i>Expressed Protein Ligation</i>	- 32 -
2.6 Analytische Methoden.....	- 33 -
2.6.1 SDS-PAGE	- 33 -
2.6.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	- 34 -
2.6.3 Massenspektrometrie	- 35 -
2.7 Biophysikalische Methoden.....	- 36 -
2.7.1 Photozyklusmessungen durch Blitzlichtphotolyse	- 36 -
2.7.2 ESR-Spektroskopie	- 37 -
2.7.3 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	- 39 -

2.7.4 Zirculardichroismus (CD).....	- 41 -
2.7.5 FTIR-Spektroskopie.....	- 42 -
3. Ergebnisse.....	- 44 -
3.1 ESR-Untersuchungen zur Signaltransduktion des Rezeptor-Transducer-Komplexes NpSRII/NpHtrII ₁₅₇	- 44 -
3.1.1 Auswahlkriterien für die Spinmarkierung	- 44 -
3.1.2 Expression und Aufreinigung.....	- 46 -
3.1.3 Photozyklusmessungen.....	- 49 -
3.1.4 ESR-Untersuchungen zur Konformationsänderungen am Rezeptor	- 54 -
3.1.5 Raumtemperatur (cw)-ESR-Spektren.....	- 55 -
3.1.6 Zeitaufgelöste ESR-Spektren	- 58 -
3.1.7 Tieftemperatur ESR-Spektren	- 61 -
3.1.8 Aktivierung der TM2 mit D75N-Mutanten	- 65 -
3.2 ESR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung der HAMP-Domäne.....	- 67 -
3.2.1 Auswahl der Positionen für die Spinmarkierungen	- 69 -
3.2.2 Expression und Aufreinigung der Transducermutanten.....	- 71 -
3.2.3 Raumtemperatur ESR-Untersuchungen der Transducermutanten.....	- 71 -
3.2.4. Tieftemperatur ESR-Untersuchungen der Transducermutanten	- 74 -
3.3 Expressed Protein Ligation von Transducerfragmenten	- 74 -
3.3.1 Klonierungsstrategie von Transducersegmenten	- 77 -
3.3.2 Expression & Aufreinigung des Fusionskonstrukts HtrII1-94-MXE-His. -	79 -
3.3.3 Expression und Aufreinigung des Fusionskonstrukts GST-TEV-HtrIIA95C-114.....	- 80 -
3.3.4 Expression und Aufreinigung des Fusionskonstrukts GST-TEV-HtrIIA95C-157.....	- 83 -
3.3.5 <i>Expressed Protein Ligation</i> von HtrII(1-94)-Cys-(96-114).....	- 85 -
3.3.6 Charakterisierung der Sekundärstruktur von HtrII(1-94)-Cys-(96-114). -	87 -
3.3.7 Bindungsstudien von HtrII(1-94)-Cys-(96-114) an NpSRII-His	- 88 -
3.3.8 <i>Expressed Protein Ligation</i> von HtrII(1-94)-Cys-(96-157).....	- 90 -
3.3.9 Charakterisierung der Sekundärstruktur von HtrII(1-94)-Cys-(96-157). -	92 -
3.3.10 Bindungsstudien von HtrII(1-94)-Cys-(96-157) an NpSRII-His	- 93 -
3.4 Wechselwirkungen zwischen Rhodopsin und peptide 18.....	- 95 -
3.4.1 Klonierungsstrategie von <i>peptide 18</i>	- 95 -
3.4.2 Expression und Aufreinigung von <i>peptide 18</i>	- 96 -

3.4.3 Verfolgung struktureller Änderungen zwischen Rhodopsin und <i>peptide 18</i> während der Komplexbildung mittels FTIR-Spektroskopie	- 98 -
4. Diskussion	- 102 -
4.1 ESR-Untersuchungen zur Signaltransduktion des Rezeptor-Transducer Komplexes NpSRII/NpHtrII ₁₅₇	- 103 -
4.2 ESR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung der HAMP-Domäne	- 113 -
4.3 Expressed Protein Ligation von Transducerfragmenten	- 116 -
4.4 Wechselwirkungen zwischen Rhodopsin und <i>peptide 18</i>	- 119 -
5. Zusammenfassung	- 121 -
6. Literatur	- 123 -
7. Anhang	- 131 -

1. Einleitung

Die Entwicklung und Überlebensstrategie aller Lebewesen basiert auf der Adoption der Organismen an äußeren Lebensbedingungen. Die Archaeobakterien sind durch ihre schnelle Anpassung und Überleben unter äußersten Bedingungen, wie z.B. heiße Quellen oder Salinen, bekannt. Da sie keinen Zellkern besitzen, gehören sie zytologisch zu den Prokaryoten, sind jedoch hinsichtlich ihrer Erbsubstanz näher mit Eukaryoten verwandt. Sie müssen unter Extremwerten von Temperatur (bis 80°C Hyperthermophile), pH-Wert (Acidophile bzw. Alkaliphile) oder Salzgehalt (Halophile) überleben und sich vermehren (Oesterhelt and Marwan, 2005). Diese Bakterien haben ein System von intrazellulärer Signaltransduktion entwickelt, welches verschiedene Proteine, die sog. membran-gebundene Rezeptoren einbezieht. Die Rezeptoren sind für die Verarbeitung äußerer Reize verantwortlich. Sie können als intrazelluläre Botenstoffe, wie Hormone, Neuronentransmitter, Wachstums- und Entwicklungs-Faktoren und als sensorische Rezeptoren für Licht, Geruch oder Geschmack fungieren (Bockaert and Pin, 1999). Die auf chemische Botenstoffe reagierenden Rezeptoren werden als Chemorezeptoren, die auf Licht reagierenden als Photorezeptoren bezeichnet.

Die häufigsten Vertreter der Familie der membran-gebundenen Rezeptoren stellen die G-protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und die Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren dar. Dabei handelt sich um die Sieben-Helix-Membranrezeptoren, die einen Retinalchromophor über eine protonierte Schiff Base gebunden haben. Solche Rezeptorproteine sind in allen Organismen, den Eubakterien, Eukaryoten und Archaeobakterien zu finden.

Die Archaeen besitzen ein Fortbewegungsorgan, die Geißeln, welche durch Photorezeptoren gesteuert werden (Oesterhelt *et al.*, 2005). Die äußeren Reize z.B. bei *Halobacterium Salinarum* werden von vier Pigmenten (Abb. 1.1) detektiert und verarbeitet. Diese vier Pigmente gehören zu der Gruppe der archaeobakteriellen Rhodopsine und unterteilen sich in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen, den Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) sowie den sensorischen Rhodopsinen Sensorrhodopsin I (SRI) und Sensorrhodopsin II (SRII).

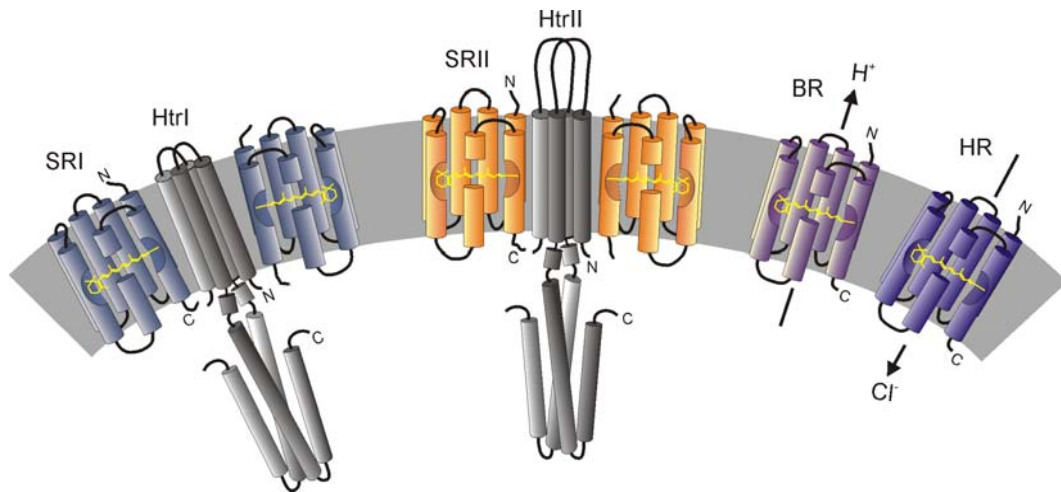


Abb. 1.1: Transmembrane Anordnung der archaebakteriellen Rhodopsine aus *H. salinarum*. Die zytoplasmatische Seite befindet sich in dieser Abbildung unterhalb der Membran, der extrazelluläre Raum oberhalb. Die sensorischen Rhodopsine SRI und SRII bilden mit den jeweiligen Transducern HtrI und HtrII einen 2:2-Komplex aus (links). Rechts: Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) (Klare et al., 2002).

Bakteriorhodopsin ist eine lichtbetriebene Protonenpumpe, die entgegen dem Membranpotential, aktiv Protonen aus der Zelle pumpt. Das Halorhodopsin transportiert, zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts mit der Umgebung, unter Lichteinwirkung Chloridionen ins Zellinnere. Die sensorischen Rhodopsine SRI und SRII sind für die Phototaxis verantwortlich. Das SRI dient dabei als photochromes Pigment für Oranges- und UV-Licht, das SRII als Blaulichtrezeptor.

Bei dem Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* handelt es sich um einen stäbchenförmigen Zellkörper mit bipolar insertierten Flagellen (Abb.1.2). Diese bilden eine Art Schiffsschraube, die durch eine Drehung im Uhrzeigersinn eine Rückwärtsbewegung und gegen den Uhrzeigersinn eine Vorwärtsbewegung hervorrufen. Unter neutralen Lichtverhältnissen wechselt das Flagellenbündel seine Drehrichtung alle 10 Sekunden. Durch die Brownsche Molekularbewegung führt die Zelle eine Zufallsbewegung aus (Oesterhelt et al., 2005).

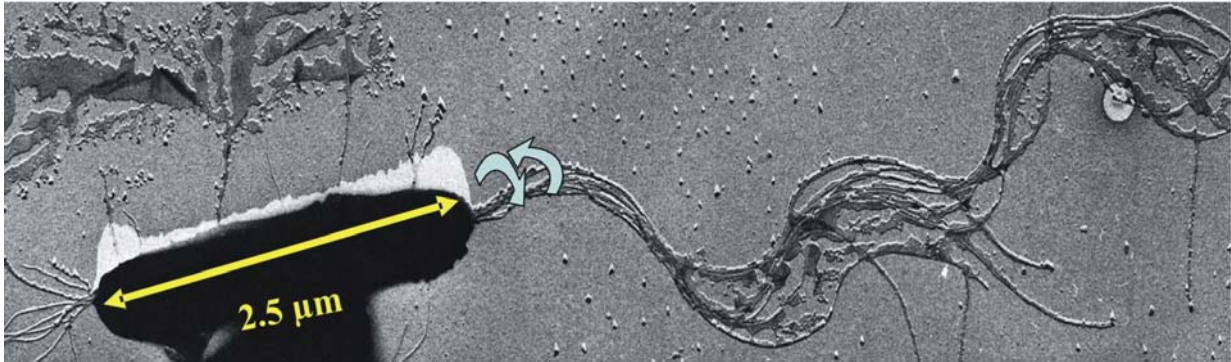


Abb. 1.2: Stäbchenförmiger Zellkörper des *Halobacterium salinarum* mit bipolar insertierten Flagellen (Alam and Oesterhelt, 1984).

Auf die Bestrahlung mit blauem Licht (negativer Stimulus) reagiert das Bakterium mit einer Erhöhung der Wechselfrequenz und damit mit der Entfernung von der Lichtquelle. Bei der Bestrahlung mit orangenem Licht (positiver Stimulus) erfolgt eine Verlangsamung der Wechselfrequenz, die eine Verlagerung des statistischen Bewegungsmittelpunktes der Zelle in Richtung einer attraktiven Umgebung induziert (Alam *et al.*, 1984). Dieser bakterielle Sehprozeß wird als Phototaxis bezeichnet.

Der für die Adaption im orangenen Licht sowie die Fluchtbewegung aus dem UV-Licht verantwortliche Rezeptor ist das Sensorrhodopsin I. Sensorrhodopsin II ist nur für die Flucht aus dem schädlichen Blaulicht verantwortlich (Hildebrand & Dencher, 1975; Spudich & Bogomolni, 1984; Takahashi *et al.*, 1985). Die Sensorrhodopsine treten in der Zellmembran gemeinsam mit einem zugehörigen Signalübertragungsprotein Htr (**h**alobacterial **t**ransducer of **r**hodopsin) auf, das ein detektiertes Signal an eine komplexe biochemische Signalkette im Zellinneren weiterleitet. Der zu SRI gehörige Transducer wird als HtrI, der zu SRII entsprechend als HtrII bezeichnet. In der Membran bilden die beiden Sensorrhodopsine mit den jeweiligen Transducern einen 2:2-Komplex aus (Chen Xinpu & Spudich, 2002; Wegener *et al.*, 2001) (Abb. 1.1).

Das Lichtsignal wird von dem Rezeptor wahrgenommen und über den Transducer in das Zellinnere weitergeleitet. Die Signaltransduktionskaskade, ein Zweikomponentensystem, besteht aus einer (Sensor-) Kinase, die Informationen aufnimmt und einem „Response-Regulator“, den die Kinase phosphoryliert und dadurch aktiviert. Ein Modell der der Phototaxis zu Grunde liegenden Signaltransduktionskette ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

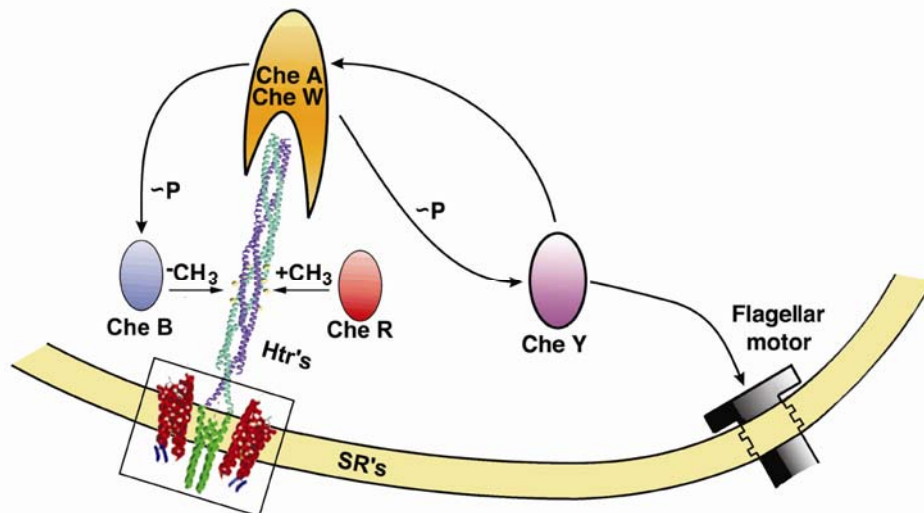


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der archaebakteriellen Signaltransduktion (Gordeliy et al., 2002). Über die Aktivierung des Chemorezeptors CheA erfolgt die Dephosphorylierung des CheY-Rezeptors, welcher das Signal zum Flagellar-Motor weiterleitet. Dieser dreht sich gegen den Uhrzeigersinn bzw. im Uhrzeigersinn um das Bakterium vorwärts bzw. rückwärts schwimmen zu lassen.

Bei dem für die Phototaxis verantwortlichen Zwei-Komponenten-System ist die Sensor-Kinase CheA über das Adapter-Protein CheW an die Signaldomäne gebunden und bildet zusammen mit dem Response-Regulator CheY einen quaternären Komplex (Schuster et al., 1993). Durch Stimulation des Rezeptors wird die Kinase CheA autophosphoryliert. In einem weiteren Schritt wird die Phosphatgruppe auf den Response-Regulator CheY übertragen, der als Signalgeber zum Schaltkomplex am Flagellar-Motor diffundiert und dort eine kooperative Konformationsänderung bewirkt. Infolgedessen wird die Drehrichtung, welche ursprünglich entgegen dem Uhrzeigersinn rotiert, umgekehrt. Rotation gegen den Uhrzeigersinn (Vorwärtsbewegung) ist der Standardzustand. Das kurzlebige phospho-CheY dephosphoryliert durch eine selbstkatalysierte Reaktion. Dies wiederum begünstigt die Drehung des Flagellar-Motors im Uhrzeigersinn und es kann eine kontinuierliche Schwimmbewegung des Bakteriums beobachtet werden (Eisenbach M, 1996). Aktiviertes CheA phosphoryliert jedoch nicht nur CheY, sondern kann die Phosphatgruppe auch an die Methylesterase CheB übertragen, welche daraufhin den Transducer demethyliert. Dieses hat eine Herabsetzung der Autophosphorylierungs-Aktivität von CheA und damit einen gegenläufigen Effekt zur Folge. Andererseits, bedingt durch die geringe CheA-Aktivität, wird der Methylierungsgrad erhöht und steigert seinerseits die CheA-Aktivität. Dieser

Mechanismus erlaubt es dem Bakterium sich an optimale Lichtbedingungen zu adaptieren.

Die zelluläre Signaltransduktionskaskade beginnt mit dem direkten Signaltransfer vom Rezeptor zur Signaldomäne des Transducers. Die Rezeptoren binden einen über die protonierte Schiff Base gebundenen Chromophor Retinal. Die lichtinduzierte Startreaktion ist die Isomerisierung des Retinals. Bei den eukaryotischen Rhodopsinen erfolgt die Isomerisierung von 11-*cis* zur *all-trans* Konfiguration. Bei den archaebakteriellen Rhodopsinen erfolgt die Isomerisierung des Retinals von *all-trans*- zu 13-*cis*. Dabei durchläuft die Isomerisierung eine zyklische Reaktion, die als Photozyklus bezeichnet wird. Dieser konnte für den aus *Natronomonas pharaonis* isolierten sensorischen Rhodopsin II *NpSRII* (Chizhov et al., 1998) (Abb. 1.4), für den Rezeptor *HsSRI* (Schmies et al., 2000) sowie den Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (Chizhov et al., 1996) und Halorhodopsin (Chizhov & Engelhard, 2001) im Detail aufgeklärt werden.

In Folge einer Lichtisomerisierung durchläuft das *NpSRII* eine Reihe von Intermediaten, die in Anlehnung an die Reaktionskinetik von Rhodopsin, als K-, L-, M-, N- und O-Intermediate bezeichnet werden. Während des L-M-Übergangs wird das Proton der anfänglich protonierten Schiff'schen Base an die Aminosäure Asp75 abgegeben und gelangt über weitere Reaktionsschritte in den extrazellulären Raum. Die Deprotonierung der Schiff'schen Base äußert sich in einer starken Blauverschiebung der Absorptionsbande. Nach erfolgreicher Reprotonierung der Schiff'schen Base reisomerisiert das Retinal und relaxiert in seinen Grundzustand (Abb. 1.4).

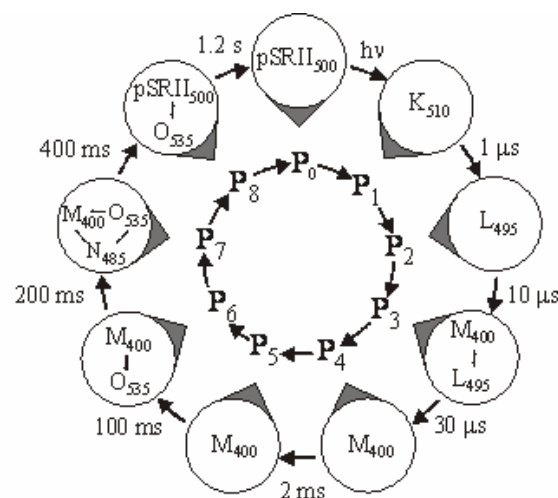


Abb. 1.4: Modell des Photozyklus des Rezeptors SRII aus *N. pharaonis*. Die gebildeten Intermediate werden durch die Buchstaben K, L, M, N und O bezeichnet. Die jeweiligen Absorptionsmaxima werden als Indizes dargestellt (Chizhov et al., 1998).

Der M-Zustand beschreibt den aktiven Zustand von SRII. Die Signalübertragung von dem Rezeptor zu dem Transducer erfolgt im Zeitraum von 2 ms während des M1-M2-Übergangs.

Die strukturellen Daten zur Membrandomäne sind anhand der Kristallstruktur von dem membranständigen Teil des Rezeptor-Transducer-Komplexes aus *N. pharaonis* (Gordeliy *et al.*, 2002) bekannt (Abb. 1.5). Gordeliy *et al.* gelang es Sensorrhodopsin II im Komplex mit dem verkürzten Transducer in kubischen Lipidphasen zu kristallisieren. Der Rezeptor-Transducer Komplex *NpSRII/NpHtrII*₁₁₄ wurde im K-Intermediat und *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇ im M-Intermediat aufgelöst.

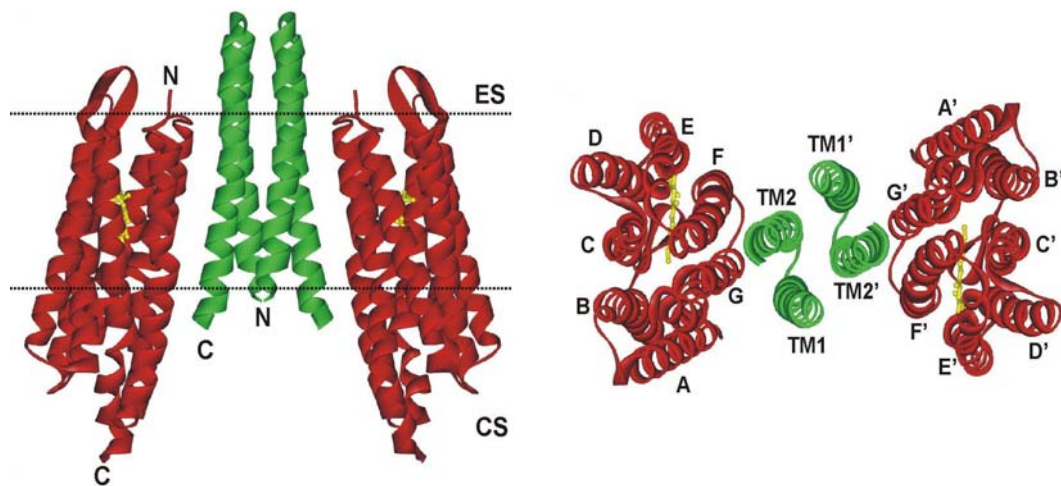


Abb. 1.5: Kristallstruktur des 2:2 SRII-Transducer-Komplexes aus *N. pharaonis*. Links: Seitenansicht des Komplexes. Rot dargestellt ist der Rezeptor, grün das Transducerdimer, gelb das Retinal. „ES“ beschreibt den extrazellulären Raum, „CS“ die zytoplasmatische Seite. Die gestrichelten Linien grenzen den hydrophoben Bereich ab. Rechts: die Sicht von der zytoplasmatischen Seite (Gordeliy *et al.*, 2002).

Aus der Kristallstruktur wird ersichtlich, dass die SRII-Rezeptoren mit den Transducer-Proteinen (HtrII) einen 2:2-Komplex ausbilden. Die Transducerhelices TM1 und TM2 stellen dabei die Kontaktflächen zu den Helices F und G des Rezeptors dar. Da der Abstand zwischen der Transducerhelix TM2 zu den beiden Rezeptorhelices etwa gleich ist, besteht die Möglichkeit des Signalaustausches über Helices F bzw. G.

Die Kristallstrukturuntersuchungen (Moukhametzianov *et al.*, 2006) schlagen einen Mechanismus bezüglich der Aktivierung der TM2-Helix vor, indem eine Verschiebung der Helix G um 0,5 Å stattfindet. Dadurch wird eine TM2-Rotation von 15° mit anschließender Verschiebung um 0,9 Å initiiert (Abb. 1.6).

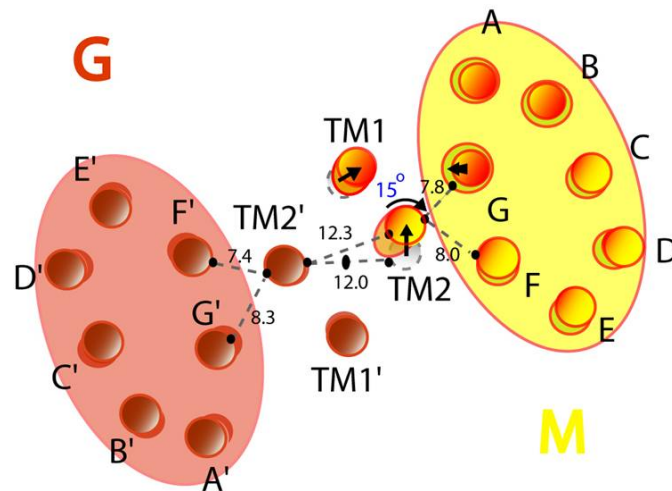


Abb.1.6: Schematische Darstellung von Helixinteraktionen zwischen Transducer und Rezeptor im Grundzustand (rot) und M-Zustand (gelb). Die Abstände beziehen sich auf $C\alpha$ -Atomen F (Leu170) zu TM2 (Leu 77), G (V203) zu TM2 (Leu 77) und TM2 (Val 78). Nach Lichtaktivierung von SRII erfolgt eine 0,5 Å-Verschiebung der Helix G, welche eine Rotation der TM2 von 15° und einer Verschiebung um 0,9 Å hervorruft (Moukhametzianov et al., 2006).

Dieser von Moukhametzianov beschriebene Mechanismus widerspricht den mittels ESR ermittelten Daten bezüglich der Aktivierung der TM2. Wegener (Wegener et al., 2001) schlägt einen Mechanismus vor, bei dem eine durch die Ausklappbewegung der Helix F induzierte Rotationsbewegung der TM2 um 15° stattfindet (Abb. 1.7).

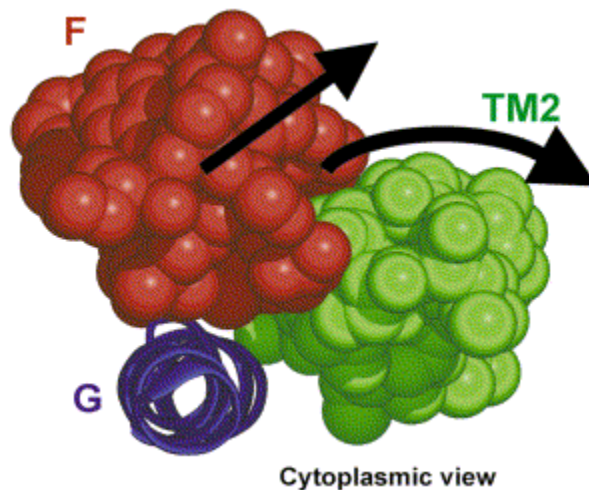


Abb. 1.7: Modell für die Signalübertragung durch lichtinduzierten Auswärtsbewegung der Helix F und Rotationsbewegung der TM2 basierend auf ESR-Daten (Klare et al., 2004).

Das mittels ESR-Daten erstellte Modell beschreibt die beiden Bewegungen, die Auswärtsbewegung der Helix F und die Rotationsbewegung der TM2 als simultan. Bei den Relaxationen in den Grundzustand erfolgt eine Entkopplungsreaktion

zwischen dem Rezeptor und TM2. Die Rückrotation der TM2-Helix erfolgt etwa 200 ms später, als die des Rezeptors (Klare *et al.*, 2004).

Wie schon bereits beschrieben stellt der M1-M2-Übergang, welcher nach der Protonierung der Asparaginsäure 75 (D75) durchlaufen wird, den signalgebenden Zustand des Rezeptors dar. Wenn die D75-Aminosäure durch eine neutrale Aminosäure Asparagin (N) ersetzt wird, ist die Protonierung des Gegenions nicht mehr möglich und das M-Intermediat kann nicht gebildet werden. Die FTIR-Untersuchungen (Hein *et al.*, 2004) haben gezeigt, dass der Photozyklus der SRIID75N-Mutante etwa 100 μ s schneller verläuft und sich trotz des fehlenden M-Intermediates die Konformation des Rezeptors ändert. Die FTIR-Messungen konnten neben dem K-Intermediat drei weitere Intermediate (X_{540} , Y_{540} , Z_{540}) detektieren (Abb. 1.8).

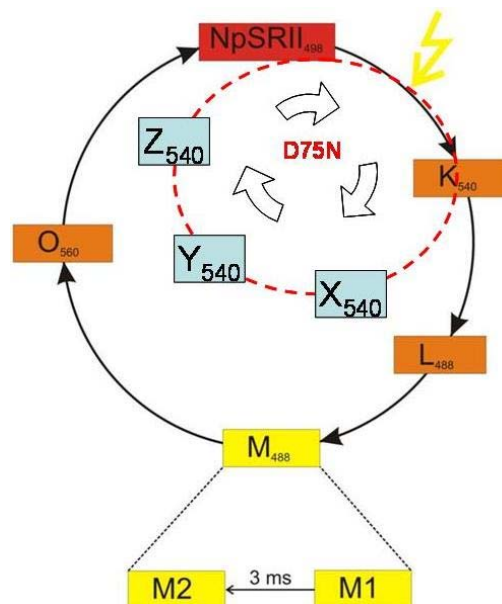


Abb. 1.8: Schematische Darstellung des NpSRII-Photozyklus (außen) im Vergleich zur NpSRIID75N-Mutante (innen). Die Intermediate X, Y und Z sind mittels FTIR (Hein *et al.*, 2004) detektiert worden.

Die Abwesenheit des M-Intermediates und die kurze Dauer des Photozyklus bei SRIID75N wurden ebenso mittels Blitzlichtphotolyse (Schmies *et al.*, 2000) bestätigt. Die Abbildung 1.9 zeigt die Absorptionmessungen von NpSRII und der NpSRIID75N-Mutante bei den für die einzelne Intermediate typischen Wellenlängen.

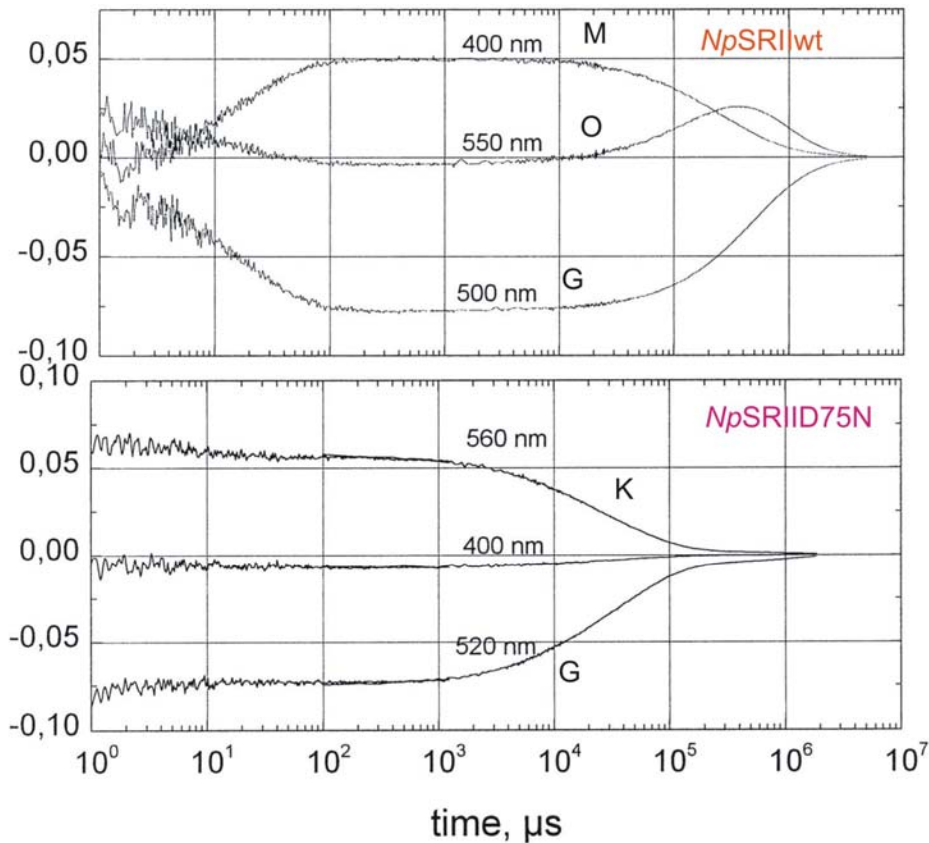


Abb. 1.9: Blitzlichtphotolyse von *NpSRII* wt (oben) und der *D75N*-Mutante (unten). Das Absorptionsmaximum des Grundzustands (G) bei der *D75N*-Mutante ist um 20 nm verschoben und es kann kein M-Intermediat detektiert werden. Das Protein relaxiert in seinen Grundzustand etwa 100 μ s schneller als der Wildtyp (Schmies et al., 2000).

Photozyklusmessungen von *NpSRII* wt zeigen Absorptionsspektren bei 400, 500 und 550 nm, welche charakteristisch für die Formation von M-Intermediat, Grundzustand und O-Intermediat sind. Das vergleichende Absorptionsspektrum der *D75N*-Mutante (Abb. 1.9, unten) zeigt keine Absorptionsänderungen bei 400 nm, welche der Bildung des M-Intermediates entspricht. Das Absorptionsmaximum von *D75N* ist im Grundzustand gegenüber dem Wildtyp um 20 nm verschoben und relaxiert etwa 100 μ s schneller in seinen Grundzustand.

Die Lichtinduzierte Signalübertragung vom Rezeptor zum Transducer ist der initierende Schritt der Signaltransduktionskaskade. Um diese vollständig aufzuklären fehlt bislang das detaillierte Verständnis über den Aktivierungsmechanismus des Rezeptors und den, damit einhergehenden, Konformationsänderungen. Für die lichtinduzierte Helix F-Bewegung spricht der Aktivierungsmechanismus der strukturverwandten Protonenpumpe Bakteriorhodopsin BR. Für dieses Pigment wurde bereits eine lichtinduzierte Auswärtsbewegung der Helix F beobachtet (Luecke et al., 1999; Subramaniam & Henderson, 2000). Der Rezeptor *NpSRII* kann bei

Abwesenheit von Transducer ebenfalls die Rolle der Protonenpumpe, analog zu Bakteriorhodopsin, übernehmen (Sasaki & Spudich, 1999; Sudo *et al.*, 2001). Die FTIR-Untersuchungen an *NpSRII* (Kamada *et al.*, 2006) lassen eine lichtinduzierte Spaltöffnung in der Nähe der Helix F nur bei Abwesenheit von Transducer vermuten. Dieser Spalt stellt den Kanal für den Protonentransport dar, welcher allerdings durch den Transducer blockiert wird. Die Studien an der *NpSRIID75N*-Mutante würden möglicherweise die bestehenden Diskrepanzen bezüglich der konformationellen Änderungen des Rezeptors lösen. Wie vorher beschrieben unterdrückt diese Mutante die Bildung des M-Intermediats, weist jedoch die selben konformationellen Änderungen, wie der Wildtyprezeptor (Hein *et al.*, 2003), auf. Somit können mit dieser Mutante die Rezeptor-Transducer-Wechselwirkungen studiert werden ohne jedoch das signalgebende M-Intermediat zu bilden.

Der bislang ungeklärte Aktivierungsmechanismus des Rezeptors stellt jedoch nur einen Teil der Signaltransduktion dar. Der zweite Schritt der Signaltransduktionskaskade ist die Signalweiterleitung ins Zellinnere über den Transducer. Der Transducer weist eine große Homologie zu den Chemorezeptoren auf, welche Hinweise zur möglichen Struktur des Transducers liefern. Die Abbildung 1.10 zeigt ein Modell der Struktur des Rezeptor-Transducer-Komplexes der sensorischen Rhodopsine im Vergleich zum analogen Aufbau des Chemorezeptors (Oprian, 2003).

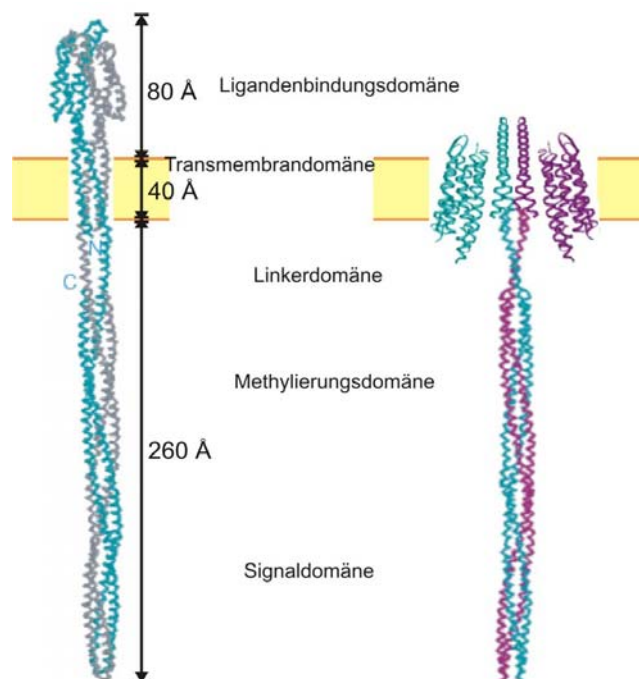


Abb. 1.10: Modell des eubakteriellen Chemorezeptors (links) und eines SRII/HtrII Komplexes aus *N. pharaonis* (rechts) mit Zuordnung einzelner Domänen (Oprian, 2003).

Aus dem Sequenzvergleich der Transducer-Proteine mit den Chemorezeptoren können viele Übereinstimmungen festgestellt werden. Aufgrund dieser Analogien sind einige Voraussagen bezüglich der Sekundärstruktur des *NpHtrII*-Transducers getroffen worden. Die Gemeinsamkeiten in der Sequenz zwischen Chemorezeptoren und sensorischen Rhodopsinen lassen zudem einen ähnlichen Mechanismus der Signaltransduktion vermuten. Die Sequenzen der Transducer-Proteine verfügen jedoch über einen, für archaebakterielle Phototransducer eigenständigen, Bereich in der Linkerdomäne (LeMoual & Koshland, 1996). In Anbetracht der Unterschiede zwischen archaebakteriellen Phototransducern und Chemorezeptoren stellt sich die Frage, ob die Informationsweiterleitung zur Signaldomäne, trotz abweichender Struktur, durch gleichwertige Konformationsänderungen zur Regulierung der Aktivität des gebundenen CheA erfolgt.

Die Linkerdomäne beinhaltet die sog. HAMP-Domäne (**h**istidine kinase, **a**denylyl cyclase, **m**ethyl accepting chemotaxis protein und **p**hosphatase), welche aus zwei helikalen amphiphatischen Sequenzen AS1 und AS2 verbunden durch eine *Connector*-Sequenz unbekannter Struktur besteht. Beide Bereiche AS1 und AS2 spielen eine kritische Rolle bei der Signaltransduktion und haben einen dramatischen Einfluss auf die Funktionalität der Linkerdomäne bei einer Modifikation bzw. eine Deletion einer von beiden Sequenzen (Appleman & Stewart, 2003). Der Sequenzvergleich mit homologen Chemorezeptoren hat gezeigt, dass nicht die Sequenz sondern die Sekundärstruktur der HAMP-Domäne für seine Funktionalität verantwortlich ist (Appleman *et al.*, 2003). Die NMR-Strukturuntersuchungen der Linkerdomäne (Hulco *et al.*, 2006) zeigen eine stark symmetrische Struktur. Sie beschreiben ein Modell, in dem die Dimere eine Vier-Helix-*coiled-coil*-Struktur ausbilden. Zwei Helices, von jedem Monomer (AS1 & AS2) sind dabei gleichlang. Die *Connector*-Domäne, die sich über einem Bereich von 26 Å erstreckt, ist dicht gepackt und befindet sich zwischen zwei Helices. Am C-terminalen Ende bildet der *Connector* einen Ring aus und wechselwirkt dabei mit der AS2. Dieser ist der meistkonservierte Sequenzbereich bei allen HAMP-Domänen. Weiterhin bildet der *Connector* viele Salzbrücken zu den Aminosäuren, die keine konservierte Sequenz haben, aus. Der *Connector* ist der flexibelste Part in allen HAMP-Domänen. Hulco *et al.* beschreiben diese Formation als „*knobs-into-holes*“ Struktur.

Die EPR-Strukturuntersuchungen können keine durchgehende *coiled-coil*-Struktur und Periodizität, wie von Hulco *et al.* beschrieben, detektieren. Der AS1-Bereich wird

als inhomogen in seiner Dynamik und Tertiärstruktur charakterisiert (Bordignon *et al.*, 2005). Für den AS2-Bereich wird eine *coiled-coil*-Struktur am Anfang der Sequenz vorgeschlagen, welche jedoch aufgrund der sehr hohen Flexibilität der Seitenketten sich nicht zum Ende der Sequenz erstreckt.

Die Aufklärung der Struktur der HAMP-Domäne ist zum Verständnis der Signaltransduktionskaskade unentbehrlich. Der *Connector*-Bereich ist für die Blockierung des Protonenpumpens bei SRII verantwortlich (Bordignon *et al.*, 2005). Die Bindungsstudien (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003) haben gezeigt, dass bereits die Bindung des verkürzten Form des Transducers *NpHtrII*₁₁₄ ausreicht, um die Funktion der Protonenpumpe zu unterdrücken. Die Struktur der HAMP-Domäne hängt jedoch stark von seiner Umgebung ab. Es wird postuliert, dass unter Niedrigsalzbedingungen die sog. *molten-globule*-Struktur vorliegt, während diese sich in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen α -helikal formt (Bordignon *et al.*, 2005). Für die Studien der HAMP-Domäne eröffnet die Semisynthese des verkürzten Transducers, unter Anwendung der *Expressed-Protein-Ligation* (EPL) (David *et al.*, 2004), neue Möglichkeiten. Diese Methode erlaubt es zwei getrennt voneinander hergestellten Peptide bzw. Proteinsegmente über eine native Peptidbindung miteinander zu verknüpfen. Diese Fragmente können vor der Verknüpfung nach belieben modifiziert werden, wodurch neue biophysikalische Studien ermöglicht werden. Mit den semisynthetisch hergestellten Proteinen ist es z.B. möglich die Proteine segmentell oder seitenspezifisch zu markieren (mit Fluoreszenzlabel oder Isotopenlabel). Weiterhin besteht die Möglichkeit der Einführung unnatürlicher Aminosäuren oder einer posttranslationalen Modifikation. Mit der Aufklärung der Struktur der HAMP-Domäne kann ein weiterer Baustein zum Verständnis der bakteriellen Signaltransduktionskaskade beigesteuert werden. Die Informationen können möglicherweise auf weitere bislang unaufgeklärte HAMP-Domänen bei Photorezeptoren angewendet werden.

Wie bereits erwähnt gehören zu der Klasse der 7-Helix-Rezeptoren die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs engl.: „*G-protein coupled receptor*“). Der Name G-Protein basiert auf der Eigenschaft der Rezeptoren GDP (Guanosindiphosphat) in der Zelle zu binden und einen GDP/GTP (Guanosintriphosphat) Austausch zu katalysieren. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können in pathologische Prozesse involviert sein, welche viele Krankheiten, wie Herz- und Gefäßerkrankungen, Geisteskrankheiten, Degenerierung des Retinals im Auge, Krebs oder AIDS

hervorrufen können (Hamm, 2001). Die Kristallstruktur von bovinen Rhodopsin (Palczewski *et al.*, 2000) hat viel zum Verständnis der Funktion dieser Proteine beigetragen. Es ist der meist untersuchte Photorezeptor und gilt als Model für weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bei dem Rhodopsin handelt es sich um einen Photorezeptor, welches in die visuelle Signaltransduktionskaskade über die Bindung an einen G-Protein Transducin initiiert (Janz & Farrens, 2004).

Transducin besteht aus drei Untereinheiten (sog. α -, β -, und γ -Untereinheiten). Die α -Untereinheit bindet im inaktiven Zustand GDP. Das aktivierte Rhodopsin initiiert den Austausch von GDP zu GTP, wobei das Transducin in die aktive α -Untereinheit, welches GTP gebunden hat und die β - γ -Untereinheiten zerfällt. Rhodopsin wird an dieser Stelle wieder deaktiviert. Die GTP gebundene α -Untereinheit von Transducin aktiviert die Phosphodiesterase (PDE), welche wiederum das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) hydrolysiert. Nach Dephosphorylierung des PDE* α Gt*GTP-Komplexes zerfällt dieser in seine inaktive Form von PDE. Das α Gt schließt den Zyklus, indem er wieder an die β - γ -Untereinheiten bindet und in seine Ursprungs-konformation zurückkehrt (Bruckert *et al.*, 1992).

Nach der Lichtaktivierung ändert das Rhodopsin seine Konformation, indem es eine Auswärtsbewegung der Helix 6 ausführt und seinen aktiven Zustand Meta II bildet (Dunham & Farrens, 1999). Es wird vermutet, dass diese Auswärtsbewegung einen hydrophoben Bereich am Rhodopsin freilegt und so die Bindung der α -Untereinheit des Transducins möglich macht (Janz *et al.*, 2004).

Mit der Auflösung der Kristallstruktur des Rhodopsins (Palczewski *et al.*, 2000) sind offene Fragen über die Bindung des Retinals und die Stabilisierung des Rhodopsins im Grundzustand weitestgehend aufgeklärt (Hamm, 2001). Der Aktivierungsmechanismus des Rezeptors sowie die Wechselwirkung mit dem Transducin sind bislang nicht vollständig erschlossen. Die NMR Untersuchungen (Kisselev *et al.*, 1998; Koenig *et al.*, 2002; Kisselev & Downs Maureen A., 2003) haben gezeigt, dass die Aminosäuren 340-350 der α -Untereinheit des Transducins (Gt α 340-350) für die Bindung an Rhodopsin verantwortlich sind. Diese Beobachtung basiert auf Bindungsstudien mit synthetischen Peptid-Analoga. Während die Kristallstrukturuntersuchungen (Lambright *et al.*, 1996) die Gt α 340-350-Bindungsstelle als eine ungeordnete und verknäulte Struktur beschreiben, zeigen die NMR-Untersuchungen (Kisselev *et al.*, 1998; Koenig *et al.*, 2002; Kisselev *et al.*, 2003) eine Veränderung der Struktur nach der Bindung an das Rhodopsin. Aufgrund der hydrophoben

Wechselwirkungen des Rhodopsins und Transducins formt sich das zunächst ungeordnete Transducin α -helikal (Kisselev *et al.*, 1998).

Mit der Aufklärung des Aktivierungsmechanismus von Rhodopsin können diese Informationen, aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten, auf die gesamte Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren übertragen werden. Es bestehen noch offene Fragen, welche zum Verständnis zur Entstehung vieler Krankheiten, die durch defekte G-Proteine verursacht werden, geklärt werden müssen. Es fehlen noch detaillierte Informationen über die Wechselwirkungen der Rezeptoren mit den Agonisten oder über die Steuerung der Faltung und der Konformationsänderungen der Rezeptoren.

Ziel der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin, den Mechanismus der bakteriellen Signaltransduktionskaskade zu studieren. Insbesondere sollen Wechselwirkungen des Rezeptor-Transducer-Komplexes bei der Signalübertragung sowie die Struktur der HAMP-Domäne untersucht werden. Die Signalübertragung vom Rezeptor zum Transducer erfolgt mechanisch über konformationelle Änderungen beider Proteine. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die konformationellen Änderungen des Rezeptors unter Anwendung der ESR-Spektroskopie analysiert werden. Dazu werden ausgewählte Positionen an dem Rezeptor zum Cystein modifiziert und mit einem MTS-Spinlabel markiert werden. Mittels ESR-Spektroskopie werden Informationen über die Spinlabel-Umgebung, -Mobilität und -Abstände gewonnen. Die einzuführenden Mutationen sind in Abbildung 1.11 dargestellt. Es sollen Einzel- und Doppelmutanten hergestellt werden. Der mögliche Einfluss der Mutationen sowie der des Spinlabels auf das Protein soll mittels Photozyklusmessungen untersucht werden.

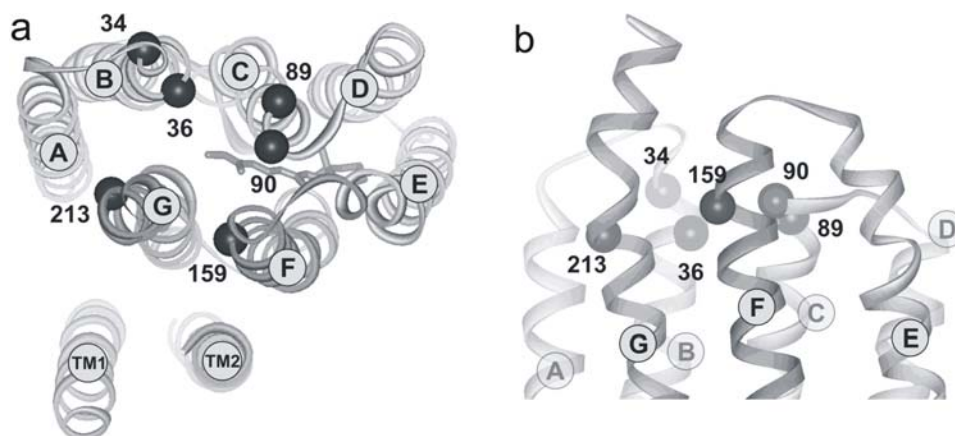


Abb. 1.11: Kristallstruktur des NpSRII/NpHtrII₁₁₄ Komplexes [1H2S] in Ribbondarstellung. a) aus Sicht von der cytoplasmatischen Seite. b) Seitenansicht des Rezeptors. Die gekennzeichneten Aminosäuren sollen durch Cysteine ersetzt und mit MTS-Spinlabel markiert (Bordignon et al., 2007) werden.

Zur Aufklärung der Struktur der HAMP-Domäne sollen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls Cysteinmutationen an ausgewählten Positionen eingeführt und mittels ESR-Spektroskopie untersucht werden. Die ESR-spektroskopischen Daten sollen zusammen mit früheren ESR-Untersuchungen kombiniert und analysiert werden. Ein besonderes Augenmerk soll dabei auf der Salzabhängigkeit des Transducers liegen.

Zur Erweiterung der Möglichkeit biophysikalischer Studien am Transducer sollen im Rahmen dieser Arbeit zwei Transducerkonstrukte *NpHtrII*₁₁₄ und *NpHtrII*₁₅₇ mit der Verknüpfungsstelle an Position 95 semisynthetisch hergestellt werden. Dazu wird die Methode der *Expressed-Protein-Ligation* angewendet. Die Konstrukte sollen anschließend auf ihre Funktionalität hin untersucht werden. Unter Anwendung der CD-Spektroskopie soll die Faltung der Transducerkonstrukte in Abhängigkeit von der Salzkonzentration analysiert werden. Die Bindungsstudien der Konstrukte mit dem Rezeptor *NpSRII* mittels ITC sollen die Funktionalität der semisynthetisch hergestellten Proteine bestätigen.

Unter Anwendung der FTIR-Spektroskopie sollen weiterhin die Bindungsstudien von Rhodopsin und Transducin durchgeführt werden. Zu diesem Zwecke soll ein Peptidanalogue der α -Untereinheit des Transducins ($G\alpha$) sog. *peptide 18* (Abb. 1.12) hergestellt werden.

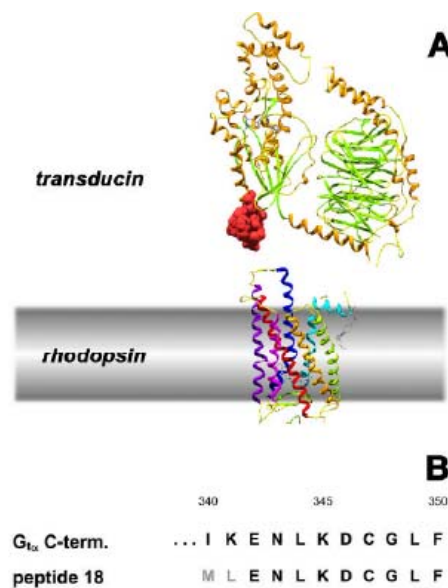


Abb. 1.12: Schematische Darstellung von Rhodopsin und Transducin. (A) Die Strukturdarstellung basiert auf Kristallstrukturdaten (1GZM) (Li Jade et al., 2004) und (1GOT) (Lambright et al., 1996). Das C-terminale rezeptorbindende Peptid-Analogon ist in rot als Kalottenmodell dargestellt und basiert auf NMR Daten (1AQG) (Kisselev et al., 1998). (B) Primärstruktur von $G\alpha$ 340-350 und peptide 18 (Vogel et al., 2007).

Insbesondere sollen im Rahmen dieser Studien die Konformationsänderungen des Peptids bei der Bindung an Rhodopsin untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind von p.A.-Qualität und sind soweit nicht anders angegeben, von den handelsüblichen Anbietern erworben.

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA sowie die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt über die jeweiligen Kits der Firma Qiagen (Hilden) bzw. Metabion (Martinsried).

Die Polymerase-Kettenreaktionen werden mit dem Pfu PCR-System von Promega (Mannheim) durchgeführt. Zur Ligation von DNA-Fragmenten wird T4-DNA-Ligase von Gibco BRL (Neu Isenburg) eingesetzt.

Restriktionsenzyme *AatII*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *NcoI*, *NdeI*, *PstI*, *SapI*, *TspRI* werden von New England Biolabs (Schwalbach) bezogen, RNase A von Boehringer (Mannheim).

Die für die Zellanzucht verwendeten Nährmedien Trypton und Hefeextrakt stammen von der Firma Gibco BRL (Neu Isenburg), die eingesetzten Antibiotika Kanamycin, Ampicillin und Chloramphenicol sowie *all-trans*-Retinal von der Firma Sigma (Steinheim).

Zur Isolierung der His-Tag-Proteine wird Ni-NTA-Superflow der Firma Qiagen verwendet.

Proteine mit GST-Affinitätstag werden über GSH-Sepharose der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) aufgereinigt.

Der Protein-Molekulargewichtsmarker wurde von der Firma Pharmacia (Freiburg) bezogen und setzt sich aus Phosphorylase b (97 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa) zusammen.

Der verwendete Spinlabel (1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methan-thiosulfonat (MTSSL) stammt von der Firma Toronto Research Chemicals (TRC, Toronto).

Die eingesetzten Isotope ^{13}C -Glucose, ^{15}N -Ammoniumchlorid und ^{15}N -Lysin werden von der Firma Eurisotop (Saint-Aubin Cedex, Frankreich) bezogen.

2.2 Instrumentation

Die Zellanzucht der *E. coli* Zellen unter aeroben Bedingungen erfolgt in den Schüttlern der Firma New Brunswick (Nürtingen). Die 30 L und 15 L Fermenter stammen von der Firma Biotech International (Melsungen).

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

Für die Sedimentationen werden die Zentrifugen RC28S und RC5B der Firma Sorvall (Bad Homburg) mit den Rotoren SS-34, F-28/36 und GS3, ebenso die Zentrifuge L8-70 der Firma Beckmann mit den Rotoren Ti-70 und Ti-45 verwendet.

Die Zellaufschlüsse erfolgen in einem Mikrofluidizer M-110S der Firma Microfluidics Corp. (Newton).

Die Polymerase-Kettenreaktionen werden in den Thermocyclern PX2 Thermal Cycler Thermo Electron Corporation bzw. am PCR Sprint Thermo der Firma Hybaid (Heidelberg) durchgeführt.

Die DNA-Sequenzierungen erfolgen in dem Sequenzierungsgerät 373 von Applied Biosystems.

UV/Vis-Spektren werden mit dem Spektrometer DU-650 der Firma Beckmann gemessen.

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen erfolgen mit dem Mini-PROTEANII-System der Firma BioRad.

Zur Ankonzentrierung der Proteinlösungen werden Centricons YM-30, YM-10 und YM-5 von Amicon (Bedford) verwendet und in der Zentrifuge J2-HC mit dem Rotor JS-4.3 der Firma Beckmann zentrifugiert.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie HPLC wird mit der Anlage der Firma Beckman durchgeführt. Dabei verwendete Säule stammt von Du Pont (Wilmington).

Die CD-Spektren werden am J-815 CD Spectrometer Jasco (Groß-Umstadt) aufgenommen.

Die Massenspektrometrie wird am ESI-MS LCQ Advantage MAX (Finnigan) durchgeführt.

Die Isotherme-Kalorimetrie wird am Microcalorimeter VP-ITC (Microcal) vorgenommen.

2.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.3.1 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*

E. coli BL21(DE3) *B, F, dcm, ompT, hsdSB* (*rB*⁻*mB*⁻), *gal, lon* (DE3)

E. coli BL21 *B, F, dcm, ompT, hsdSB* (*rB*⁻*mB*⁻), *gal, lon*.

2.3.2 Plasmide

pET27bmod	(Klostermeier <i>et al.</i> , 1998)
pET27bmod- <i>npsopII</i> -His	(Wegener, A., 2000)
pET27bmod- <i>npsopII-L159C</i> -His	(Wegener, A., 2000)
pET27bmod- <i>nphtrII</i> ₁₁₄ -His	(Wegener, A., 2000)
pET27bmod- <i>nphtrII</i> ₁₅₇ -His	(Wegener, A., 2000)
pGEX2T	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Matthias Geyer
pTXB1	Zur Verfügung gestellt von Dr. Ralf P. Seidel
pRPS1	Zur Verfügung gestellt von Dr. Ralf P. Seidel

2.3.3 Oligonukleotide

Die im Folgenden aufgeführten Oligonukleotide werden von der Firma MWG (Göttingen) bezogen.

T7prom long Primer 5'-TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG GAA

T7term long Primer 5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG C

Für die Einführung von Mutationen in *NpSRII*-His werden im Folgenden aufgelistete Primer verwendet. Das Codon der neu eingeführten Aminosäure ist jeweils durch Grauunterlegung hervorgehoben:

<u>Mutation</u>	<u>Oligo</u>	<u>Sequenz : 5'-3'</u>
Y36C	hin	AGCGACGCTGCTACGTGACG
	rev	CGTCACGATGCACCGTCGCT
L90C	hin	CTCGGGCTGTGTGCGGGGCTT
	rev	AAGCCCCGCACACAGCCCGAG
G136C	hin	TCGCATTCCTCTGTCTGGTCTAC
	rev	GTAGACCAGACAGAGGAATGCGA
V17C	hin	GGCATGCTCTGCGGCACGCTC
	rev	GAGCGTGCCGCAGAGCATGCC
L16C	hin	ATCGGCATGTGCGTCGGCACG
	rev	CGTGCCGACGCACATGCCGAT
L89C	hin	CCTCGGGTGTCTTGCGGGGCTT
	rev	AAGCCCCGCAAGACACCCGAGG
G18C	hin	ATGCTCGTCTGCACGCTCGCG
	rev	CGCGAGCGTGACAGACGAGCAT
L20C	hin	GTCGGCACGTGCGCGTTCG
	rev	CGAACGCGCACGTGCCGAC
A21C	hin	GGCACGCTCTGTTTCGCGTGGG
	rev	CCCACGCGAAACAGAGCGTGCC
W24C	hin	GCGTTCGCGTGTGCCGGC
	rev	GCCGGCACACGCGAACGC
L213C	hin	CTTCATCGCATGCGATGCTGCG
	rev	CGCAGCATCGCATGCGATGAAG

Die Cystein-Mutationen in *NpHtrII*₁₅₇-His wurden durch folgende Primer eingeführt:

<u>Mutation</u>	<u>Oligo</u>	<u>Sequenz : 5'-3'</u>
A122C	hin	CGACCTCTATTGTGCCTTCGACG
	rev	CGTCGAAGGCACAATAGAGGTCG
A148C	hin	CGCAGAGCAGTGTCAAAGCGGG

	rev	CCCGCTTTTGACACTGCTCTGCG
L75C	hin	GGGATCAACTGCGGACTCGTTG
	rev	CAACGAGTCCGCAGTTGATCCC
G118C	hin	GACGAAATCTGCGACCTCTATG
	rev	CATAGAGGTGCGAGATTTGTC
M100C	hin	CCTCGCGGTGTGGCGACGCGA
	rev	TCGCGTCGCCACACCGCGAGG
L93C	hin	GCTTTCAACGTGTGCCGCGAAGC
	rev	GCTTCGCGGCACACGTTGAAAGC

Weitere verwendete Primer:

HtrII_Nde_for:	5'-CAATAACACCATATGTCGCTGAAC
Tev_C_K96_for:	5'-GATCCGAAAACCTTTATTTTCAGTGTA
Tev_C_S89_for:	5'-GATCCGAAAACCTTTATTTTCAGTGT
Tev_rev:	5'-AATAAAGGTTTTCG
TspRI_S89_for:	5'-TATTTTCAGTGTTGCTTTCAACGCTGGCCGCGAAG
TspRI_K96_for:	5'-TATTTTCAGTGTAAGGCCTCGCGGATGGGCGACGGC
Tev_Htr157_rev:	5'-TCGAATTCTCATCACGTGTTGATCCCTCTGC
pTXB1_His_Stop_for:	5'-CACCACCACCACTGATGACTGAACTCA
pTXB1_His_Stop_rev:	5'-TGAGTTCAGTCATCAGTGGTGGTGGTG
pTXB1_AatII_for:	5'-TTGTGTTTGGTCGACGTCG
pTXB1_PstI_rev:	5'-GTTATGCTAGTTATTGCTCAG
Htr94_sapI_rev:	5'-GCCGATCCGCGCTCTTCCGCAGGCCAGCGTTG AAAGCGA
Htr87_sapI_rev:	5'-GGCCAGCGTAGCTCTTTTCGCAGGCGGTGTCACCGCC
MBP18_1for:	5'-GATCCGAAAACCTGTATTTTCAGATGCTGG-PO ₄
MBP18_1rev:	5'-PO ₄ -GCATCTGAAAATACAGGTTTTTCG
MBP18_1for:	5'-AAAACCTGAAAGATTGTGGTCTGRRRRRGATGAG
MBP18_1rev:	5'-AATTCTCATCAAACAGACCACAATCTTTCAGGTTT TCCA
Htr114_sapI_rev:	5'-GAGGTCGCCGGCTCTTCAGCAGCGACGG
Htr157_sapI_rev:	5'-GGCTTCGGCGGCTCTTCAGCAGTTGATCTC
PGEX_Anneal_for:	5'-GATCCGAAAACCTTTATTTTCAGTGTA

PGEX_Anneal_rev: 5'-CTAGGCTTTTGGAAATAAAAGTCACAC
TspR1-E114C-for: 5'-TTGAGGACTATTTTCAGTGTGACGAAATCGG
TspR1-T157C-for: 5'-CGGGCAGAGTATTTTCAGTGTGAACTACAG
TEV-htrII220-EcoR1_rev:5'- GGCGAATTCTCATCAGGAGACCGCGTCGGC

2.4 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden werden, soweit nicht anders erwähnt, nach (Sambrook *et al.*, 1989) und (Ausubel *et al.*, 1987) angewendet.

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt nach alkalischer Lyse der *E. coli* Zellen nach (Bimboim & Doly, 1979). Dabei wird die ringförmige genomische DNA durch die Zelllyse aufgebrochen und linearisiert. Bei der Denaturierung wird die lineare DNA in Einzelstränge aufgetrennt und durch Zentrifugation von den Plasmiden abgetrennt. Die Plasmide bleiben in Lösung und werden zunächst mit zwei Volumenäquivalenten Phenol/Chloroform (1:1 v/v) und anschließend mit einem Volumenäquivalent Chloroform gewaschen. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgt durch Zugabe von 2,5 Volumenäquivalenten Ethanol. Dabei wird 10 min bei 0°C inkubiert und anschließend 10 min bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 30 µl Wasser mit Zusatz von 1 µl RNase A (1µg/µl) aufgenommen.

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt unter Verwendung von Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen (Qia-Tip-20 und Qia-Tip-100). Abweichend vom Protokoll des Herstellers wird vor dem Auftrag des Lysates auf die Säulen ein RNaseA-Verdau (10 µg/ml, 2 h bei 37°C) mit anschließender Zentrifugation (10 min, 5000 rpm) durchgeführt.

2.4.2 Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten

Die Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgt über die horizontale Agarose-Gelelektrophorese. Die DNA-Gelelektrophorese dient der Auftrennung der DNA-Moleküle entsprechend ihrem Molekulargewicht. Das Prinzip der Methode beruht auf der unterschiedlichen Trennungsgeschwindigkeit in einem Agarosegel unter Einfluss eines elektrischen Feldes. Dazu werden die entsprechenden Proben in Probenpuffer (TBE-Puffer, 10 % Ficoll, 0,025 % Bromphenolblau und 0,025 % Xylencyanol) aufgenommen und auf 0,7 – 1 %ige Agarosegele in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,9 mM EDTA, pH 8,9) aufgetragen. Als Elektrophorese-Puffer dient ebenfalls TBE. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wird parallel ein entsprechender Standard aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgt in einem elektrischen Feld mit einer Spannung zwischen 70 und 120 Volt (4 V/cm). Die DNA wird im Agarosegel durch Ethidiumbromid 0,6 mg/l angefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgt unter Verwendung eines Gel-Extraktions-Kits der Firma Qiagen (Hilden). Dazu werden die entsprechenden Banden unter UV-Licht (360 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA nach dem Protokoll des Herstellers aus dem Agarosegel extrahiert.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR beruht auf der exponentiellen Vermehrung eines Nukleinsäurebereiches unter der Verwendung von DNA-Polymerasen, die einen DNA-Einzelstrang zu einem Doppelstrang synthetisieren können, wenn ihnen ein kurzer einzelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht.

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgt in 50 µl-Ansätzen mit folgender Zusammensetzung:

- 20-200 ng Templat
- 25 pmol der entsprechenden Primer
- je 10 nmol der vier dNTP's
- 5 µl 10 x Polymerase-Puffer

Nach einem fünfminütigen Denaturierungsschritt mit anschließender Eiskühlung wird zu den Ansätzen 1 U Pfu-Polymerase zugegeben. Danach beginnt der eigentliche Zyklus der PCR. Jeder Reaktionszyklus besteht aus drei Teilschritten, der thermischen Denaturierung der Matrizen-DNA, der Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer (annealing) an die einzelsträngige Matrizen-DNA, und der DNA-Synthese (elongation) ausgehend von den Primern durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Die zeitliche Abfolge setzt sich wie folgt zusammen:

Denaturierung:	15 s bei 96°C
Hybridisierung:	30 s bei $T_{mRed} - 5^\circ\text{C}$ (Gl. 1)
Elongation:	75 s bei 72°C

Die Schmelztemperatur T_m von Oligonukleotiden ist so definiert, dass 50 % des DNA-Doppelstrangs denaturiert wird. Die Schmelztemperatur hängt von der Zusammensetzung der Oligonukleotiden, von der Länge sowie der Salzkonzentration ab. Für kurze Oligonukleotide (bis zu 20 Basenpaaren) lässt sich die Schmelztemperatur nach sog. Wallace-Regel (Gl.1) bestimmen:

$$T_m = 4^\circ\text{C} \cdot \sum (n_G + n_C) + 2^\circ\text{C} \cdot \sum (n_A + n_T) \quad (1)$$

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

- mit T_m = Schmelztemperatur
 n_G = Anzahl der Guanosine
 n_C = Anzahl der Cytidine
 n_A = Anzahl der Adenosine
 n_T = Anzahl der Thymidine
 T_{mRed} = reduzierte Schmelztemperatur
 $n_{\text{Fehlpaarungen}}$ = Anzahl der Fehlpaarungen
 n_{Gesamt} = Gesamtanzahl der Basenpaare

Aus der Schmelztemperatur T_m , welche sich nur auf die Zusammensetzung der Oligonukleotide bezieht, lässt sich die reduzierte Schmelztemperatur T_{mRed}

berechnen. Diese berücksichtigt unter anderem die Anzahl der Fehlpaarungen, die durch die Mutation hervorgeht.

Es werden 20-25 dieser Zyklen durchlaufen. Abschließend erfolgt ein weiterer Schritt von 4 min bei 72°C, um die Elongation aller amplifizierten DNA-Fragmente sicherzustellen. Die Aufreinigung der PCR-Amplifikate erfolgt durch gelelektrophoretische Auftrennung (s.o.).

Ortsspezifische Mutationen werden mittels der *Overlap Extension*-Methode (Ho *et al.*, 1989) eingeführt. Die *Overlap Extension*-Methode ist ein Verfahren, mit dem zielgerichtet Punktmutationen in der DNA erzeugt werden können (Abb. 2.1). Die Punktmutationen in der DNA führen später bei der Translation zum Einbau anderer Aminosäuren als beim Wildtyp. Mit Hilfe der *Overlap Extension*-Methode lassen sich ebenfalls unterschiedliche DNA-Sequenzen miteinander verknüpfen.

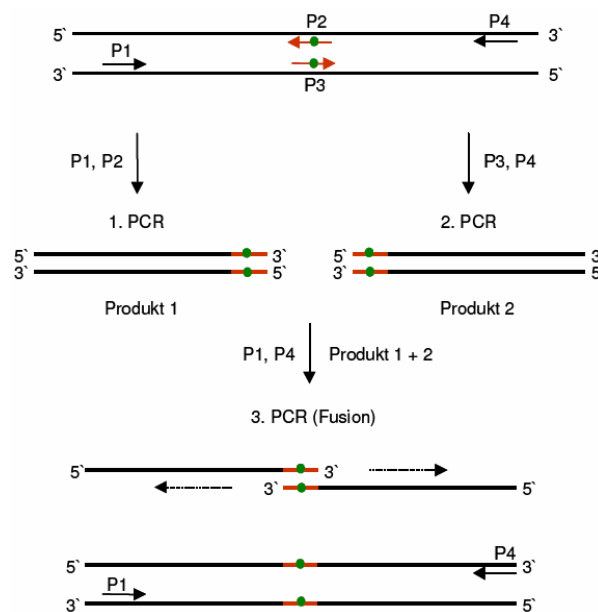


Abb. 2.1: Schema der *Overlap Extension*-Methode zur Einführung ortsspezifischer Mutationen (Ho *et al.*, 1989). Die in rot dargestellten Bereiche stellen die Position der eingeführten Mutation dar. Die, zur Einführung der Mutation, erforderlichen Primer werden mit P1-P4 bezeichnet.

Mit den zueinander komplementären Primern P2 und P3 wird die Punktmutation eingeführt. In der ersten Reaktion erhält man ein Produkt, flankiert von den Primern P1 und P2, das an seinem Ende die Mutation trägt. Mit den Primern P3 und P4 wird ausgehend von der Matrizen-DNA das zweite Produkt amplifiziert. Es enthält ebenfalls die Punktmutation. In der folgenden Fusions-PCR werden beide vorherige Produkte eingesetzt. Sie können an ihren komplementären Enden hybridisieren, und

werden am 3'-Ende von der Pfu-DNA-Polymerase verlängert. Durch Zugabe der Primer P1 und P4 kann die mutierte DNA amplifiziert werden.

2.4.4 Restriktion von DNA

Bei der Restriktion wird die DNA durch Restriktionsenzyme spezifisch innerhalb der Erkennungssequenz geschnitten. Die Restriktion der DNA erfolgt durch Inkubation für 1-3 h bei der, durch den Hersteller angegebenen, für die Restriktionsenzyme optimalen Temperatur. Die Wahl des Puffers und die Mengen des eingesetzten Enzyms richten sich nach der Angabe des Herstellers.

2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für alle Ligrationsreaktionen wird die bacteriophage T4-DNA-Ligase in der Konzentration 1U/ μ l verwendet. Die Ligation erfolgt nach Anleitung des Herstellers. Dabei werden pro Ligrationsansatz 100 ng Vektor-DNA verwendet. Die Insert-DNA-Mengen werden in molaren Verhältnissen 3:1 von Insert zu Vektor eingesetzt. Mit dem Ligase-Puffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5 % (w/v) PEG 8000, pH 7,6) werden 20 μ l Ansätze 4-7 h bei RT inkubiert. Anschließend wird die Salzkonzentration durch Zugabe von 20 μ l Wasser herabgesetzt und bis zur Transformation bei -20°C gelagert.

2.4.6 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen erfolgt mittels Elektroporation mit Plasmid-DNA nach der Methode von Dower (Dower *et al.*, 1988). Dazu werden 10 ng Plasmid-DNA beziehungsweise 20 μ l des verdünnten Ligrationsansatzes mit 70 μ l einer 10 % igen Glycerinsuspension kompetenter Zellen ($OD_{578} \approx 100$) vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die Transformation erfolgt mittels eines GenePulsers (BioRad, München) durch einen Puls von 1,5 kV, 800 Ω , 25 μ F und einer Zeitkonstanten von 10 ± 2 s. Die transformierten Zellen werden in 1 ml LB-Medium aufgenommen, 1 h bei 37°C und

200 Upm geschüttelt und anschließend auf antibiotikumhaltigen LB-Agar-Platten ausplattiert.

2.4.7 DNA-Sequenzierung

Durch die DNA-Sequenzierung wird die Nukleotid-Sequenz einer DNA bestimmt. Dies geschieht nach der sog. Zyklus-Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Dabei werden in 20 µl Reaktionsansätzen 250 ng Plasmid-DNA, 4 µl Big-Dye-Terminator-Mix (Applied Biosystems, ABI), 3,2 pmol Primer-Oligonukleotid und 2 µl Sequenzierungs-Puffer gemischt. Die gesamte Reaktion basiert auf drei Teilschritten, die bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen ablaufen und deren Zyklus 25-mal wiederholt wird:

10 s bei 96°C
5 s bei 55°C
4 min bei 60°C

Anschließend werden zu dem Reaktionsprodukt 1 µl 125 mM EDTA, 2 µl 3 M Na-Acetat und 50 µl Ethanol zugegeben und 15 min auf Eis gefällt. Nach der Zentrifugation (10 min, 10000 rpm, 4°C) wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die elektrophoretische Analyse erfolgt an einem DNA-Sequencer Model 373 (ABI) oder wird von den Firmen SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

2.4.8 Zellanzucht

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt in LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl auf 1000 ml, pH 7,2). Dazu werden je nach Bedarf sterile Reaktionsgefäße von 5 ml Reagenzgläsern bis 5000 ml Erlenmeyer-Kolben mit Schikane verwendet. Das Volumenverhältnis der Reaktionsgefäße zur Kultur sollte, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, nicht größer als 4:1 sein. Die Kultur wird bei 37°C und 200 Upm, bis die gewünschte Zelldichte erreicht ist, inkubiert. Zur Selektion wird das entsprechende Antibiotikum (Kanamycin 50 mg/L, Ampicillin 100

mg/L, Chloramphenicol 30 mg/L) verwendet. Die Zellvermehrung wird durch Dichtemessung bei 578 nm ($1 \text{ OD}_{578} \approx 2 \times 10^8$ Zellen/ml) verfolgt. Die Anzucht größerer Mengen *E. coli* Zellen erfolgt in den Fermentern Biostat B (15 Liter) bzw. Biostat C (30 Liter) der Firma Braun Biotech GmbH (Melsungen).

Für die isotope markierte Expression wird ein Minimalmedium verwendet. Dieses setzt sich wie folgt zusammen: 7,5 g Na_2HPO_4 (wasserfrei), 3 g KH_2PO_4 , 0,5 g NaCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,014 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,1, die Mengen sind auf 1L bezogen. Unmittelbar vor dem Animpfen werden zu dem Medium 1 ml der Spurenelementelösung (SL6) aus der steril filtrierten Stammlösung (1L SL6 300 mg H_3BO_3 , 200 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 mg MnCl_2 , 30 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 mg EDTA, 2 mg Fe(II)-SO_4) und entsprechendes Antibiotikum zugegeben. Je nach Isotopenmarkierung werden dem Medium 2 g ^{13}C -Glucose bzw. 5 ml 40 % (v/v) Glucose, 1 g ^{15}N -Ammoniumchlorid bzw. 1 g Ammoniumchlorid hinzugefügt.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Proteinexpression in *E. coli*

Zur Expression von *NpSRII*, *NpHtrII₁₅₇* und *GST-TEV_peptide18* in *E. coli* werden Transformanten des Stammes BL21(DE3) bzw. BL21 eingesetzt. Die Hauptkultur wird in LB-Medium oder in Minimalmedium mit entsprechendem Antibiotikum mittels einer gesättigten Vorkultur auf eine optische Dichte $\text{OD}_{578\text{nm}}$ von 0,06-0,1 angeimpft. Nach der Vermehrung der Zellen auf einen $\text{OD}_{578\text{nm}}$ -Wert von 0,8-1,5 erfolgt die Induktion mit IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) auf eine Endkonzentration von 0,5 mM. Bei der Expression von *NpSRII* werden zeitgleich 10 μM *all-trans*-Retinal aus einer ethanolischen Stammlösung (5 M) zugegeben. Die Zellernte erfolgt 2,5-5,0 h nach der Induktion durch Zentrifugation bei 5000 x g und 4 °C 15 Minuten. Das Zellpellet wird mit Zellwaschpuffer (ZWP) (s.u.) gewaschen und kann anschließend bei -80°C gelagert werden oder nach Resuspension im ZWP weiterverarbeitet werden.

2.5.2 Zellaufschluss und Aufreinigung der Proteine

Für die Aufreinigung der membranständigen Proteine mit His-Affinitätstag werden folgende Puffer verwendet:

ZWP:	150 mM NaCl; 25 mM Natriumphosphat pH = 8; 2mM EDTA
A:	300 mM NaCl; 50 mM Natriumphosphat pH = 8; 2% DDM
B:	wie A, aber 0,05% DDM
C:	wie B + 30 mM Imidazol
D:	wie B + 200 mM Imidazol
G:	500 mM NaCl; 10 mM Tris pH = 8

Die in ZWP resuspendierten Zellen werden unter Zugabe einer Spatelspitze DNase A mit einem Microfluidizer mechanisch bei 1000 bar aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (90 min, $100.000 \times g$, 4°C) werden die Zellmembranen sedimentiert. Anschließend werden diese in 3-4 ml Puffer A pro Gramm Zellpellet homogenisiert und zur Solubilisierung über Nacht bei 4°C unter Lichtausschluss (bei *NpSR11*) gerührt.

Nach erneuter Zentrifugation (90 min, $100.000 \times g$, 4°C) werden die solubilisierten Proteine über eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt. Dazu wird das Solubilisat auf eine mit etwa 3 Säulenvolumen Puffer B äquilibrierte Nickel-NTA- Säule (Die Säule wird manuell, je nach Proteinmengen, mit Ni beladenen Resin der Firma Qiagen befüllt) aufgetragen. Im Anschluss daran werden unspezifisch an die Nickel-Matrix gebundene Proteine durch Waschen mit 10 Säulenvolumina Puffer C abgetrennt. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt mittels Puffer D.

Um das Imidazol abzutrennen, erfolgt anschließend eine Dialyse (6-8_{cut-off}) gegen Puffer G (Protein-Pufferverhältnis beträgt dabei mindestens 1:100). Zuvor wird das Nickелеluat auf mindestens der Hälfte des Volumens ankonzentriert um die kritische Mizellenkonzentration zu erreichen. Dadurch wird gewährleistet, dass in der Proteinlösung vorhandenes Detergenz (DDM) Mizellen ausbildet (Mizellengröße 50 kDa), welche die Membran nicht passieren können.

Die verwendeten löslichen Proteine (GST-TEV-HtrIIA95C-114, GST-TEV-HtrIIA95C-157 und GST-TEV-*peptide18*) haben einen GST-Affinitätstag und sind als GST-TEV-

Fusionsproteine kloniert. Dabei steht „TEV“ für die TEV-Protease-Erkennungssequenz (Tabacco Etch Virus) E N L Y F Q (Kapust *et al.*, 2002).

Das Zellpellet wird in ZWP resuspendiert und wie oben beschrieben aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (60 min, $100.000 \times g$, 4°C) wird der Überstand über die GSH-Sepharose aufgereinigt. Die GSH-Beads werden mit PBS-Puffer (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2PO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,3) equilibriert und mit Proteinlösung beladen. Die Säule wird mit 10 Säulenvolumina PBS-Puffer gewaschen und mit PBS-Puffer + 10 mM Glutathion eluiert. Anschließend erfolgt die Messung der Proteinkonzentration. Die Proteinlösung wird ankonzentriert und mit TEV-Protease versetzt (Verhältnis Protein zu TEV-Protease 50:1). Der TEV-Verdau wird über Nacht unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur ausgeführt. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung der verdauten Peptide bzw. Proteinsegmente über eine *reversed-phase*-HPLC-Chromatographie (*high performance liquid chromatography*). Dazu wird eine C4-Chromatographiesäule mit zwei Laufmittel eingesetzt. Das erste Laufmittel A besteht aus Wasser mit 0,1 % TFA und das zweite B aus Acetonitril mit 0,08 % TFA. Die Probe wird bei 5 % B aufgetragen und je nach Polarität bei 20-50 % B fraktioniert eluiert. Anschließend werden Fraktionen mittels ESI-MS untersucht. Die produktenthaltene Fraktionen werden vereint und gefriergetrocknet. Bis zu Anwendung werden die Peptide bei -20°C gelagert.

2.5.3 Spinmarkierung

Um die Cysteinmutanten mit Spinlabel zu markieren, erfolgt nach der Ni-NTA-Aufreinigung ein Reduktionsschritt. Das Eluat wird zur Reduktion der Cysteinseitenketten mit 10 mM DTT (Dithiothreitol) versetzt und mindestens 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wird sowohl das Imidazol, als auch das DTT über Dialyse bzw. mehrmaliges Ankonzentrieren und Verdünnen entfernt und die Proteinlösung mit 10 mM des Spinlabels MTS versetzt. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei 4°C und im Falle von *NpSR*II-Mutanten unter Lichtausschluß leicht geschwenkt. Das überschüssige Spinlabel wird durch eine erneute Dialyse gegen Puffer G entfernt.

2.5.4 Rekonstitution der Membranproteine in PM-Lipide

Für die Rekonstitution werden die Proteine mit den polaren Lipiden in einem Verhältnis von 1:1 (w/w) gemischt. Dabei sollte der DDM-Gehalt etwa 0,05%-0,1% betragen und der pH-Wert zwischen 7 und 8 liegen. Zu der Lösung wird eine Spatelspitze NaCl zugegeben und 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend werden Detergenz-absorber-Beads zugegeben und ü.N. bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Die *Biobeads* werden mittels Pasteurpipette und Glaswolle abgetrennt und mit Puffer M (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8) nachgespült. Die Lösung wird 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird viermal mit Puffer M gewaschen und anschließend in 50-100 µl Puffer M aufgenommen.

Zur Rekonstitution des Rezeptor-Transducer-Komplexes (*NpHtrII₁₅₇-NpSRII*) wird zunächst ein Komplex im molaren Verhältnis von 1:1 zwischen dem Rezeptor und dem Transducer gebildet und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden dazu polare Lipide in einem Massenverhältnis von 1:1 zu dem gebildeten Komplex zugegeben und ebenfalls 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend verfährt man analog zu oben beschriebener Vorgehensweise.

2.5.5 Präparation von Liposomen

Die Vorschrift zur Herstellung von Liposomen wurde von Dr. Tudor Savopol entwickelt. Dazu wird synthetisches Phospholipid-Derivat DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-phosphocholine der Firma Sigma eingesetzt. Zunächst werden einige Milligramm von DOPC in einem 50 ml Spitzkolben eingewogen und in ca. 2 ml Chloroform gelöst. Die Lösung wird mit Argon geflutet und das Lösungsmittel langsam (70-80 rpm) bei 40°C am Rotationsverdampfer entfernt. Das verbleibende Lösungsmittel wird durch Gefriertrocknung für ca. 2 h entfernt. Zur Herstellung von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUVs: *small unilamellar vesicles*) ist es notwendig die genaue Einwage von DOPC zu kennen und diese nach dem Lyophilisieren in einer bestimmten Puffervolumen zu lösen. Hierzu existieren Berechnungstabellen, die von Dr. Tudor Savopol erstellt wurden. Der Feststoff wird im Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8) gelöst. Die Lösung wird eine Minute lang gevortext und 4-5 Minuten stehen gelassen. Diese Prozedur wird eine Stunde lang wiederholt.

Anschließend wird die Suspension in einen Erlenmeyerkolben überführt, mit Argon geflutet und mit Parafilm abgedichtet. Dieser wird dann für ca. eine halbe Stunde ins Ultraschallbad gestellt. Anschließend wird 30 Minuten zentrifugiert (43000 rpm, Ti45, 4°C). Der Überstand wird verworfen und die Trockenmasse gewogen. Die Liposomen werden je nach Gewicht in einem bestimmten Volumen an Protein (hierzu wird ebenfalls von Dr. Tudor Savopol erstellte Tabelle verwendet) aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Liposomen zweimal mit Puffer gewaschen und in einem Volumen gewünschter Konzentration aufgenommen.

2.5.6 Expressed Protein Ligation

Für die Ligation wird das inteinfusionierte HtrII(1-94)-MXE-His-Konstrukt und die HtrII-Peptide A95C-114 bzw. A95C-157 mit N-terminalen Cysteinen eingesetzt. Die Thioestergenerierung, die Rekonstitution sowie die Ligation erfolgen *in situ*. Dazu werden beide zu ligierende Proteinsegmente in einem Verhältnis 1:2 (Thioester:Peptid), PM-Lipide 1:1 (w/w) sowie 750 mM Mesna (2-Mercaptoethansulfonat-Natrium) zusammen gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Ligationsansatz mit Ligationspuffer (500 mM NaCl, 10 mM Tris, 200 mM Mesna, pH 8) soweit verdünnt, dass die Konzentration von Detergenz unter der kritischen Mizellenkonzentration (CMC) liegt. In dem Fall muss die Detergenkonzentration unter 0,05 % herabgesetzt werden. Anschließend wird der Ligationsansatz in einem 1_{cut-off}-Dialyseschlauch gegen den Ligationspuffer über Nacht bei RT dialysiert. Zu dem Dialyse-Puffer werden zusätzlich Detergenzabsorber *Biobeads* zugegeben. Anschließend wird der Dialyse-Puffer gegen den Puffer G (500 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8) ausgetauscht, um das überschüssige Mesna abzutrennen und die Rekonstitution zu vervollständigen. Die Rekonstitution wird anhand der Trübung des Ligationsansatzes sowie vollständiger Entfernung des Detergenzes beobachtet.

Anschließend wird der Ligationansatz zentrifugiert (15', 5000 rpm, 4 °C), wobei sich das Ligationprodukt sowie das MXE-Intein in der festen Lipidphase befinden. Diese werden in dem Solubilisierungspuffer (300 mM NaCl, 10 mM Tris, 2% DDM, pH 8) resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgt eine erneute

Zentrifugation (15', 5000 rpm, 4°C), wobei das Ligationsprodukt in die Detergenzhaltige Lösung übergeht und das Intein in den Lipiden verbleibt.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch Inkubation der Proteine mit SDS werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine. Die SDS-Moleküle umhüllen die denaturierten Proteine und bilden dabei gestreckte Mizellen (Winter & Noll, 1998). Dadurch wird die Eigenladung der Proteine überdeckt. Es bildet sich ein SDS-Protein-Komplex, dessen stark negative Ladung der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Nach der Anwendung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese entstehen nach der Größe aufgetrennten Proteinbanden, die sich mit unterschiedlichen Methoden (Coomassie-Färbung, Silberfärbung, Westernblott) sichtbar machen lassen. Für die Bestimmung der relativen Proteinmasse wird zusammen mit eigentlichen Proben ein Proteinmarker eingesetzt, welcher aus Proteinmischung definierter Größe zusammengesetzt ist. Mit dieser Methode erhält man Informationen über das Molekulargewicht von Proteinmonomeren und kann gleichzeitig die Effizienz der einzelnen Reinigungsschritte überprüfen.

Die SDS-Gelchromatographie für kleine Proteine (< 30 kDa) erfolgt nach der sog. Schagger-Jagow-Methode (Schagger & Jagow, 1987). Es wird in der Regel ein 12% Trenngel und 4% Sammelgel (Zusammensetzung: 12 % bzw. 4 % Acrylamid, 0,8% (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid), 1,5 M Tris/HCl, 0,8% SDS, pH 8,8, 10 µl TEMED, 10 % (w/v) APS) verwendet. Die Proteinprobe wird in 2xSDS-Probenpuffer (120 mM Tris, 6 % (w/v) SDS, 35 % (w/v) Glycerin, 3,55 % (v/v) Monothioglycerol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8) aufgenommen. Die angelegte Spannung liegt zwischen 80-120 V (Anodenpuffer: 200 mM Tris/HCl, pH 8,9, Kathodenpuffer: 100 mM Tris/HCl, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,25). Danach werden die Proteinbanden

zunächst 10 min. mit Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Ethanol) gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Ethanol) entfärbt.

Für die großen Proteine (> 30 kDa) wird das SDS-PAGE-System nach Laemmli angewendet (Lämml, 1970). Im Gegensatz zum Schägger-Jagow-System wird im Lämml-Gelverfahren anstatt des Tris-Tricins das Tris-Glycin als Elektrolyt eingesetzt. Tricin (pKs 8,2) und Glycin (pKs 9,6) unterscheiden sich unter anderem in ihrer Acidität. Das Tricin eignet sich besonders gut für die Auftrennung kleiner Proteine (< 30 kDa). Für die Auftrennung großer Proteine ist die Anwendung des Tris-Glycin-Gelverfahrens geeigneter (Schägger, 2006). Dabei werden 15 %ige und 18 %ige Gele hergestellt. Das Trenngel besteht aus 15 % bzw. 18 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid, 1,88 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,5 % (w/v) SDS, TEMED katalytisch, 10 % (w/v) APS. Das Sammelgel setzt sich wie folgt zusammen: 4 % (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid, 0,625 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,5 % (w/v) SDS, TEMED katalytisch, 10 % (w/v) APS. Der Laufpuffer besteht aus 2 mM Tris, pH 8,3, 0,2 M Glycin, 1 % (w/v) SDS. Die angelegte Stromstärke liegt bei 30 mA.

2.6.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentration für den Rezeptor und seiner Mutanten erfolgt über die Absorptionsmessung anhand der Absorption des Retinal-Chromophors bei 498 nm mit einem Extinktions-Koeffizienten von $\varepsilon = 40000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Proteinkonzentration wird dabei mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes bestimmt:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (2)$$

mit

- E = gemessene Absorption
- ε = molarer Extinktionskoeffizient
- c = Proteinkonzentration
- d = Schichtdicke der Küvette

Die Reinheit des Proteins wird über einen Vergleich der Chromophor-Absorption mit der Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm überprüft. Dabei entspricht der empirische Wert von $A_{280}/A_{498} = 1,3$ einer Reinheit > 95 %.

Im Falle des *NpHtrII*₁₅₇ und seiner Mutanten erfolgt die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Ehresmann-Methode (Ehresmann *et al.*, 1973) über die Absorption bei 228,5 nm und 234,5 nm nach folgender Formel:

$$c_{NpHtrII} (mg/ml) = \frac{A_{228,5} - A_{234,5}}{3,15} \quad (3)$$

Die Konzentration der Proteine, die aromatische Aminosäuren in der Sequenz enthalten, wird über die Absorption A_{280} gemessen. Zuvor wird die theoretische Absorption für eine Konzentration von 1 mg/ml mit einem Programm ProtParam kalkuliert und mit dem erhaltenen Wert gegen gerechnet. Das Programm berechnet die physikalischen und chemischen Eigenschaften, wie z.B. Molekulargewicht, theoretischen PI-Wert oder Extinktionskoeffizient eines Proteins basierend auf der Proteinsequenz.

2.6.3 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen erfolgen mittels ESI-MS. Der Begriff *Elektrospray-Ionisation* (ESI) geht auf Arbeiten von Dole zurück (Dole *et al.*, 1968) und wurde später durch den Nobelpreisträger Fenn etabliert (Fenn, 2002). In der Abbildung 2.2 ist das Prinzip der ESI-MS-Spektrometrie schematisch dargestellt. Zunächst wird eine Analytlösung durch eine Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine elektrische Spannung angelegt ist. Durch die Spannung kommt es zur Bildung des elektrischen Feldes zwischen der Kapillare und Gegenelektrode, welche die Analytlösung durchdringt. Die Ionen bewegen sich auf die Gegenelektrode zu, wobei sich ein Überschuss gleichgeladener Ionen auf der Kapillarenspitze bildet. Diese stoßen sich gegenseitig ab und treten aus der Kapillarenspitze unter Bildung sog. Taylor-Kegels als feines Aerosol (Tröpfchengröße ~ 10 µm) aus. Das Lösungsmittel verdampft wobei die Dichte der elektrischen Ladung auf der Tropfenoberfläche zunimmt. Wenn der Radius der Tropfen kleiner als das so genannte Rayleigh-Limit wird, zerfallen die Tropfen wegen der Abstoßung gleicher Ladung (Coulomb-

Explosion) in kleinere Tropfen. Die erzeugten Ionen werden letztlich zum Detektor geführt.

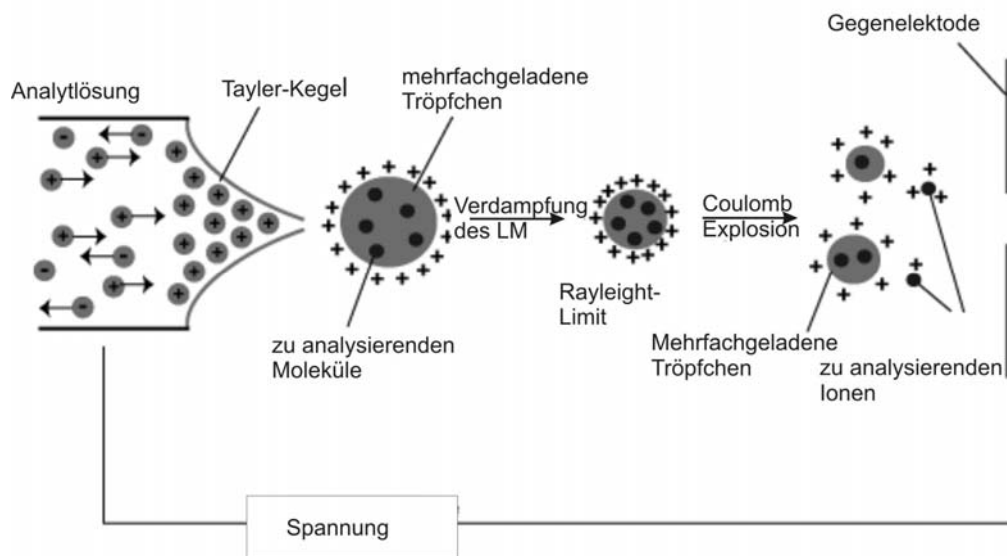


Abb. 2. 2: Schematischer Aufbau zum Ionisationsmechanismus in ESI.

Die Art der angelegten Spannung entscheidet, mit welcher Ladung die Ionen erzeugt werden (positiv oder negativ). Das resultierende ESI-Spektrum liefert Signale, die der Masse pro Ladung (m/z) entsprechen.

2.7 Biophysikalische Methoden

2.7.1 Photozyklusmessungen durch Blitzlichtphotolyse

Zur Messung der Photozyklen der Mutanten werden die Proben auf 150 mM Salzkonzentration, 10 mM Tris (pH 8) und 0,1% DDM umgepuffert bzw. in polare Lipide rekonstituiert. Das Endvolumen der Probe wird auf 1 ml mit einem Absorptionsmaximum $A_{500\text{nm}} = 1$ eingestellt.

Die Anregung der Probe, welche sich in einer Quarzküvette (4 mm) befindet, erfolgt mit einem Laserblitz (Nd-YAG-Laser, ILT-405E, USSR, 532 nm, 10 ns, 2 mJ/cm²). Senkrecht zu dem Strahlengang des Anregungslichtes liegt der Strahlengang einer ungefilterten Halogenlampe (Osram-XBO-100 W, 12 V), beide Strahlengänge kreuzen sich am Probenort. Der Messstrahl passiert einen Monochromator (MDR4-LOMO, UDSSR) und wird von einem Photomultiplier (FEU-100, UDSSR) detektiert.

Die ankommenden Signale werden durch zwei Oszilloskope (Le Croy 9361 und 9400A) in zwei lineare überlappende Zeitfenster gespeichert. Ein angeschlossener Computer berechnet aus den gemessenen Spannungssignalen die Absorptionsänderung. Es werden für Photozyklus-Messungen pro Wellenlänge 25 Messwerte gemittelt. Die Zeitauflösung der Messapparatur beträgt etwa 100 ns. Die Messungen erfolgen bei 20 °C im spektralen Wellenlängenbereich von 360-660 nm wie beschrieben in (Chizhov *et al.*, 1996; Schmies *et al.*, 2000). Die Datenanalyse erfolgt nach Chizhov *et al.* entwickelten Methode (Chizhov *et al.*, 1996).

2.7.2 ESR-Spektroskopie

Die Methode der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) basiert auf der Absorption von Mikrowellenstrahlung durch ungepaarte Elektronen, welche sich in einem Magnetfeld befinden. Bringt man ein ungepaartes Elektron in ein zeitlich konstantes, homogenes Magnetfeld so kommt es zu einer Wechselwirkung mit dem magnetischen Moment des Elektrons und zur Aufspaltung entarteter Energiezustände (Zeeman-Aufspaltung). Es erfolgt die Absorption elektromagnetischer Strahlung. Nach der Absorption wird die ursprüngliche Besetzungsverteilung der Energieniveaus durch Relaxation wiederhergestellt. Des Weiteren erfährt die Wechselwirkung des ungepaarten Elektronenspins mit dem magnetischen Moment der Atomkerne seiner Umgebung eine Hyperfeinwechselwirkung, was eine Aufspaltung der Resonanzlinie zur Folge hat.

Als Spinsonden werden im Rahmen dieser Arbeit sog. MTS-Spin-Label ((1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl) methan-thiosulfonat) verwendet, welche kovalent an das Protein gebunden werden. Die Kopplung des Spinlabels erfolgt über eine Disulfidbrückenbindung an ein Cystein, welches zuvor über die ortsspezifische Mutagenese in das Protein eingeführt wurde. Die Abbildung 2.3 zeigt schematisch die Kopplungsreaktion dieses Verfahrens, welches als „*site directed spin labelling*“ (SDSL) bezeichnet wird (Hubbell & Altenbach, 1994).

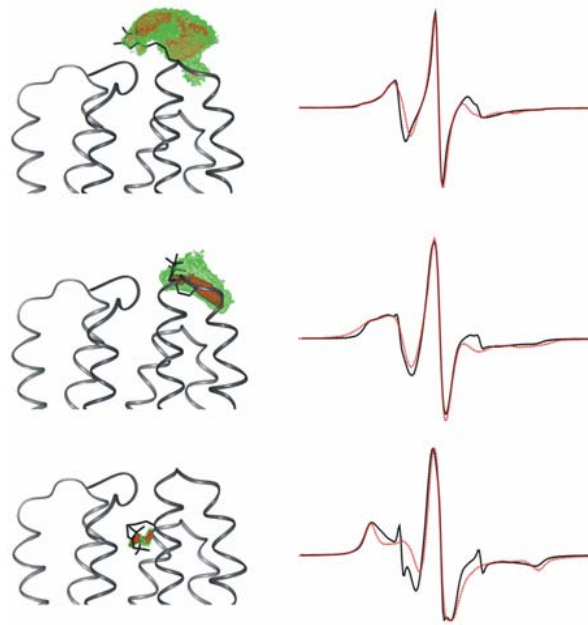


Abb. 2.4: Ausgewählte Beispiele der ESR-Spektren für unterschiedliche Position der Spinmarkierung. Die rotmarkierten Linien stellen simulierte und die schwarzen die gemessenen Spektren dar. Die rotgrün markierten Bereiche im Protein geben den wahrscheinlichen Aufenthaltsort des Spinlabels wieder. Das Bild stammt von C. Beier, Universität Osnabrück.

Die ESR-Messungen werden an selbstgebauten (Prof. Dr. H.-J. Steinhoff, Universität Osnabrück) X-Band-Spektrometern in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-J. Steinhoff durchgeführt. Die Messungen erfolgen analog zu bereits publizierten Quellen (Bordignon *et al.*, 2005; Bordignon *et al.*, 2007).

2.7.3 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Mit der Methode der isothermalen Titrationskalorimetrie werden die Bindungsstudien zwischen dem Rezeptor (*NpSRII-His*) und den Ligationsprodukten *NpHtrII₁₁₄* und *NpHtrII₁₅₇* durchgeführt. Hierzu werden die aufgereinigten Proteine über die Dialyse gegen den ITC-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05 % DDM, pH 8) auf gleiche Messbedingungen gebracht. Die jeweiligen Ligationsprodukte werden vorgelegt und der Rezeptor in einem 10 fachen molaren Überschuss hinzu titriert. Die ITC-Messungen erfolgen bei 45 °C analog zu von Hippler-Mreyen publizierten ITC-Messungen von Rezeptor/Transducer-Wechselwirkungen von nativen Proteinen (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003), um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Mit der Methode der isothermen Titrationskalorimetrie (engl. *isothermal titration calorimetry*) lassen sich Wechselwirkungen von Biomolekülen studieren. Bei einer Komplexbildung bzw. Interaktion zwischen zwei Biomolekülen geben die thermodynamischen Daten wie Assoziationskonstante (K_a), freie Energie (ΔG), Enthalpie (ΔH), Entropie (ΔS) und Wärmekapazität (ΔC_p) Informationen über die Stabilität und Stöchiometrie des Komplexes. Die Isothermalkalorimetrie wird am Microcalorimeter VP-ITC (Microcal) vorgenommen.

Die ITC-Apparatur besteht aus zwei identischen Messzellen, einer Referenz- und einer Probenzelle. Die Referenzzelle ist verschlossen und hat während der Messung eine konstante Temperatur. Dieses wird gewährleistet, indem der Referenzzelle ein konstanter Heizstrom (< 1 mW) hinzugefügt wird. In der Messzelle befindet sich die Probe zu der unter konstantem Rühren die zweite Komponente titriert wird. Die Temperatur in der Messzelle bei einer Reaktion wird gemessen und der der Referenz angeglichen. Die dabei entstehende bzw. verbrauchte Wärmeenergie Q wird gemessen. Die molare Reaktionsenthalpie ΔH^0 kann aus der Fläche der Titrationskurve und der Basislinie bestimmt werden:

$$\Delta H^0 = \int_{T_1}^{T_2} Q dT \quad (4)$$

mit ΔH^0 = molare Enthalpie
 Q = Wärmeenergie
 dT = Temperaturdifferenz

Aus der gewonnen molaren Enthalpie lässt sich die Standard Gibbs-Energie ΔG^0 berechnen. Diese thermodynamische Größe beschreibt ob eine Reaktion freiwillig abläuft (negatives Vorzeichen) oder Energie hinzugeführt werden muss (positives Vorzeichen) und hat folgenden Zusammenhang:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln K \quad (5)$$

mit ΔG^0 = Gibbs-Energie
 ΔH^0 = molare Enthalpie
 T = Temperatur

ΔS^0 = molare Entropie

R = universelle Gaskonstante 8,314472 J/mol*K

K = Gleichgewichtskonstante

Wie Anhand der Gleichung 5 zu sehen ist, ist die Gibbs-Energie mit der Gleichgewichtskonstanten K verknüpft. Diese thermodynamische Größe hängt von den Stoffmengen der eingesetzten Edukten sowie gebildeten Produkten zusammen und liefert eine Aussage über die Richtung einer Gleichgewichtsreaktion:

$$K = \frac{[P]}{[E]} \quad (6)$$

mit [P] = beschreibt die Konzentration der Produkte

[E] = beschreibt die Konzentration der Edukte

Bezogen auf die Wechselwirkung des Rezeptors mit Transducer können anhand der Werte der Gleichgewichtskonstanten Aussagen bezüglich der Stärke des gebildeten Komplexes getroffen werden.

2.7.4 Zirkulardichroismus (CD)

Mit Zirkulardichroismus-Spektroskopie werden Sekundärstrukturuntersuchungen an den Ligationsprodukten *NpHtrII*₁₁₄, *NpHtrII*₁₅₇ sowie dem Peptid *NpHtrII*_{A95C-114} in Abhängigkeit der Salzkonzentration durchgeführt. Dazu werden die Proteine gegen die entsprechenden Puffer dialysiert. Vor jeder Messung wird eine Basislinie aufgenommen. Die Messungen werden in einer UV/Vis-Küvette (1-2 mm) an einem CD-Spektrometer der Firma Jasco (Groß-Ulmstadt) durchgeführt. Die CD-Spektren werden bei 20 °C in einem Spektralbereich von 190-260 nm aufgenommen. Es werden pro Messung 10-20 Akkumulationen vorgenommen.

Die Methode des Zirkulardichroismus basiert auf den Absorptionsmessungen von Proteinen im links und rechts zirkular polarisiertem Licht. Dadurch lassen sich Informationen über die Sekundärstruktur der Proteine gewinnen. Die Methode basiert auf den Absorptionsmessungen in dem Fern-UV-Bereich 190-260 nm wobei der Faltungszustand der Proteine detektiert wird. Die Sekundärstruktur der Proteine lässt

sich direkt aus dem resultierenden Spektrum ablesen. Bei einer 100 % α -helikalen Sekundärstruktur werden bei dem CD-Spektrum zwei Minima bei 222 nm und 208 nm sowie ein Absorptionsmaximum bei 190 nm beobachtet. Im Falle einer β -Faltblattstruktur ist ein Absorptionsspektrum mit einem lokalen Minimum bei 218 nm und ein lokales Maximum bei 196 nm zu erwarten. Bei einer verknäulten Struktur (*random coil*) können ein Maximum bei 212 nm und ein Minimum bei 195 nm beobachtet werden (Greenfield N. & Fasman G.D., 1969). CD-Spektroskopie eignet sich besonders dafür äußere Einflüsse, wie Salzkonzentration, Temperatur, pH-Wert oder Lösungsmittelleffekte auf die Proteinstruktur zu studieren.

2.7.5 FTIR-Spektroskopie

Die Bindungsstudien von Rhodopsin und *peptide 18* werden mittels FTIR durchgeführt. Das *peptide 18* wird nach der Expression und Aufreinigung gefriergetrocknet und für die Messung in entsprechenden Puffer gelöst. Das Rhodopsin wird von Reiner Vogel aus bovinen Retinae isoliert und wie von Vogel et al. (2007) beschrieben präpariert.

Mit der Fourier-Transformation Infrarot Spektroskopie (FTIR) können Schwingungs- und Rotations-Energieniveaus an Biomolekülen studiert werden, welche durch eine elektromagnetische Strahlung (2,5-250 μm) angeregt werden. Bei den Schwingungsformen unterscheidet man zwischen Streckschwingung (Valenzschwingung) und Biegeschwingung (Deformationsschwingung), wobei sich entweder die Bindungslänge oder der Bindungswinkel der Schwingung ändert (Hesse M. et al., 1995). Dadurch lassen sich sowohl die Sekundärstrukturanteile als auch die Funktion der Proteine studieren. Dieses beruht auf den unterschiedlichen Absorptionsmaxima der Peptidbindung den sog. Amid I- und Amid II-Absorptionen, welche aus CO- und CN-Valenzschwingung resultieren.

Zur Unterscheidung einzelner Atomgruppen oder funktionellen Gruppen wird die Methode der Differenzspektroskopie von zwei unterschiedlichen Zuständen bzw. Reaktion angewandt. Dabei werden zwei oder mehrere Infrarotspektren vor und nach Auslösen der interessierenden Reaktion aufgenommen und zu einem Differenzspektrum verrechnet.

Die Methode der FTIR-Spektroskopie an Proteinen insbesondere an Membranproteinen wurde von Friedrich Siebert und seinen Mitarbeitern zum Teil entwickelt und optimiert. Die Messungen erfolgen an einem IFS28 FTIR-Spektrometer der Firma Bruker und werden von Reiner Vogel wie beschrieben durchgeführt (Vogel *et al.*, 2007).

3. Ergebnisse

3.1 ESR-Untersuchungen zur Signaltransduktion des Rezeptor-Transducer-Komplexes *NpSRII/NpHtrII₁₅₇*

Zur Untersuchung der Signaltransduktion zwischen dem Rezeptor *NpSRII* und dem Transducer *NpHtrII* wird die Methode der ESR-Spektroskopie angewendet. Insbesondere sind die Konformationsänderungen des Rezeptors während der Signalübertragung von großem Interesse. Basierend auf vorangegangenen Untersuchungen (Wegener *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2004) wird im Rahmen dieser Arbeit mit dem verkürzten Transducer *NpHtrII₁₅₇* gearbeitet. Die Bindungsstudien (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003) zwischen dem Rezeptor *NpSRII* und dem Transducer *NpHtrII₁₅₇* haben gezeigt, dass die verkürzte Form des Transducers eine ausreichende Bindungskapazität besitzt um die Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen zu studieren. Für die Methode der ESR-Spektroskopie ist es notwendig Cysteinmutanten der interessanten Positionen im Protein herzustellen und diese mit MTS-Spinlabel zu markieren. Um eine mögliche Auswirkung der Mutation bzw. der Spinmarkierung auf die Aktivität Proteine auszuschließen, wird von den Rezeptor-mutanten der Photozyklus gemessen und mit dem Wildtyp verglichen.

3.1.1 Auswahlkriterien für die Spinmarkierung

Die Auswahlkriterien der Positionen am Rezeptor für die Spinmarkierung erfolgen in Anlehnung an die vorangegangenen Arbeiten von Wegener und Klare (Wegener *et al.*, 2000; Wegener *et al.*, 2001; Klare *et al.*, 2004). Anhand spinmarkierter Positionen im *NpSRII* sollen die strukturellen Änderungen des Rezeptors im Hinblick auf die Aktivierung der Transducerhelix TM2 untersucht werden. Wie bereits beschrieben existieren derzeit zwei Modelle zur Aktivierung der TM2. ESR-spektroskopische Untersuchungen postulieren eine auswärtsgerichtete Helix F Bewegung, welche eine Rotation der TM2 auslöst (Bordignon *et al.*, 2007). Kristallstrukturuntersuchungen dagegen beobachten eine Bewegung der Helix G, welche ebenfalls eine Rotation der TM2 induziert. Die von Wegener eingeführte Spinmarkierung *NpSRII-L159R1*

befindet sich an der Helix F gegenüber der TM2 und ist nach innen gerichtet. Im Rahmen dieser Arbeit werden Cysteinmutanten gegenüber der L159R1-Seitenkette auf den Helices B, C und G eingeführt. Diese Mutationen dienen dazu um die Aktivierung der TM2 über die Helix F Bewegung zu untersuchen. Die von Klare eingeführte Cysteinmutation *NpSRII-L213R1* befindet sich an der Helix G und ist ebenfalls nach Innen gerichtet. Mutationsstellen, die sich gegenüber von *NpSRII-L213R1* befinden, sollen die Theorie der Helix G-Bewegung erforschen.

Die ESR-spektroskopischen Untersuchungen (Klare *et al.*, 2004) haben gezeigt, dass der Lichtaktivierung des Rezeptors einige strukturelle Änderungen folgen. Das M-Intermediat ist der signalgebende Zustand des Rezeptors. Die Signaltransduktion zwischen dem Rezeptor und dem Transducer erfolgt während des M1-M2-Übergangs. Die Bildung des M-Intermediates erfolgt nach der Protonierung der Asparaginsäure 75 (D75). Um strukturelle Änderungen am Rezeptor ohne das signalgebende M-Intermediat zu studieren, wurde von Klare die negativ geladene Aminosäure Asparaginsäure (D) gegen eine strukturell ähnliche, jedoch neutrale Aminosäure Asparagin (N) eingeführt. Analog zu den ESR-Untersuchungen an dem Wildtyp-Cysteinmutanten werden entsprechende Mutationen an *NpSRII-D75N* eingeführt.

Für die Untersuchung von lichtinduzierten Konformationsänderungen an dem Rezeptor werden folgende Einzel- und Doppel-Cysteinmutanten hergestellt und mit dem MTS-Spinlabel (R1) markiert:

- *NpSRII-L159R1^F*
- *NpSRII-Y36R1^B/L159R1^F*
- *NpSRII-R34R1^B/L159R1^F*
- *NpSRII-L90R1^C/L159R1^F*
- *NpSRII-L89R1^C/L159R1^F*
- *NpSRII-L213R1^G*
- *NpSRII-L89R1^C/L213R1^G*
- *NpSRII-L159R1^F/L213R1^G*
- *NpSRII-Y36R1^B*
- *NpSRII-R34R1^B*
- *NpSRII-L90R1^C*
- *NpSRII-L89R1^C*

- *Np*SRII-D75N^C/L159R1^F
- *Np*SRII-D75N^C/L213R1^G
- *Np*SRII-D75N^C/L89R1^C
- *Np*SRII-D75N^C/L89R1^C/L159R1^F
- *Np*SRII-D75N^C/L89R1^C/L213R1^G
- *Np*SRII-D75N^C/L159R1^C/L213R1^G

Die Indizes zeigen die entsprechende Helix, an der sich die Mutationen befinden. Die Anordnung sowie die Ausrichtungen der Mutanten werden in Abbildung 3.1.1 dargestellt.

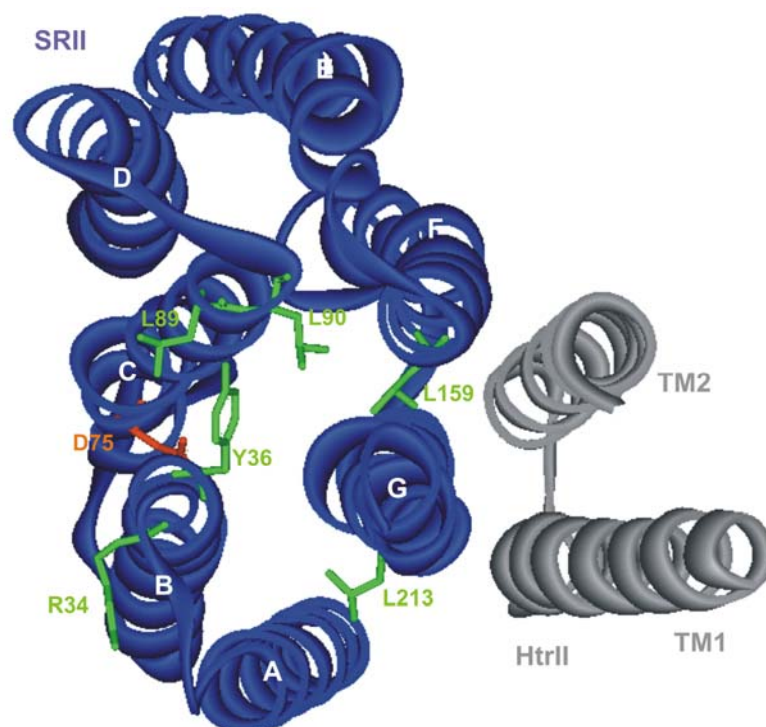


Abb. 3.1.1: Kristallstruktur des Rezeptor-Transducer-Komplexes *Np*SRII-*Np*HtrII₁₅₇ [1H2S] mit ausgewählten Positionen für Spinmarkierung.

3.1.2 Expression und Aufreinigung

Die Einführung der Cysteinmutation erfolgt nach der *Overlap-Extension-Methode* (Ho *et al.*, 1989). Die Expressionen der Proteine erfolgen je nach Anwendung wie in Kapitel 2.5 beschrieben. Alle in diesem Projekt verwendeten Proteine sind mit N-terminalen His-Affinitätstag versehen und werden über die Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Anschließend werden die Cysteinmutanten ent-

sprechend dem Protokoll (Kapitel 2.5) mit einem Spinlabel markiert und in polare Lipide rekonstituiert. Die Kontrolle sowie die Effizienz der Aufreinigung, erfolgen über SDS-PAGE. Die Proteinmasse des Rezeptors beträgt 27 kDa, stellvertretend für alle Rezeptoraufreinigungen erfolgt die Charakterisierung des Wildtyps *NpSRII-His* (Abb. 3.1.2).

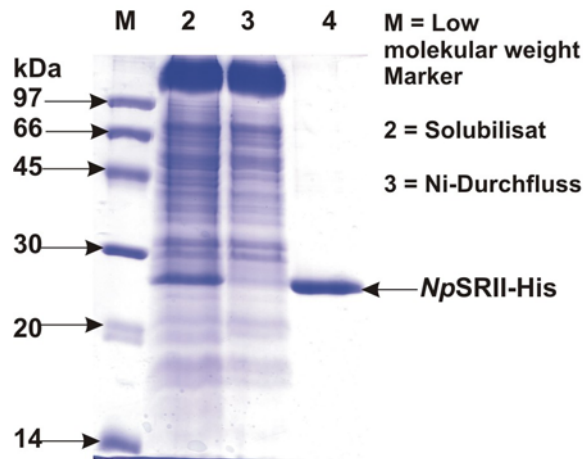


Abb. 3.1.2: Charakterisierung der Aufreinigung von *NpSRII-His* mittels Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie.

Das SDS-Gel in der Abbildung 3.1.2 beschreibt die Fraktionen aus der Ni-NTA-Aufreinigung des exprimierten *NpSRII-His* aus der Membranfraktion. In der ersten Spur auf dem Gel ist LMW-Marker aufgetragen. Die zweite Spur beschreibt das Solubilisat, welches mit 2 % Detergenz (DDM) aus der Membran heraus gewaschen wurde. In der dritten Spur ist der Durchfluss der Ni-NTA-Säule aufgetragen. Dieser enthält alle Membranproteine ohne His-Tag. Die vierte Spur beschreibt das Ni-NTA-Eluat und enthält nur das Zielprotein *NpSRII-His*. Die Ausbeute von Rezeptorproteinen liegt zwischen 2 und 5 mg/L_{Kultur}. Unter Verwendung von Minimalmedium (Vgl. Kapitel 2.4.8) können Ausbeuten bis zu 7 mg/L_{Kultur} erzielt werden.

Nach der Aufreinigung wird von den Rezeptorproteinen zur Konzentrationsbestimmung UV/Vis-Spektrum aufgenommen. Das Absorptionsmaximum bei dem Wildtyprezeptor liegt bei 499 nm, das der *NpSRII-D75N*-Mutante bei 520 nm (Abb. 3.1.3). Über das Verhältnis der Absorptionsmaxima von aromatischen Aminosäuren A_{280} zu Chromophor A_{499} bzw. A_{520} lässt sich feststellen, wieviel Apoprotein in der Lösung vorhanden ist. Bei dem Apoprotein handelt es sich um Rezeptorproteine, die den Chromophor nicht gebunden bzw. verloren haben. Üblicherweise liegt das Verhältnis r (*ratio*) zwischen 1,3-1,5.

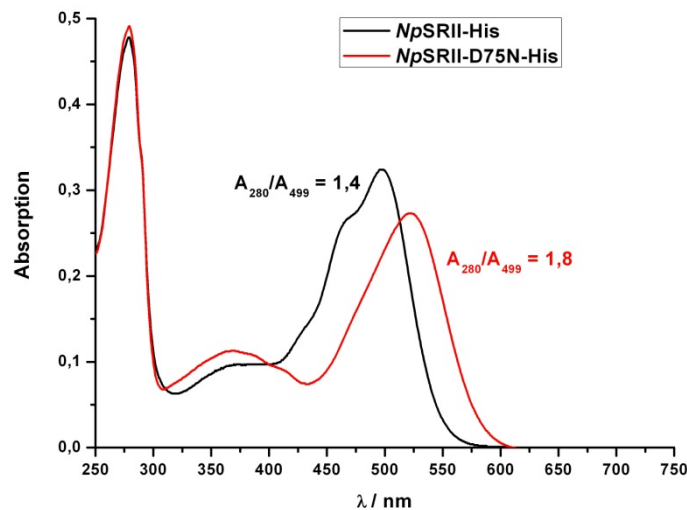


Abb. 3.1.3: UV/Vis-Absorptionsspektrum von NpSRII-His (schwarz) und NpSRII-D75N-His (rot).

Das Absorptionsspektrum des Wildtyps (Abb. 3.1.3, schwarz) zeigt drei Absorptionsmaxima. Bei der Wellenlänge von 280 nm absorbieren die aromatischen Aminosäuren. Die Absorption bei 360 nm stammt von der protonierten Schiff Base. Das freie ungebundene Retinal absorbiert bei 380 nm. Das Absorptionmaximum von funktionellen Rezeptorprotein NpSRII liegt bei 499 nm. Das Verhältnis A_{280}/A_{499} beträgt 1,4. Somit enthält die Proteinlösung größtenteils funktionalen Rezeptor.

Bei der D75N-Mutante (Abb. 3.1.3, rot) sind zum Wildtyp analoge Absorptionsmaxima detektierbar. Das Absorptionsmaximum des funktionalen Proteins ist um 20 nm gegenüber dem Wildtyp verschoben. Das Verhältnis A_{280}/A_{499} beträgt 1,8 und bedeutet, dass etwa die Hälfte der Proteinlösung aus funktionalem Rezeptor bestehen.

Die Aufreinigung des Transducerproteins NpHtrII₁₅₇-His, welches für die Komplexbildung benötigt wird, erfolgt analog zum Rezeptor. Das Molekulargewicht des Transducers beträgt 17 kDa. Die Ausbeuten liegen bei 11-13 mg/L_{Kultur}. Nach der Aufreinigung beider Proteine erfolgt die Rekonstitution des Rezeptor-Transducer-Komplexes. Die Abbildung 3.1.4 zeigt die SDS-Gele von aufgereinigten Rezeptor und Transducer in Detergenzlösung sowie den in polare Lipide rekonstituierten Komplex.

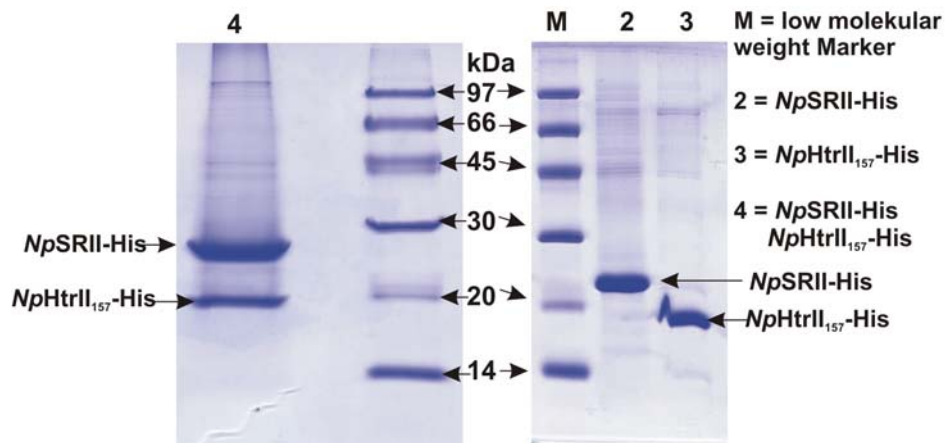


Abb. 3.1.4: SDS-Gel zur Kontrolle der Rekonstitutionseffizienz. Rechts sind Rezeptor und Transducer in Detergenz aufgetragen. Auf der linken Seite ist das SDS-Gel von dem Komplex in den polaren Lipiden rekonstituiert dargestellt.

Die Rekonstitution des Komplexes erfolgt wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben. Auf der rechten Seite der Abbildung 3.1.4 ist das SDS-Gel von dem aufgereinigten Transducer (Abb. 3.1.4, Spur 3) und dem Rezeptor (Abb. 3.1.4, Spur 3) aufgetragen. Das SDS-Gel auf der linken Seite in der Abbildung 3.1.4 beschreibt die Proteinbanden von dem Komplex rekonstituiert in polare Lipide. Wie anhand des SDS-Gels zu erkennen ist, verändern die Lipide das Laufverhalten der Proteine. Die Banden liegen etwas höher und sind insgesamt breiter. Da es sich bei der SDS-Gelelektrophorese um eine denaturierende Methode handelt, sind auf dem Gel zwei einzelne Banden und nicht die des Komplexes zu sehen.

3.1.3 Photozyklusmessungen

Der erste Schritt in der Signaltransduktion ist die Lichtaktivierung des Rezeptors. Nach der Isomerisierung des Retinals durchläuft der Rezeptor eine Reihe von Intermediaten. Diese Konformationsumwandlung des Rezeptors ist eine Voraussetzung zur Signalweiterleitung ins Zellinnere über den Transducer. Mit Hilfe der Methode der Blitzlichtphotolyse (Vgl. Kapitel 2.7.1) lassen sich kinetische Daten zur Bildung und Zerfall einzelner Intermediate gewinnen. Der Photozyklus des *NpSRII*-Wildtyps wurde in detergenzhaltiger Lösung (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,5 % DDM, pH 8), der des *NpSRII-NpHtrII*₁₅₇-Komplexes in polare Lipide rekonstituiert gemessen (Abb. 3.1.5). Das Absorptionsmaximum bei 500 nm repräsentiert die Bildung und den Zerfall des Grundzustands, die Absorptionsänderungen bei 550 nm

zeigen die Kinetik für die Bildung und die Relaxation des O-Intermediates. Die Absorptionen bei 400 nm beschreiben die Änderungen während des M-Intermediates.

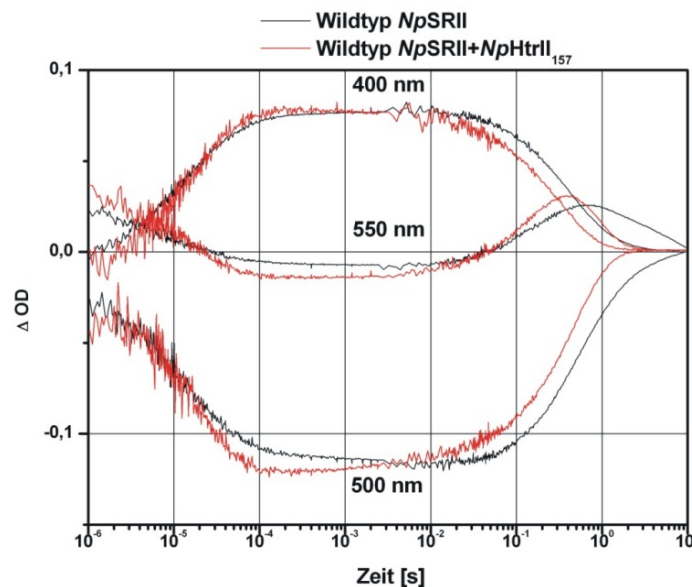


Abb. 3.1.5: Photozyklus des solubilisierten NpSR II-Wt (schwarz) und des rekonstituierten NpSR II-NpHtr II₁₅₇-Komplexes (rot). Das Absorptionsmaximum bei 500 nm beschreibt den Grundzustand, bei 550 nm das O-Intermediat und bei 400 nm das M-Intermediat.

Anhand der Photozyklen (Abb. 3.1.5) ist deutlich zu sehen, dass sich Bildung und Zerfall einzelner Intermediate je nach äußeren Bedingungen ändern. In diesem Fall sind Systeme mit zwei unterschiedlichen Parametern gegenüber gestellt. Zum einen unterscheiden sie sich in ihrer Zusammensetzung (Rezeptor alleine und Rezeptor im Komplex mit dem Transducer) und zum anderen in ihrer äußeren Umgebung (Detergenz und Lipide). Der Einfluss der Lipide bzw. des Detergenzes auf den Photozyklus des Rezeptor-Transducer-Komplexes wurde bereits von Klare im Rahmen einer Dissertation untersucht (Klare, 2003). In der Membran formt der Rezeptor einen 2:2-Komplex mit dem Transducer. Während der Rezeptor in Lösung verdünnt und flexibel ist, verändern die Lipide die Oberfläche der Proteine. Es wurde beobachtet, dass der L-M-Übergang während des Photozyklus des Rezeptors, solubilisiert in Detergenz, sowohl als Komplex mit dem Transducer, als auch alleine um Faktor 2 langsamer stattfindet. Weiterhin kann eine Verlangsamung des M-Zerfalls beobachtet werden. Der M-Zerfall des Rezeptor-Transducer-Komplexes, rekonstituiert in Lipide, erfolgt schneller, als der des rekonstituierten Rezeptors alleine. Der Transducer beschleunigt somit den Zerfall des M-Intermediates. Bei der Bildung des M-Intermediates können keine Unterschiede festgestellt werden. Die

Amplitude des O-Intermediates ist bei der solubilisierten Probe verringert, was auf die Verlangsamung des M-Zerfalls zurückzuführen ist. Die Rückbildung des Grundzustandes ist bei der rekonstituierten Probe leicht beschleunigt.

Die eingeführten Mutationen können einen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins ausüben und die Messergebnisse verfälschen. Um dies auszuschließen werden von den Cysteinmutanten Photozyklen gemessen und mit dem des Wildtyps verglichen (Abb. 3.1.6).

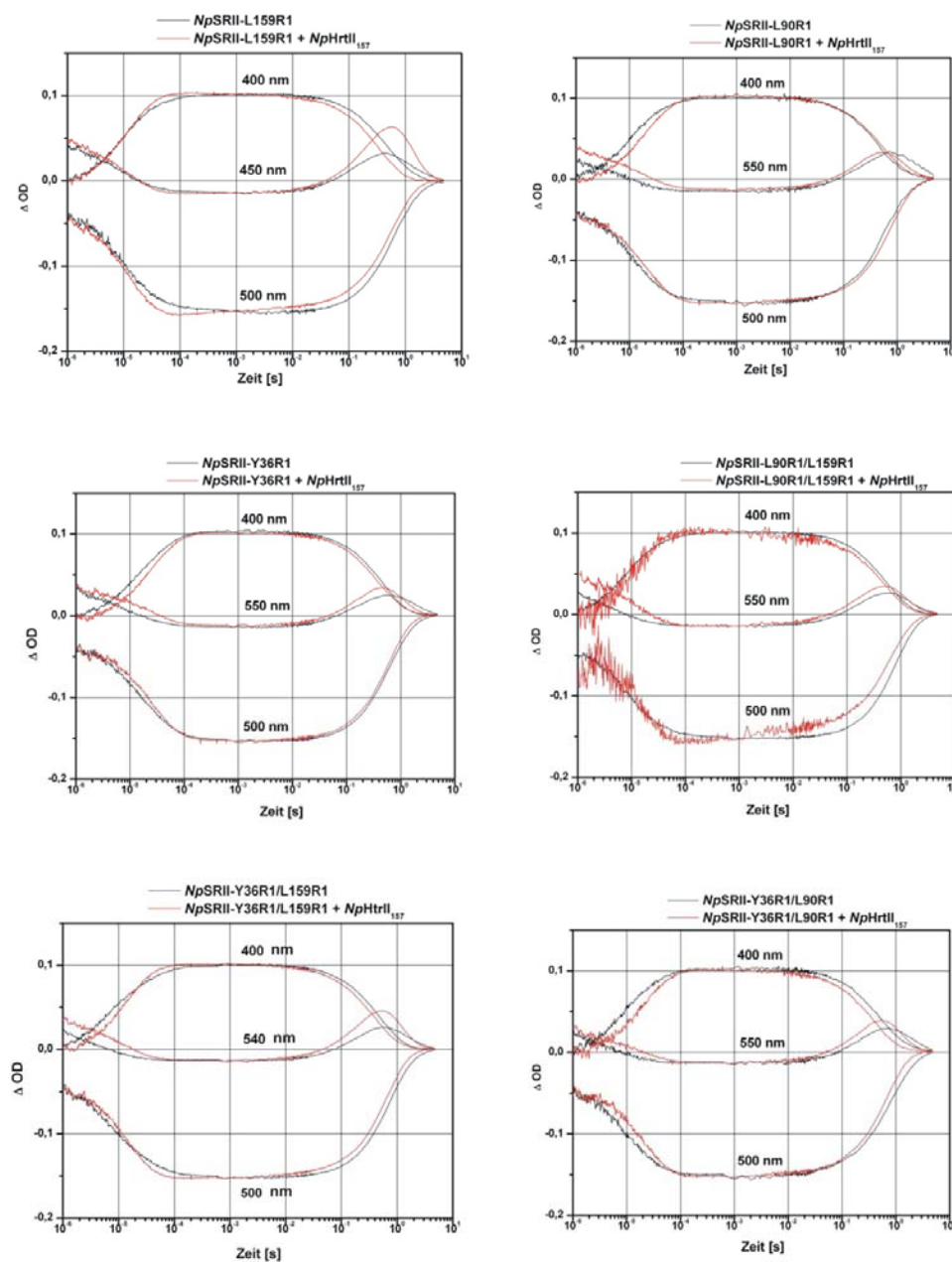


Abb. 3.1.6: Photozyklen der spinmarkierten Rezeptorcysteinmutanten. Die Spektren, in schwarz dargestellt, beschreiben die Photozyklen der jeweiligen Mutanten in Lösung (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,5 % DDM, pH 8), die in roter Farbe, sind in polare Lipide rekonstituiert und im Komplex mit dem Transducer gemessen.

Der Photozyklus von L159R1 kommt dem des Wildtyps am nächsten. Es können dieselben kinetischen Effekte beobachtet werden bezüglich der M-Bildung und des M-Zerfalls. Die Bildung und der Zerfall des O-Intermediates sind dagegen viel langsamer bei dem Komplex, als bei der solubilisierten Probe (Vgl. Tab. 3.1.1). Diese Mutation scheint das O-Intermediat zu stabilisieren. Der Zerfall des M-Intermediates bei L90R1 und Y36R1, solubilisiert in Detergenz, ist im Gegensatz zu dem des Wildtyps schneller. Die Bildung des M-Intermediates bei diesen Mutanten in Detergenz ist langsamer. Bei dem Wildtyp können keine Unterschiede in der Kinetik bei der Bildung des M-Zustandes gegenüber dem rekonstituierten Komplex detektiert werden. Somit ist dieser Effekt alleine auf die eingeführten Mutationen zurückzuführen. Auffällig bei beiden Mutanten ist jedoch der Zerfall des O-Intermediates. Dieser ist bei den solubilisierten Proben um Faktor 7 langsamer gegenüber dem Wildtyp und um Faktor 3 langsamer im Vergleich zum rekonstituierten Komplex (Vgl. Tab. 3.1.1).

Bei dem Photozyklus der Doppelmutanten scheinen sich die Effekte gegenseitig zu kompensieren. Der Photozyklus von Y36R1/L90R1 unterscheidet sich kaum von dem des Wildtyps. Der Einfluss der L90R1-Mutation scheint bei L90R1/L159R1 etwas stärker zu sein, als der der L159R1-Mutation, da sich die kinetischen Absorptionsänderungen mehr denen von L90R1 ähneln. Bei der Y36R1/L159R1-Mutation kann ein gegenläufiger Effekt beobachtet werden. In der Tabelle 3.1.1 sind einzelne, für die Wellenlängen charakteristische, Zeitkonstanten dargestellt. Diese beschreiben die benötigte Zeit für die Bildung und den Zerfall jeweiliger Intermediate. Die Messungen in Detergenz sind gelb unterlegt.

Tab. 3.1.1: Zeitkonstanten für die Bildung und den Zerfall von M- und O-Intermediaten. Die Messungen in Detergenz sind gelb unterlegt.

Probe NpSR _{II}	M-Bildung	M-Zerfall	O-Zerfall
Wildtyp PM	12 μ s	150 ms	400 ms
L159R1 DDM	10 μ s	160 ms	1150 ms
L159R1 PM	5 μ s	350 ms	800 ms
L90R1 DDM	11 μ s	250 ms	3090 ms
L90R1 PM	12 μ s	280 ms	930 ms
Y36R1 DDM	10 μ s	180 ms	2970 ms
Y36R1 PM	16 μ s	250 ms	730 ms
L90R1/L159R1 DDM	8 μ s	220 ms	1330 ms
L90R1/L159R1 PM	5 μ s	230 ms	950 ms
Y36R1/L159R1 DDM	7 μ s	240 ms	1270 ms
Y36R1/L159R1 PM	11 μ s	370 ms	620 ms
Y36R1/L90R1 DDM	8 μ s	270 ms	1880 ms
Y36R1/L90R1 PM	2 μ s	370 ms	650 ms

Die Photozyklen der Doppelmutanten L89R1/L159R1, L89R1/L213R1 und L159R1/L213R1 sind rekonstituiert im Komplex mit dem Transducer gemessen (Abb. 3.1.7). Die entsprechenden kinetischen Daten sind in Tabelle 3.1.2 dargestellt.

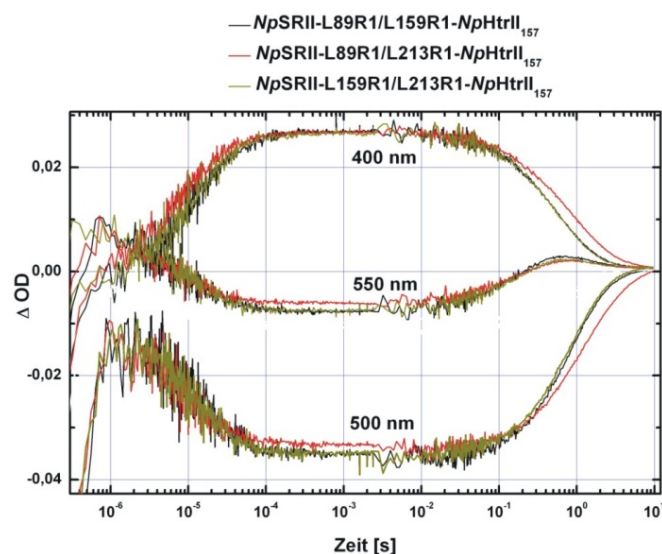


Abb. 3.1.7: Photozyklen der Doppelmutanten L89R1/L159R1 (schwarz), L89R1/L213R1 (rot) und L159R1/L213R1 (grün).

Die kinetischen Absorptionsänderungen von L89R1/L159R1 und L159R1/L213R1 sind nahezu deckungsgleich. Da sich die Photozyklen nicht wesentlich von dem des Wildtyps unterscheiden, wurde auf die Messung der Einzelmutanten L89R1 und L213R1 verzichtet.

Tab. 3.1.2: Zeitkonstanten für die Bildung und den Zerfall von M- und O-Intermediaten.

Probe <i>Np</i> SR11	M-Bildung	M-Zerfall	O-Zerfall
L89R1/L159R1 PM	9 μ s	180 ms	1410 ms
L89R1/L213R1 PM	6 μ s	170 ms	2130 ms
L159R1/L213R1 PM	9 μ s	180 ms	1170 ms

Die kinetischen Daten der Spinmarkierungen zeigen, dass die Spinlabel nur geringfügig den Photozyklus beeinflussen. Die spinmarkierten Mutanten können somit für die ESR-Untersuchungen eingesetzt werden.

3.1.4 ESR-Untersuchungen zur Konformationsänderungen am Rezeptor

Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie sollen die lichtinduzierten dynamischen Änderungen am Rezeptor beobachtet werden. Dazu werden alle eingeführten einzel- und doppel-Mutationen als Komplex mit dem verkürzten Transducer *Np*HtrII₁₅₇, in polare Lipide rekonstituiert, gemessen. Es werden die Raumtemperatur-, Tieftemperatur- und Zeitaufgelösten-Spektren aufgenommen. Die Raumtemperatur cw (engl.: *continuous wave*) Spektren geben Aufschluss über die Mobilität des Spinlabels. Sollte ein Spinlabel an einer bestimmten Position zu starke Mobilität aufweisen, so kann eine Reorientierung des Spinlabels bei lichtinduzierten Konformationsänderungen nicht ausgeschlossen werden. Dies erschwert die Untersuchung und die Interpretation der Messergebnisse. Daher sollten alle eingeführten Spinmarkierungen möglichst immobil sein. Mittels Tieftemperatur-ESR-Spektroskopie können die Abstände zweier Spinmarkierungen ermittelt werden. Mit den zeitaufgelösten ESR-Messungen werden die lichtinduzierten Konformationsänderungen am Rezeptor analysiert.

3.1.5 Raumtemperatur (cw)-ESR-Spektren

Die cw-ESR-Spektren für die Einzel- und Doppel-Mutanten sind in der Abbildung 3.1.8 dargestellt und wurden bei Raumtemperatur (23-26°C) aufgenommen.

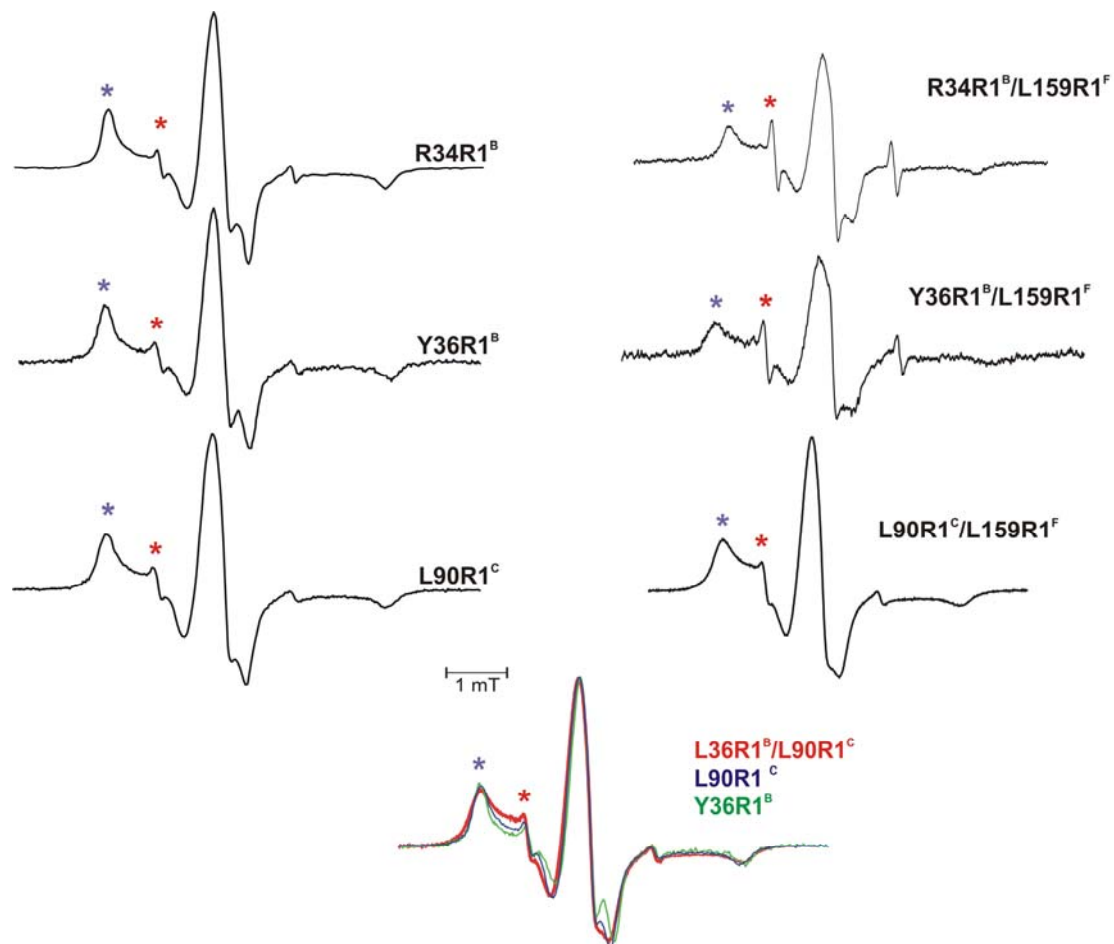


Abb. 3.1.8: Raumtemperatur-ESR-Spektren der MTS-spinmarkierten Rezeptormutanten im Komplex mit dem Transducer NpHtrII₁₅₇, rekonstituiert in polare Lipide. Die Position der Spinmarkierung ist an den jeweiligen Spektren angegeben. Mobile Komponenten der Seitenketten sind mit roten und die immobilen mit blauen Sternen markiert.

Charakteristisch für die mobilen Seitenketten sind Spektren mit schmalen Linienbreiten und einer kleinen Hyperfeinaufspaltung. Die Spektren von immobilen Seitenketten zeichnen sich durch Linienverbreiterung aus. Die R34R1- und Y36R1-Seitenketten sind an der Helix B lokalisiert, wobei die Y36R1-Seitenkette ins Innere des Proteins und die R34R1-Seitenkette nach Außen gerichtet ist. Die L90R1-Seitenkette, welche an der Helix C lokalisiert ist, richtet sich ins Innere des Proteins.

Die cw-Spektren (Abb. 3.1.8 links) der drei Einzelmutanten zeigen ein charakteristisches Spektrum für immobile Seitenketten. Die mit einem blauen Stern markierten lokalen Maxima beschreiben die immobilen Komponenten der Seitenketten, die mit einem roten stellen die mobilen Komponenten dar. In allen drei Spektren überwiegen die immobilen Komponenten der Seitenketten. Dies ist durch eine starke Inhibierung der Flexibilität der nach Innen gerichteten Seitenketten aufgrund dichter Packung der Helices begründet. Überraschend ist, dass die Mobilität der R34R1-Seitenkette, welche nach Außen des Proteins gerichtet ist, ebenfalls stark eingeschränkt ist. Dies lässt sich durch die Interaktion mit den Lipid-Kopfgruppen oder durch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen bei einer Dimerisierung erklären.

In der Abbildung 3.1.8 (rechts) sind die cw-Spektren der Doppelmutanten, bezogen auf die L159R1 an der Helix F, dargestellt. Die Spektren von R34R1/L159R1 und Y36R1/L159R1 zeigen, verglichen mit den jeweiligen Einzelmutanten, eine geringe Zunahme der Mobilität. Das Spektrum von L90R1/L159R1 unterscheidet sich nicht von dem der zugehörigen Einzelmutante. In der Abbildung 3.1.8 (unten) sind cw-ESR-Spektren von der Y36R1/L90R1-Doppelmutante (Abb. 3.1.8, rot) sowie den Y36R1- (Abb. 3.1.8, grün) und L90R1-Einzelmutanten (Abb. 3.1.8, blau) übereinander gelegt. Auffällig ist eine Linienverbreiterung des Spektrums der Doppelmutante. Dies resultiert aus einer dipolaren Wechselwirkung der Spinseitenketten, welche aufgrund der räumlichen Anordnung zu einander, entsteht. In der Abbildung 3.1.9 sind cw-ESR-Spektren der L89R1-, L159R1- und L213R1-Spinmarkierungen dargestellt. Diese Seitenketten sind nach Innen gerichtet und sind so positioniert, dass sie in einer Ebene liegen und etwa gleiche Abstände haben. Analog zu diesen Cysteinmutationen werden dieselben Positionen an der D75N-Mutante modifiziert. Die jeweiligen cw-Spektren werden in der Abbildung 3.1.9 denen des spinmarkierten Wildtypen gegenübergestellt.

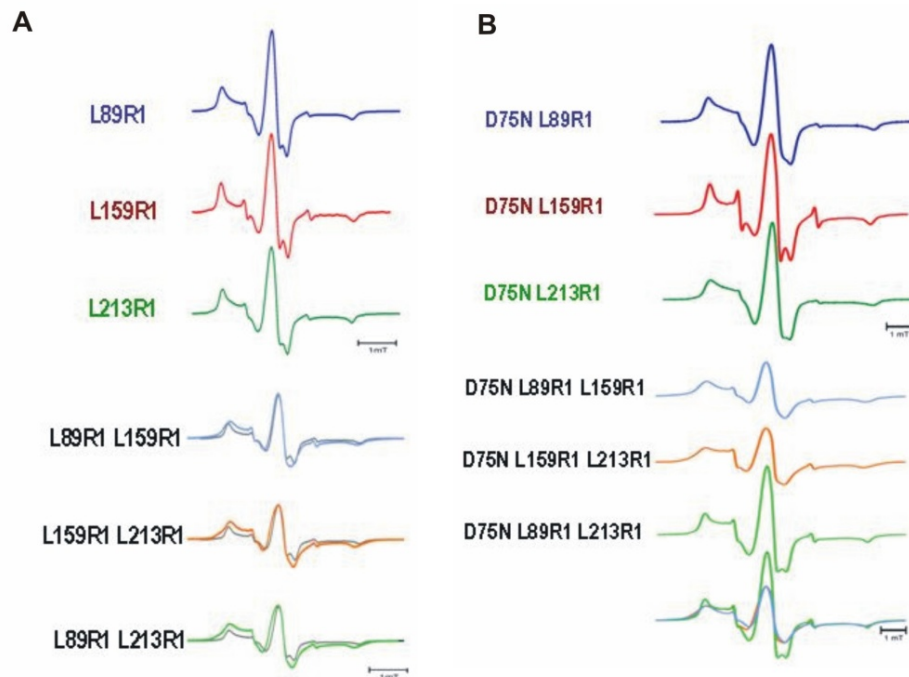


Abb. 3.1.9: Raumtemperatur-ESR-Spektren von spinmarkierten Einzel- und Doppelcysteinmutanten des SRII-Wildtyps (A) und der entsprechenden D75N-Mutante (B). Die farbigen Spektren zeigen cw-Spektren von Doppelmutanten, die grauen Spektren die der Summe der zugehörigen Einzelmутanten. Die Spektren resultierend aus Summen der Einzelmутanten (B, unten) sind übereinander gelegt.

Die Spektren spinmarkierter Einzel- und Doppelmutanten zeigen eine ausgeprägte immobile Komponente der Seitenketten. Wie bereits beschrieben stellt dies eine notwendige Voraussetzung dar, um die Reorientierung des Spinlabels auszuschließen. Die Spektren der Doppelmutanten des Wildtyps (Abb. 3.1.9, A) werden mit denen aus der Summe der Einzelmутanten resultierenden Spektren (Abb. 3.1.9, grau) verglichen. Wie im vorherigen Fall wird auch hier eine Linienverbreiterung beobachtet. Die Spinlabel der Doppelmutanten wechselwirken stark miteinander.

Die Summen der ESR-Spektren der Einzelmутanten des D75N-Rezeptors sind in der Abbildung 3.1.9 (B, unten) übereinandergelegt. Bis auf geringe Unterschiede in ihrer Mobilität unterscheiden sie sich nicht voneinander. Da es sich bei den Raumtemperatur-ESR-Spektren um die Messungen an dem Rezeptor im Grundzustand handelt, sind keine Abweichungen der Wildtyp-Cysteinmutanten von denen der D75N-Mutanten zu erwarten.

3.1.6 Zeitaufgelöste ESR-Spektren

Um die strukturellen Änderungen nach Lichtaktivierung von spinmarkierten Rezeptorproteinen zu untersuchen, werden zeitaufgelöste ESR-Spektren aufgenommen. Dazu werden Differenzspektren zwischen dem lichtaktivierten Zustand und dem Grundzustand gemessen. Bei einer Lichtaktivierung verändert der Rezeptor seine Konformation, infolgedessen können Transientenänderungen beobachtet werden. Anhand des Musters der Transientenänderungen (Abb. 3.1.10, graue Balken), lassen sich Aussagen bezüglich der Zunahme bzw. der Abnahme der Mobilität des Spinlabels nach Lichtaktivierung treffen. Die Amplituden der jeweiligen Transienten beschreiben die Stärke und die Art der Mobilitätsänderung. Um die lichtinduzierte Mobilitätsänderung am Rezeptor zu untersuchen, wird der „*fingerprint*-Bereich“ in dem niedrigen B-Feld und der Zentralpeak betrachtet (Vgl. Abb. 3.1.10). Im Fall einer lichtinduzierten Mobilitätszunahme haben die Transienten im niedrigen B-Feld zunächst einen Block von negativen Werten gefolgt von positiven Werten. In dem zentralen Peak werden umgekehrt positive Werte von den negativen abgelöst (Abb. 3.1.10, roter Balken).

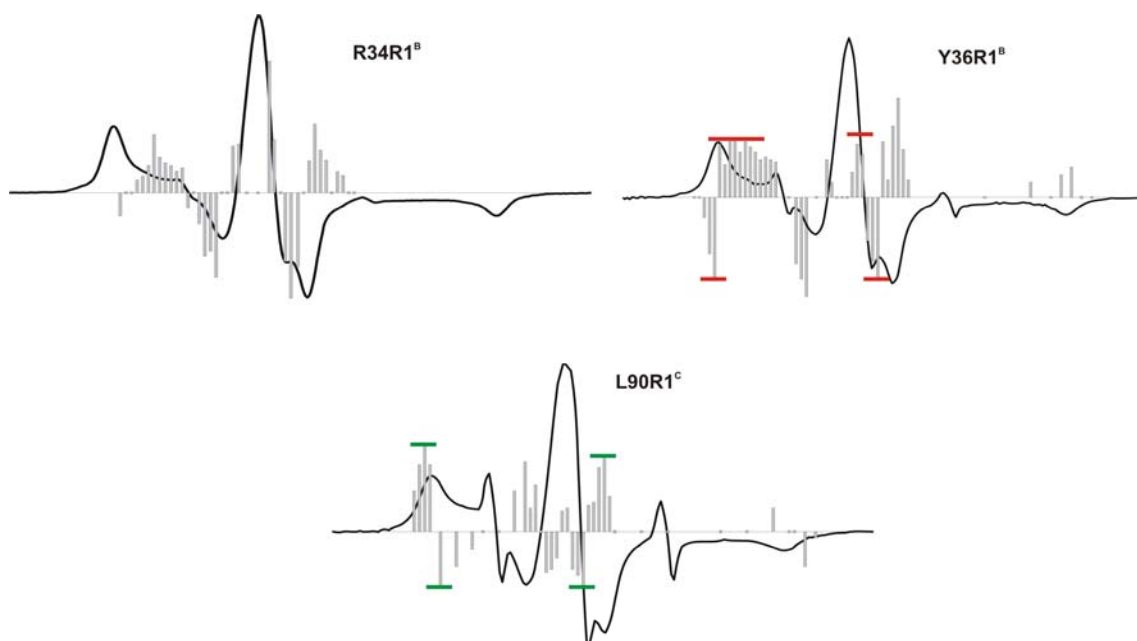


Abb. 3.1.10: Zeitaufgelöste ESR-Spektren von R34R1-, L90R1- und R36R1-Seitenketten. Die schwarzen Spektren stellen die Differenz-cw-ESR-Spektren dar. Die grauen Balken beschreiben die maximalen Transientenänderungen. Die roten Balken beschreiben die Abfolge von Transientenwerten bei einer lichtinduzierten Mobilitätszunahme, die grünen bei einer Mobilitätsabnahme.

Die Mobilitätszunahme ist ganz deutlich an den R34R1- und Y36R1-Mutanten zu sehen. Aufgrund der Amplituden von Transienten ist die Mobilitätszunahme bei der Y36R1-Seitenkette größer als die bei R34R1. Wenn die Mobilität nach einer Lichtaktivierung abnimmt wird ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Im niedrigen B-Feld lösen negativen Werte der Transienten die positiven ab und im Zentralpeak umgekehrt (Abb. 3.1.10, grüner Balken). Dieser Effekt ist eindeutig an der L90R1-Seitenkette zu beobachten.

Die unterschiedliche Änderung der Mobilität der Seitenketten L90R1 und Y36R1 lässt sich nicht aufgrund der Lokalisierung erklären, da sich beide etwa auf einer Höhe im Protein befinden. Für beide Spinmarkierungen ist keine Mobilitätsänderung zu erwarten, falls die TM2-Aktivierung über die Helices F bzw. G erfolgen. Eine mögliche Ursache für die verminderte Mobilität bei der L90R1-Mutante ist, in Folge einer lichtinduzierten Konformationsänderung der Helix C, eine Einschränkung der Beweglichkeit des Spinlabels. Die Zunahme der Mobilität bei der Y36R1-Mutante lässt eine lichtinduzierte Reorientierung des Spinlabels vermuten.

Um die möglichen Reorientierungen der Spinlabel für die Positionen Y36R1 und L90R1 zu überprüfen, wurden von Igor Shapiro im Rahmen eines Praktikums MD-Simulationen durchgeführt. Die möglichen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten für die Spinmarkierungen nach einer Lichtaktivierung sind in Abbildung 3.1.11 dargestellt.

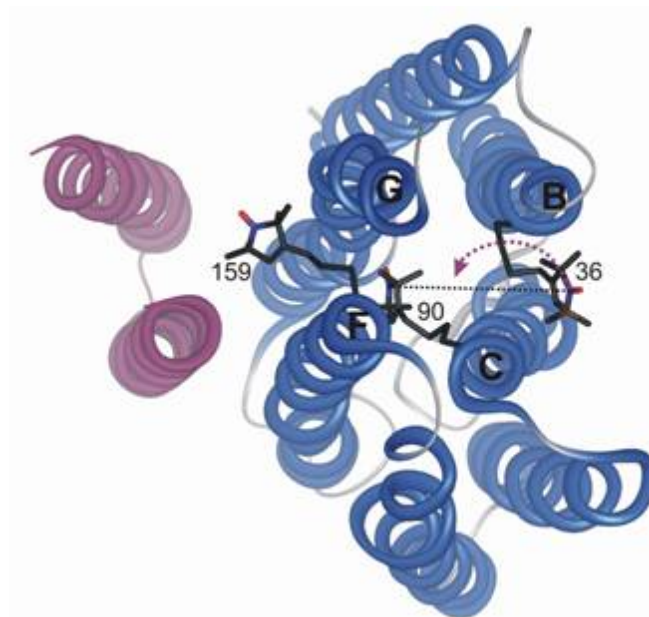


Abb. 3.1.11: Lokalisierung der L90R1- und Y36R1-Seitenketten in Bezug auf L159R1 basierend auf MD-Simulation (durchgeführt von Igor Shapiro). Für die Y36R1-Mutante können zwei mögliche Positionen für Spinlabel simuliert werden. L90R1 weist nur eine mögliche Position auf.

Für die Position L90R1 konnte nur eine mögliche Position ermittelt werden. Das Spinlabel der Y36R1-Mutante weist dagegen zwei mögliche Aufenthaltswahrscheinlichkeiten auf. Wie in Abbildung 3.1.11 dargestellt, kann sich das Spinlabel von Y36R1 entlang des eingezeichneten Pfeils bewegen. Wenn sich das Spinlabel der Y36R1-Mutante in Richtung des Pfeils bewegt, kann dieser die Mobilität des L90R1-Spinlabels einschränken.

Die Transientenänderungen der L89R1-, L159R1- und L213R1-Seitenketten sowie der D75NL89R1-, D75NL159R1- und D75NL213R1-Seitenketten sind in Abbildung 3.1.12 dargestellt.

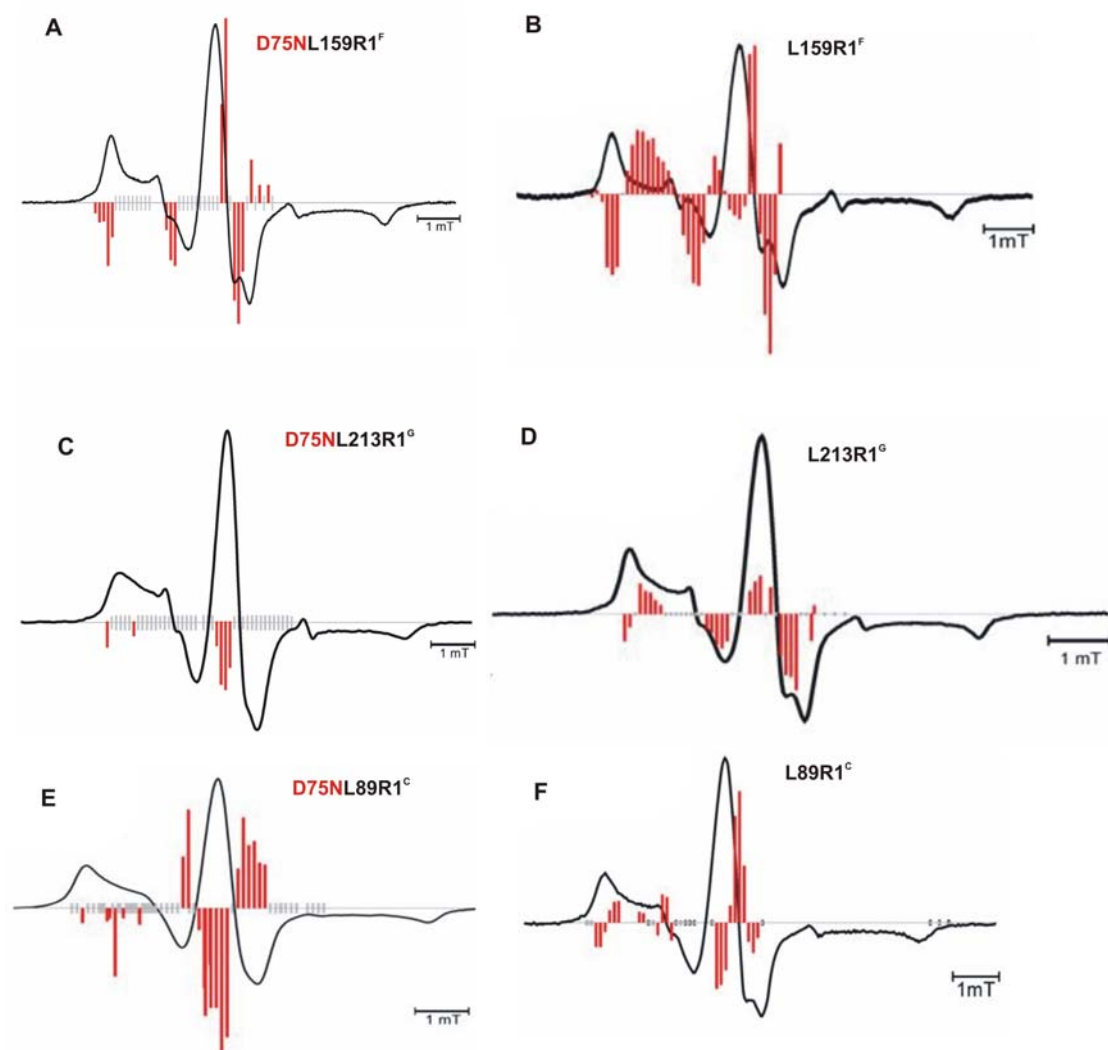


Abb. 3.1.12: Zeitaufgelöste ESR-Spektren der L89R1-, L159R1-, L213R1-, D75NL89R1-, D75NL159R1- und D75NL213R1-Seitenketten. Die schwarzen Spektren stellen cw-ESR-Spektren dar. Die roten Balken beschreiben die Transientenänderungen.

Bei allen Mutanten ist eine Zunahme der Mobilität im unterschiedlichen Ausmaß zu beobachten. Die Konformationsänderungen der L159R1-Seitenkette (Abb. 3.1.12, B), welche an der Helix F lokalisiert ist, sind bei der Wildtyp-Mutante stärker ausgeprägt, als die entsprechende Position an dem D75N-Rezeptor (Abb. 3.1.12, A). Anhand der Anzahl der gemessenen Transienten sowie deren Amplituden stellt die L159R1-Mutante die dynamischste Seitenkette dar. Die L213R1-Mutante (Abb. 3.1.12, D) dagegen weist die geringste lichtinduzierte Dynamik auf. Besonders ist dies an der D75NL213R1-Seitenkette (Abb. 3.1.12, C) zu beobachten. Die Anzahl und die Intensität der Transienten sind sehr schwach ausgeprägt. Die lichtinduzierte Mobilitätszunahme der D75NL89R1-Mutante (Abb. 3.1.12, E) ist im Vergleich zu L89R1 (Abb. 3.1.12, F) intensiver.

3.1.7 Tieftemperatur ESR-Spektren

Die Tieftemperatur ESR-Spektren werden bei 170 K aufgenommen. Mit dieser Methode können Abstände zwischen zwei Spinmarkierungen ermittelt werden. Die tiefe Temperatur ist notwendig, um die mobilen Spinlabel unbeweglich zu machen. Die Abstände werden im Grundzustand und im angeregten Zustand ermittelt. Weiterhin wird mit dieser Methode die Spinlabelumgebung untersucht. Eine etwaige lichtinduzierte Polaritätszunahme bzw. Abnahme kann direkt aus den Tieftemperaturspektren anhand der sog. Azz-Parameter ermittelt werden.

Die Tieftemperatur ESR-Spektren der Doppel- und Einzelmutanten R34R1-, Y36R1- und L90R1-Seitenketten sind in der Abbildung 3.1.13 dargestellt. Die Messung der Einfachmutanten erfolgt als Kontrolle um etwaige Polaritätsänderungen auszuschließen. Die Tieftemperaturspektren, gemessen im Grundzustand, sind in schwarz und die des angeregten Zustands in orange dargestellt.

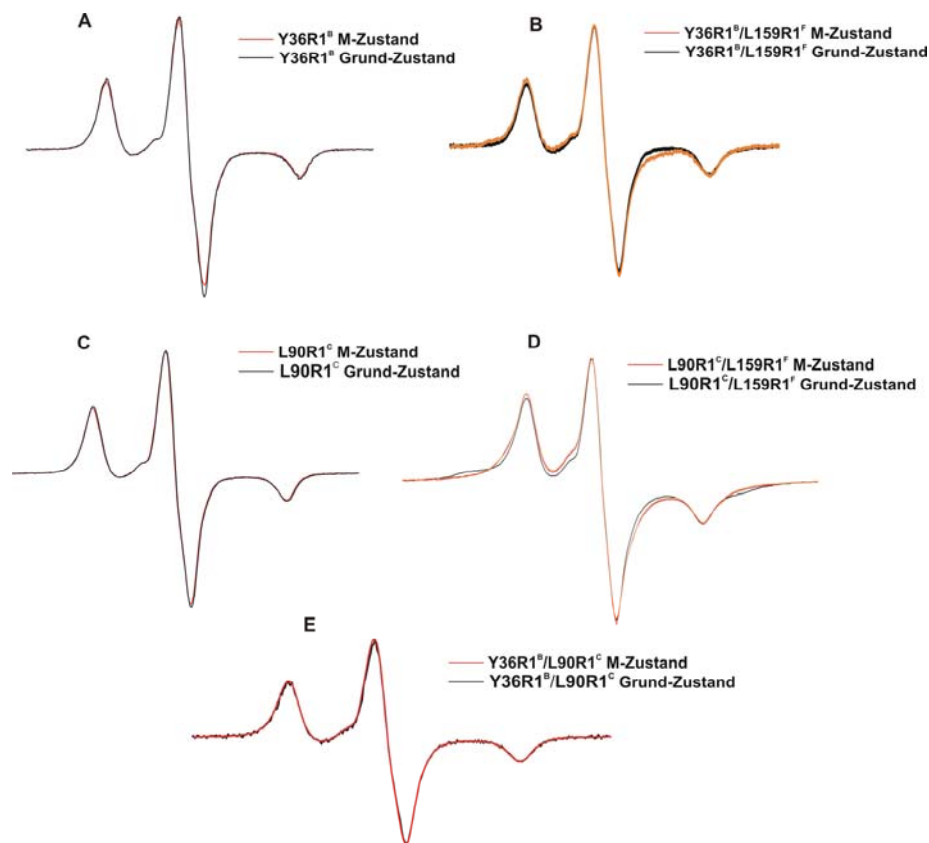


Abb. 3.1.13: Tieftemperatur ESR-Spektren der Doppel- und Einfach-Mutanten R34R1, Y36R1 und L90R1. Die in schwarz dargestellten Spektren stellen den Grundzustand, die in rot dargestellten den angeregten Zustand der Rezeptor-Mutanten dar.

Wie anhand der Spektren der Einfachmutanten deutlich zu sehen ist (Abb. 3.1.13, A und C), unterscheiden sich die Spektren des Grundzustands nicht von denen des angeregten Zustands. Derselbe Effekt ist bei der Y36R1/L90R1-Doppelmutante (Abb. 3.1.13, E) zu beobachten. Der berechnete Abstand zwischen den beiden Spinmarkierungen liegt bei 18 Å.

Die Tieftemperaturspektren von Y36R1/L159R1 (Abb. 3.1.13, B) und L90R1/L159R1 (Abb. 3.1.13, D) im M-Zustand unterscheiden sich von den Spektren im Grundzustand in ihrer Linienbreite. Dies ist ein Hinweis auf eine lichtinduzierte Distanzänderung. Bildet man die erste Ableitung der ESR-Spektren, so kann im Falle einer lichtinduzierten Abstandsänderung eine Linienverbreiterung bzw. –Verengung beobachtet werden. Die entsprechenden Spektren sowie Ableitungen derselben sind in der Abbildung 3.1.14 dargestellt. Bei der Y36R1/L159R1-Doppelmutante (Abb. 3.1.14, links) ist eine Linienverbreiterung zu beobachten. Eine Linienverbreiterung kommt infolge einer Zunahme von dipolaren Wechselwirkungen zwischen zwei Spinlabel zustande. Der berechnete Abstand im Grundzustand beträgt 20 Å. Nach

einer Lichtaktivierung verkleinert sich dieser um 2 Å. Dieses Ergebnis widerspricht zunächst der Theorie einer Aktivierung der TM2-Helix über die Auswärtsbewegung der Helix F, weil sich der Abstand in diesem Fall vergrößern sollte. Die bereits beschriebenen MD-Simulationen jedoch erklären diese Tatsache über die Reorientierung des Spinlabels in Richtung der Helix F (Vgl. Abb. 3.1.11). Somit kann diese Änderung zwar erklärt werden, die Untersuchungen an dieser Mutante können jedoch nicht in die Diskussion über die TM2-Aktivierung einbezogen werden.

Die erste Ableitung der Spektren der L90R1/L159R1-Doppelmutante (Abb. 3.1.14, rechts) zeigt dagegen eine Verengung der Linienbreite, welche aus einer Abnahme der dipolaren Wechselwirkungen zwischen zwei Spinlabel resultiert. Der Abstand bei dieser Mutante vergrößert sich nach einer Lichtaktivierung von 10 Å auf 11 Å. Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie der Auswärtsbewegung der Helix F und stimmt mit der simulierten Position überein.

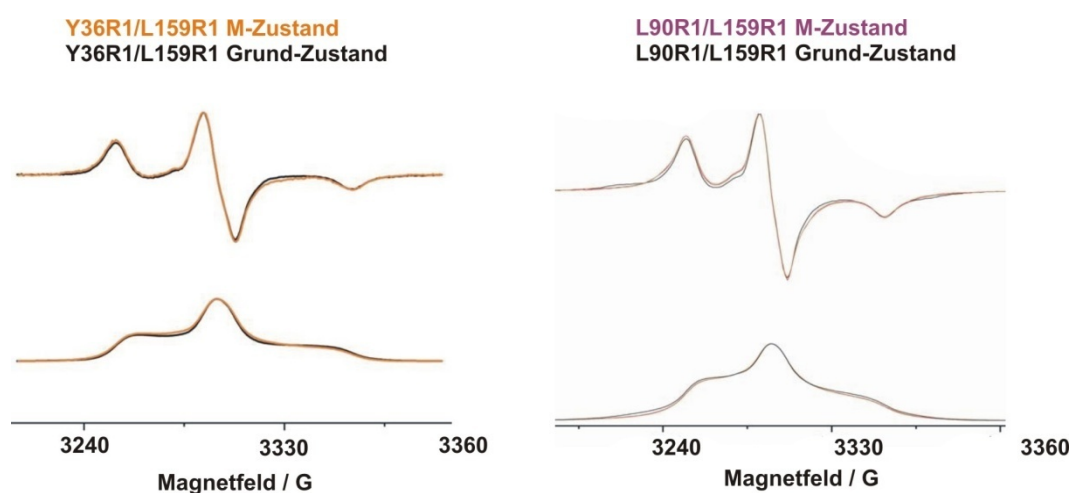


Abb. 3.1.14: Tieftemperaturspektren von Y36R1/L159R1 und L90R1/L159R1 und ihre erste Ableitung. Die Spektren von lichtaktivierten Mutanten sind in orange bzw. in lila, die im Grundzustand in schwarz dargestellt.

Die Tieftemperaturspektren der L89R1-, L159R1-, L213R1-, D75NL89R1-, D75NL159R1- und D75NL213R1-Seitenketten sind in der Abbildung 3.1.15 dargestellt. Die Spektren des Grundzustands sind in schwarz und die des angeregten Zustands in orange dargestellt. Die jeweiligen Spektren der Einzelmutanten werden summiert und mit denen der Doppelmutanten überlagert. Dadurch können Informationen über die Spinlabelumgebung gewonnen werden. Auffällig ist eine Maximumverschiebung im niedrigen B-Feld bei den Mutanten D75NL89R1/L159R1 (Abb. 3.1.15, A), D75NL159R1/L213R1 (Abb. 3.1.15, C) und

L89R1/L213R1 (Abb. 3.1.15, F). Dies deutet auf eine Polaritätsänderung des Spinlabels hin. Die Änderung der Polarität der Spinlabel wird über den so genannten Azz-Parameter dargestellt. Dies äußert sich in einer Verschiebung der Maxima im Niedrigfeldpeak und kann direkt aus den Werten ermittelt werden. Im Fall einer Zunahme der Polarität in der Spinlabelumgebung erhöht sich dieser Wert, bei nichtpolarer Umgebung wird der Azz-Parameter kleiner. Die berechneten Azz-Parameter sowie die Abstände zwischen zwei Spinlabel sind in der Tabelle 3.1.3 dargestellt.

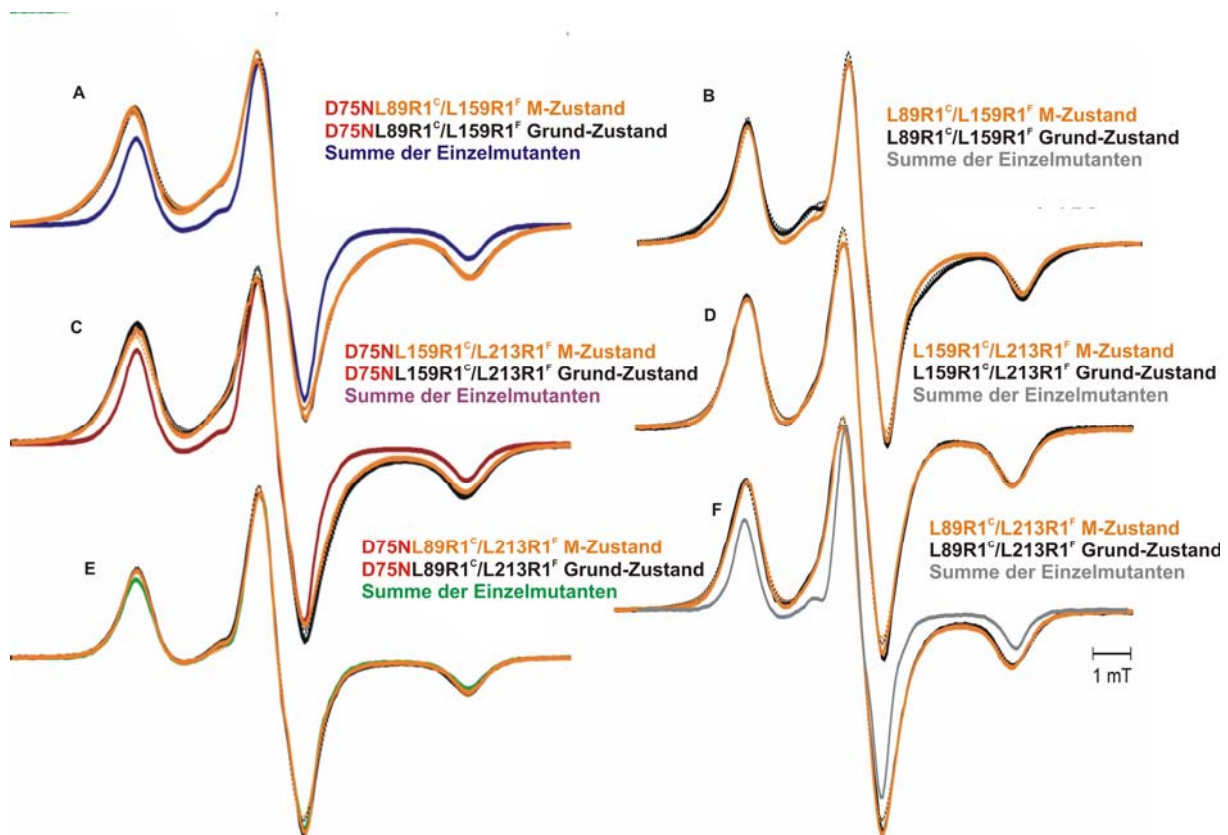


Abb. 3.1.15: Tieftemperatur ESR-Spektren der L89R1-, L159R1-, L213R1-, D75NL89R1-, D75NL159R1- und D75NL213R1-Seitenketten. Die schwarzen Spektren stellen den Grundzustand dar, die orangenen den angeregten Zustand. Die Spektren resultierend aus der Summe der Einzelmutanten sind in grau bzw. farbig dargestellt.

Tab. 3.1.3: Berechnete Abstände und Azz-Änderungen der Doppelmutanten.

Mutanten	Abstände im Grundzustand /nm	Abstände im M-Zustand /nm	ΔA_{zz} / mT
L89R1 ^C /L159R1 ^F	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,2	-0,02 ± 0,02
L159R1 ^F /L213R1 ^G	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0
L89R1 ^C /L213R1 ^G	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0
D75NL89R1 ^C /L159R1 ^F	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,4 ± 0,02
D75NL159R1 ^F /L213R1 ^G	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,2 ± 0,02
D75NL89R1 ^C /L213R1 ^G	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,2	0

Der berechnete Abstand zwischen zwei Spinmarkierungen bei L89R1/L159R1 vergrößert sich nach einer Lichtaktivierung um 0,4 nm. Dabei wird die Umgebung der Spinlabel unpolarer. Der Abstand der analogen D75NL89R1/L159R1-Doppelmutante bleibt dagegen gleich und die Umgebung wird polarer. Die Polarität und die Abstände zwischen den Spinmarkierungen bei L89R1/L213R1 und L159R1/L213R1 ändern sich nicht, wohingegen die Abstände bei den analogen Positionen an der D75N-Mutante sich vergrößern und die Umgebung polarer wird.

3.1.8 Aktivierung der TM2 mit D75N-Mutanten

Die lichtinduzierte Aktivierung der Transducerhelix TM2 erfolgt während des M1-M2-Übergangs. Die ESR-Untersuchungen haben gezeigt, dass nach der Lichtanregung sowohl im Rezeptor, als auch im Transducer Konformationsänderungen stattfinden (Klare *et al.*, 2004). Die Konformationsänderungen des Transducers und des Rezeptors während des M1-M2-Übergangs erfolgen simultan. Anschließend findet eine Entkopplung der beiden Proteine statt. Der aktivierte Rezeptor relaxiert etwa 200 ms schneller in seinen Grundzustand, als der Transducer. Dieses Experiment wurde zur Demonstration der Rezeptoraktivierung mit dem Komplex *NpSRIL159R1/NpHtrII₁₅₇* und der Transduceraktivierung mit dem Komplex *NpSRIL/NpHtrII₁₅₇V78R1* durchgeführt (Klare *et al.*, 2004).

Das M-Intermediat im Rezeptor bildet sich nach der Protonierung der Asparaginsäure 75. Nach dem Austausch der Asparaginsäure gegen Asparagin findet die Protonierung nicht statt, folglich kann das M-Intermediat nicht gebildet werden. Um die Transduceraktivierung ohne das signalgebende M-Intermediat zu

überprüfen, wird das analoge Experiment, wie in Klare et al. beschrieben, mit den spinmarkierten SRIID75N-Mutanten durchgeführt. Die entsprechenden kinetischen Änderungen sind in der Abbildung 3.1.16 dargestellt.

Der Rezeptor-Transducer-Komplex wurde mit Licht angeregt und die Relaxation in den Grundzustand zeitaufgelöst beobachtet. In der Abbildung 3.1.16 (rechts oben) ist der komplette zeitliche Verlauf der Anregung und Relaxation dargestellt. Wichtig für dieses Experiment ist jedoch die Relaxation in den Grundzustand und die mögliche Entkopplungsreaktion, wie bei Klare et al. beschrieben. Daher ist in der Abbildung 3.1.16 der Bereich der Relaxation vergrößert dargestellt.

Die Transientenänderung (Abb. 3.1.16, schwarz) wurde mit dem Komplex *NpSRIID75N/NpHtrII₁₅₇-V78R1* gemessen. Hier befindet sich die Spinmarkierung an der Position V78R1 an dem Transducer. Daher beschreibt diese Transientenänderung die Konformationsänderungen am Transducer. Somit kann die SRIID75N-Mutante analog zu dem Wildtyp den Transducer ohne das signalgebende M-Intermediat aktivieren.

Die konformationellen Änderungen am Rezeptor wurden anhand der Komplexe *NpSRIID75NL159R1/NpHtrII₁₅₇* (Abb.1.3.16, rot), *NpSRIID75NL213R1/NpHtrII₁₅₇* (Abb.1.3.16, grün) und *NpSRIID75NL89R1/NpHtrII₁₅₇* (Abb.1.3.16, blau) beobachtet.

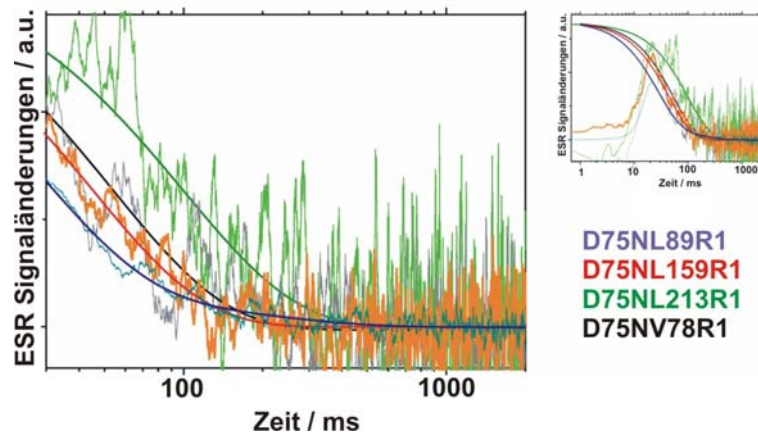


Abb. 3.1.16: Konformationsänderungen des Rezeptor/Transducerkomplexes. ESR-Transientenänderungen für die Rezeptorseitenketten D75NL89R1 (blau), D75NL159R1 (rot), D75NL213R1 (grün) und der Transducerseitenkette V78R1 (schwarz).

Insbesondere wird hierbei auf die Relaxation in den Grundzustand im Vergleich zum Transducer (Abb. 3.1.16, schwarz) geachtet. Die Relaxation in den Grundzustand bei der *NpSRIID75NL159R1*-Mutante (Abb.1.3.16, rot) erfolgt im Gegensatz zur

NpSRIIL159R1-Mutante (Klare *et al.*, 2004) simultan mit dem Transducer. Derselbe Effekt ist bei der *NpSRIID75NL213R1*-Mutante (Abb.1.3.16, grün) zu beobachten. Die *NpSRIID75NL89R1*-Mutante (Abb.1.3.16, blau) verhält sich analog zur *NpSRIIL159R1*-Mutante, wie in Klare *et al.* beschrieben. Diese Mutante relaxiert schneller in den Grundzustand als der Transducer.

3.2 ESR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung der HAMP-Domäne

Bei der Signaltransduktion werden, durch die lichtinduzierte Konformationsänderungen des Rezeptors, Signale an den Transducer weitergeleitet. Der Transducer reguliert die zellulären Vorgänge indem er die empfangenen Signale ins Zellinnere vermittelt. Anhand der Kristallstruktur des Rezeptor-Transducer-Komplexes *NpSRII/NpHtrII₁₅₇* sind Daten über die Sekundärstruktur des transmembranen Teils des Transducers bis Position 82 vorhanden (Gordeliy *et al.*, 2002). Die Sekundärstruktur des zytoplasmatischen Teils des Transducers ist bislang nicht vollständig bekannt.

Anhand von Untersuchungen der Primärstruktur des Transducers (Seidel *et al.*, 1995; Wegener, 2000; Klare, 2003) ist eine Homologie zu den bakteriellen Chemorezeptoren festgestellt worden. Aus dieser Homologie können partiell Sekundärstrukturen des Transducers vorausgesagt werden. Das Sequencealignment (Abb. 3. 2.1) zeigt zum Teil deutliche Übereinstimmungen in der Sequenz zwischen den Transducerproteinen *HsHtrII* und *NpHtrII* und den Chemorezeptoren Tsr und Tar.

auf, wird aber dann α -helikal fortgeführt. Ab der Position 240 beginnt die erste Methylierungsdomäne von *NpHtrII*. Im Sequenzbereich von 240-280 findet sich, im Einklang mit Le Moual und Koshland, das „Vier-Helix-Bündel“, das in Homologie zu den Chemorezeptoren steht.

Basierend auf Primärstrukturhomologien besteht die HAMP-Domäne aus zwei helikalen amphipathischen Sequenzbereichen (AS1 und AS2), welche durch den *Connector* unbekannter Struktur verbunden sind (Bordignon *et al.*, 2005). Die HAMP-Domäne ist für die Weiterleitung der von dem Rezeptor empfangenen Signale essentiell. Bereits ein Komplex mit dem verkürzten Transducer *NpHtrII*₁₁₄ reicht aus, um das Pumpen von Protonen des Rezeptors zu blockieren. Der für die Inhibierung des Protonenpumpens verantwortliche Bereich ist an dem Transducer in der *Connector*-Region lokalisiert (Bordignon *et al.*, 2005). Nach der lichtinduzierten Signalübertragung von dem Rezeptor, erfährt der Transducer konformationelle Änderungen in Form einer Rotation um 15° der TM2-Helix (Klare *et al.*, 2004; Moukhametzianov *et al.*, 2006). Wie die Signalweiterleitung fortgeführt wird und welche strukturellen Änderungen im Bereich der HAMP-Domäne erfolgen ist bislang noch nicht geklärt. Daher ist die Aufklärung der Struktur der HAMP-Domäne von größter Bedeutung, um die zellulären Prozesse in der Signaltransduktion zu verstehen.

3.2.1 Auswahl der Positionen für die Spinmarkierungen

Wie bereits beschrieben, ist es für die ESR-Untersuchungen notwendig, die interessanten Positionen am Protein durch Cysteine zu ersetzen. Da es sich bei der HAMP-Domäne um einen flexiblen Bereich des Transducers handelt, muss die Sequenz möglichst komplett erschlossen werden. In Rahmen seiner Dissertation hat Wegener die relative Orientierung der Transducerhelices mittels ESR-Spektroskopie weitestgehend aufgeklärt (Wegener, 2000). Dazu wurden von Wegener die Transducerpositionen 78-87 durch Cysteine ersetzt und ESR-spektroskopisch untersucht. Aufbauend auf den Ergebnissen von Wegener wurden von Klare die Positionen 88-101, 104-106 und 115-116 untersucht (Klare, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit werden die von Wegener und Klare erschlossenen Erkenntnisse über die Struktur, Mobilität und Orientierung des Transducers im Bereich der HAMP-Domäne weitergeführt. Dazu werden folgende Positionen untersucht:

- *NpHtrII*₁₅₇-G118R1
- *NpHtrII*₁₅₇-A122R1
- *NpHtrII*₁₅₇-A148R1

Die spinmarkierten Positionen sind in der Abbildung 3.2.2 schematisch dargestellt. Die Seitenkette *NpHtrII*₁₅₇-G118R1 ist die flankierende Aminosäure zwischen dem *Connector* und der zweiten amphipatischen Helix AS2. Die *NpHtrII*₁₅₇-A122R1-Seitenkette befindet sich im Bereich von AS2 und die *NpHtrII*₁₅₇-A148R1 ist am Ende der HAMP-Domäne lokalisiert. Die Mutationen *NpHtrII*₁₅₇-A88R1 und *NpHtrII*₁₅₇-L93R1 befinden sich in der AS1-Sequenz.

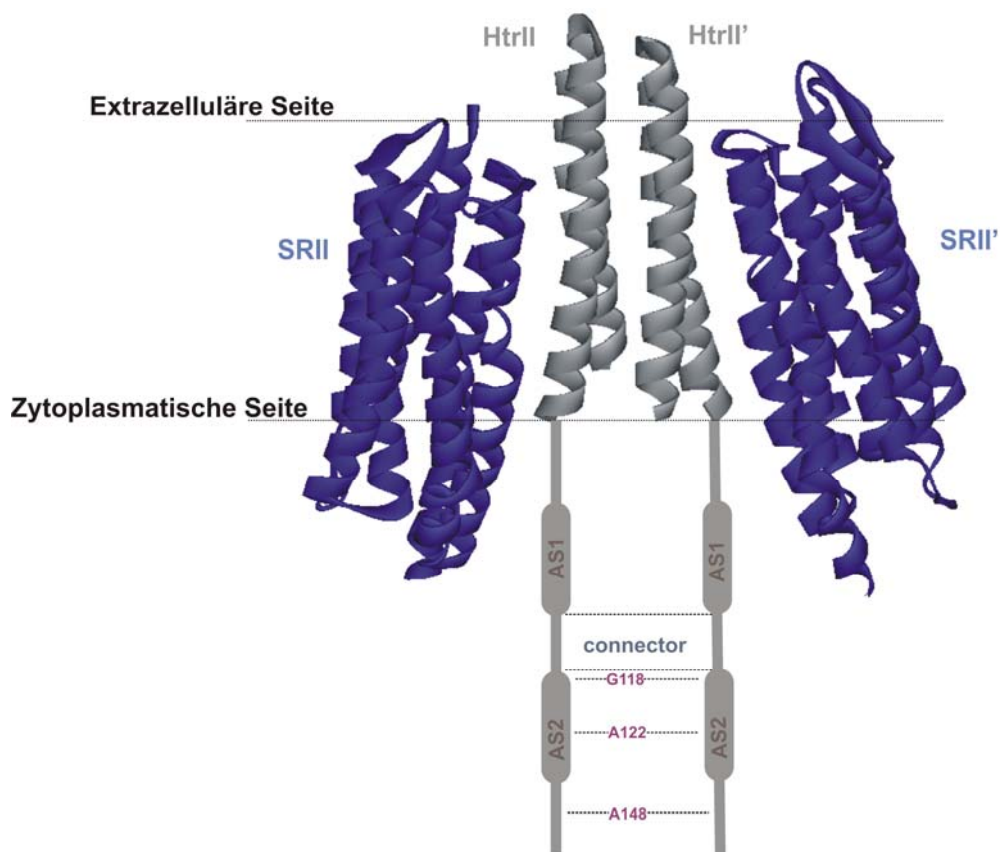


Abbildung 3.2.2: Schematische Darstellung des zytoplasmatischen Bereichs des Transducers. Die eingezeichneten Positionen wurden mit Spinlabel markiert. Die Struktur des 2:2 Rezeptor-Transducer-Komplexes basiert auf der Kristallstruktur [1H2S]. Die gestrichelten Linien um den Komplex markieren die Grenzen der Membran.

Frühere ESR-Untersuchungen (Bordignon *et al.*, 2005) haben gezeigt, dass die Dynamik und die Struktur der Seitenketten stark von der Salzkonzentration abhängt. Die Hochsalzbedingungen (bis zu 4 M NaCl), welche der natürlichen Umgebung der halophilen Bakterien entsprechen, sind für die Stabilität und Funktion der HAMP-Domäne wichtig. Die vorhergesagten α -helikalen Strukturen der Teilbereiche des Transducers sind nur unter Hochsalzbedingungen gültig. Bei Niedrigsalzbedingungen liegt die sog. *molten-globule*-Struktur vor (Bordignon *et al.*, 2005). Bei der *molten-globule*-Struktur handelt es sich um eine flexible teils ungeordnete Sekundärstruktur, die oft als Übergangsstruktur zwischen der ungefalteten und gefalteten Struktur gebildet wird (Pande & Rokhsar, 1998).

Das Augenmerk der ESR-Strukturuntersuchungen an den Spinmarkierungen wird daher besonders auf die Salzabhängigkeit der Struktur des Transducers gelegt.

3.2.2 Expression und Aufreinigung der Transducermutanten

Die Expression und Aufreinigung der Transducermutanten erfolgt, wie in Kapitel 2.5 beschrieben. Die Aufreinigung wird über die Ni-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt und wird mittels SDS-Gelelektrophorese (Vgl. Abb. 3.1.4) kontrolliert. Die Proteinkonzentration wird nach der von Ehresmann entwickelte Methode über die Absorption bei 228,5 nm und 234,5 nm bestimmt (Vgl. Gl.3) (Ehresmann *et al.*, 1973). Die typischen Ausbeuten von Transducermutanten liegen zwischen 10-13 mg/L_{Kultur}. Das Molekulargewicht beträgt 17,2 kDa (Vgl. Abb. 3.1.4).

3.2.3 Raumtemperatur ESR-Untersuchungen der Transducermutanten

Alle Raumtemperatur-ESR-Spektren der Transducermutanten wurden im Komplex mit dem Rezeptor, rekonstituiert in PM-Lipide, gemessen. Die spinmarkierten Mutanten *NpHtrII*₁₅₇-G118R1, *NpHtrII*₁₅₇-A122R1 und *NpHtrII*₁₅₇-A148R1 wurden in Abhängigkeit der Salzkonzentration gemessen. Die entsprechenden Spektren sind in Abbildung 3.2.3 dargestellt. Die RT-ESR-Spektren (Abb. 3.2.3, schwarz) sind bei 150 mM NaCl-Konzentration und bei 3.5 M NaCl-Konzentration (Abb. 3.2.3, grün) aufgenommen worden. Bei allen drei Mutanten ist unter Niedrigsalzbedingungen (150 mM NaCl) eine starke Mobilität des Spinlabels zu detektieren. Vergleicht man

die RT-ESR-Spektren unter Niedrigsalzbedingungen mit denen bei einer 3,5 M NaCl-Konzentration aufgenommenen Spektren (Abb. 3.2.3, grün), so sind starke Mobilitätsänderungen festzustellen.

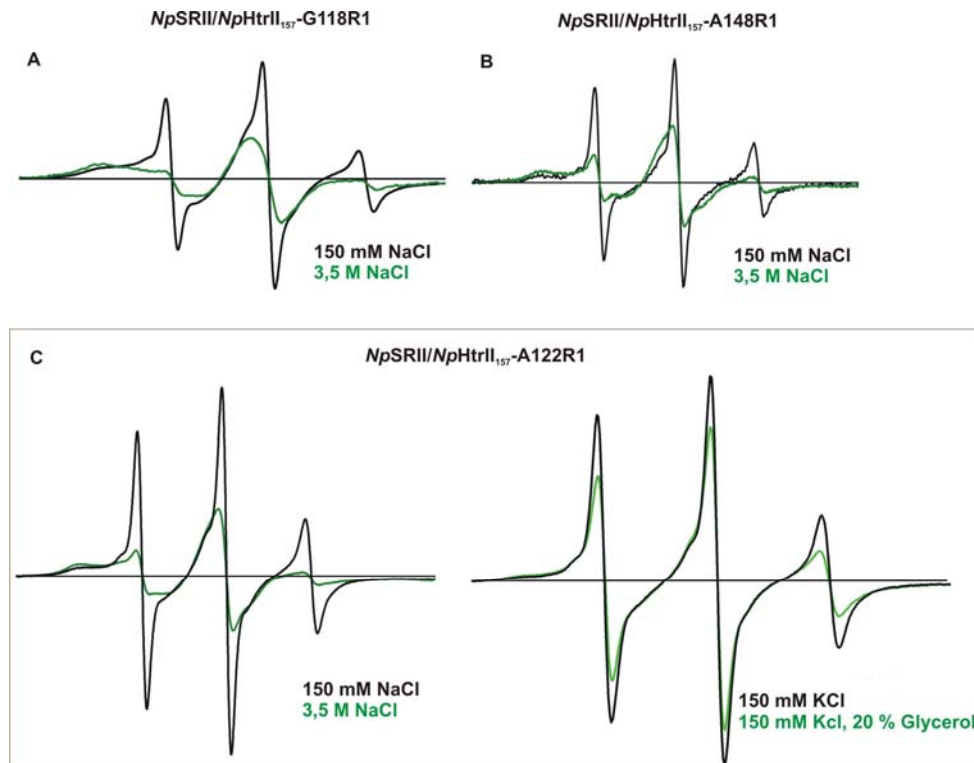


Abb. 3.2.3: RT-ESR-Spektren der Transducerseitenketten G118R1 (A), A148 R1 (B) und A122 (C, links) in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Die Spinmarkierung A122R1 ist ebenso in Gegenwart von 20 % Glycerin (C, rechts) vermessen. Alle Spektren sind bei RT im Komplex mit dem Rezeptor, rekonstituiert in PM-Lipide, aufgenommen worden.

Die Seitenkette G118R1 (Abb. 3.2.3, A, schwarz) weist bei einer 150 mM NaCl-Konzentration ein ESR-Spektrum mit ausgeprägtem mobilem Anteil auf. Die Mobilität unter Hochsalzbedingungen (Abb. 3.2.3, A, grün) ist dagegen stark eingeschränkt. Bei einer Erhöhung der Ionenstärke werden hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Besonders ist dieser Effekt bei Aminosäuren, die sich in einer räumlichen Nähe zu einander befinden, zu beobachten, wie z.B. im Falle einer *coiled-coil*-Struktur.

Die Spinmarkierungen A148R1 (Abb. 3.2.3, B) und A122R1 (Abb. 3.2.3, C, links) sind unter Niedrigsalzbedingungen deutlich mobiler als bei der G118R1-Mutante. Eine Einschränkung in der Mobilität unter Hochsalzbedingungen ist jedoch auch an diesen Seitenketten zu beobachten. Anders als bei der G118R1-Seitenkette überwiegen bei

A148R1 und A122R1 auch bei hohen Salzkonzentrationen die mobilen Komponenten im ESR-Spektrum.

Die Einschränkung der Mobilität ist jedoch ausschließlich auf die Einwirkung der Salzkonzentration zurückzuführen. Wie am Beispiel der A122R1-Seitenkette gezeigt (Abb. 3.2.3, C, rechts), wird die Mobilität der Seitenketten bei einer Erhöhung der Viskosität durch Zugabe von 20 % Glycerin kaum beeinflusst.

Um die dynamischen Eigenschaften der Seitenketten zu charakterisieren sind ebenfalls am Beispiel der A122R1-Seitenkette RT-ESR-Spektren unter Hoch- und Niedrigsalzbedingungen in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Harnstoff aufgenommen worden. Der Harnstoff hat eine denaturierende Wirkung auf die Proteine. Somit ist es in Gegenwart von 6 M Harnstoff-Lösung zu erwarten, dass die Sekundärstruktur der Proteine beeinflusst wird. Wie bereits oben beschrieben, weist die A122R1-Seitenkette bei 150 mM NaCl eine hohe Mobilität auf (Abb. 3.2.4, links, schwarz). Titriert man zu der Proteinlösung 6 M Harnstoff, so ist eine leichte Erhöhung der Mobilität zu beobachten (Abb. 3.2.4, links, grau). Dieselbe Reaktion durchgeführt unter Hochsalzbedingungen zeigt den gleichen Effekt, jedoch mit viel geringerer Intensität (Abb. 3.2.4, rechts). Vergleicht man die Mobilität der nativen Seitenkette bei Niedrigsalzbedingungen in Abwesenheit von Harnstoff mit der bei Hochsalzbedingungen in Gegenwart von Harnstoff, so ist die erste viel ausgeprägter. Daraus lässt sich schließen, dass die Struktur des Transducers bei einer 150 mM NaCl-Konzentration stärker entfaltet ist, als in 6 M Harnstofflösung unter Hochsalzbedingungen.

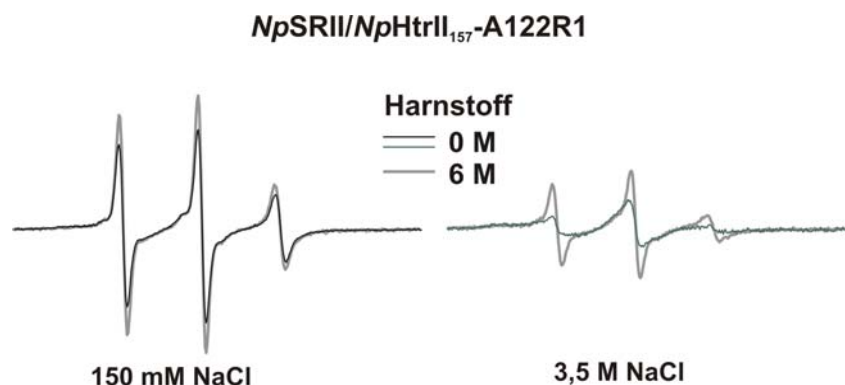


Abb. 3.2.4: RT-ESR-Spektren der A122R1-Seitenkette. Links: RT-ESR-Spektren bei 150 mM NaCl-Konzentration in Gegenwart von 6 M Harnstoff (grau) und Abwesenheit von Harnstoff (schwarz). Rechts: RT-ESR-Spektren bei 3,5 M NaCl-Konzentration in Gegenwart von 6 M Harnstoff (grau) und Abwesenheit von Harnstoff (schwarz). Alle Spektren sind im Komplex mit dem Rezeptor, rekonstituiert in PM-Lipide, aufgenommen worden.

3.2.4. Tieftemperatur ESR-Untersuchungen der Transducermutanten

Um die Interspin-Abstände der Mutanten A122R1 zu ermitteln, sind TT-ESR-Spektren in Abhängigkeit von der Salzkonzentration aufgenommen worden. Das entsprechende Spektrum im Komplex mit dem Rezeptor *NpSRII* ist in der Abbildung 3.2.5 dargestellt.



Abb. 3.2.5: TT-ESR-Spektrum von *HtrIIA122R1* in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Das Spektrum in Schwarz dargestellt wurde bei 150 mM KCl und das in Grün bei 2 M KCl unter Zugabe von 20 % Glycerol aufgenommen.

Das TT-ESR-Spektrum (Abb. 3.2.5, schwarz) stellt die Messung unter Niedrigsalzbedingungen dar (150 mM KCl). Zu dem Spektrum unter Hochsalzbedingungen (Abb. 3.2.5, grün) sind zusätzlich 20 % Glycerinlösung beigefügt, um die Viskosität zu erhöhen. Dies ist aus technischen Gründen notwendig, da sich die Proteinprobe bei hoher Salzkonzentration und tiefen Temperaturen sehr stark ausdehnt und die Messkapillare zum Platzen bringen kann. Eine Salzabhängigkeit bei tiefen Temperaturen scheint jedoch nicht vorhanden zu sein, wie es anhand der Spektren (Abb. 3.2.5) zu sehen ist. Beide Spektren deckungsgleich und der ermittelte Interspin-Abstand beträgt 2.0 nm.

3.3 Expressed Protein Ligation von Transducerfragmenten

Das Interesse an Herstellung von semisynthetischen Proteinen ist letzter Zeit stark gestiegen. Mit den semisynthetisch hergestellten Proteinen eröffnen sich die Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikation der Proteine, selektiver

Markierung oder Phosphorylierung einzelner Aminosäuren, Isotopenmarkierung von Proteinsegmenten oder der Einführung unnatürlicher Aminosäuren. Die Methode der *Native Chemical Ligation* (NCL) (Dawson et al., 1994) beschreibt die Herstellung von zwei an der festen Phase (SPPS, **solide phase peptide synthesis**) hergestellten Peptiden oder Proteinsegmenten, die sich zu einer nativen Peptidbindung verknüpfen lassen. Mit der NCL lassen sich jedoch nur kleine Proteine (bis 15 kDa) oder Proteindomänen semisynthetisch herstellen (Muir et al., 1998). Die Weiterentwicklung der NCL stellt die *Expressed Protein Ligation* (EPL) dar. Dabei werden ein Teil oder beide Proteinsegmente exprimiert und anschließend zu einer nativen Peptidbindung verknüpft. Dadurch lassen sich große Proteine semisynthetisch herstellen und modifizieren. Für eine chemische Ligation ist ein C-terminaler Aktivthioester und ein N-terminales Cystein erforderlich (Abb.3.3.1). Der Thioester kann chemisch an der festen Phase oder rekombinant durch Intein-fusionstechnologie hergestellt werden. Das Intein lässt sich mit verschiedenen Thiolen durch eine posttranslationale autokatalytische Reaktion, die als Spleißen bezeichnet wird (Perler & Bartl, 2000; Xu & Evans, 2001), abspalten, wobei der C-terminale Thioester gebildet wird. Inteine sind natürlich vorkommende Proteinsegmente, die ursprünglich aus Eubakterien und Archaeobakterien isoliert wurden. Zurzeit sind mehr als 100 Inteine identifiziert worden (Perler et al., 2000).

Der allgemeine Mechanismus des Inteinspleißens sowie der nativen chemischen Ligation ist in Abbildung 3.3.1 schematisch dargestellt. Während des Spleißens erfolgt zunächst eine intramolekulare N-S-Acyl-Umlagerung, wobei ein intermediärer Thioester entsteht. Durch nukleophilen Angriff des Thiols erfolgt eine Abspaltung des Inteins unter Generierung eines entsprechenden Aktivthioesters am Protein. C-terminale Peptide bzw. Proteinsegmente lassen sich ebenfalls synthetisch mittels Festphasensynthese (SPPS) oder rekombinant herstellen. Rekombinante Peptide werden so kloniert, dass zwischen dem Affinitätstag und dem N-terminalen Cystein eine Protease-Schnittstelle eingebaut ist. Nach der Expression und Aufreinigung wird das Peptid durch Proteaseverdau vom Affinitätstag getrennt. Die eigentliche Ligation erfolgt durch den nukleophilen Angriff der Seitenkette des Cysteins des N-terminalen Peptids auf das Carbonyl-C-Atom des Thioesters. Zunächst entsteht ein intermediärer Thioester, welcher sich durch eine spontane Reaktion in eine native Peptidbindung umlagert (S-N-Acyl-Umlagerung).

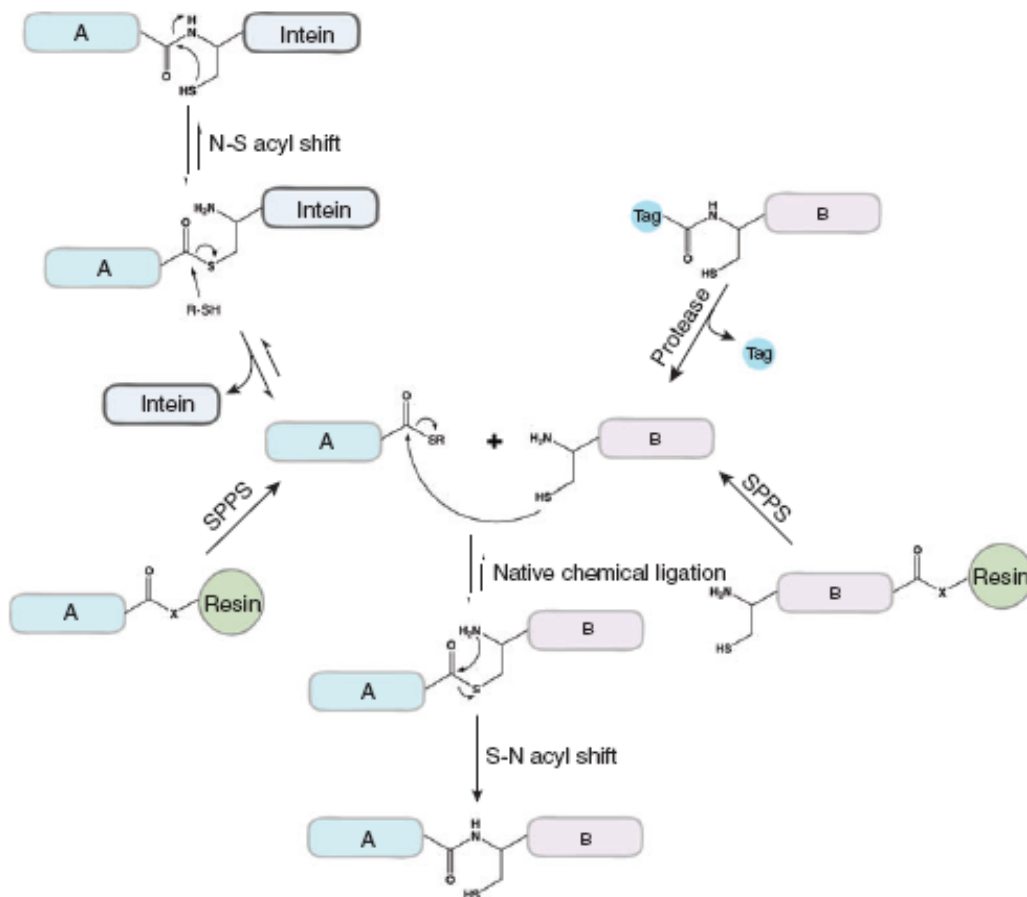


Abb. 3.3.1: Das Prinzip des Inteinspleißens und der nativen chemischen Ligation. Das Fragment A wird als Inteinfusionskonstrukt exprimiert bzw. an der festen Phase (SPPS) synthetisiert. Das Intein kann durch unterschiedliche Thiole abgespalten werden unter Generierung eines entsprechenden Thioesters. Das Fragment B enthält ein N-terminales Cystein. Dieses Fragment kann ebenfalls als Fusionsprotein mit entsprechenden Affinitätstag exprimiert werden, welcher sich durch eine Protease abspalten lässt, oder mittels Festphasensynthese hergestellt werden. Durch eine native chemische Ligation werden die beiden Fragmente zu einer Peptidbindung verknüpft (Muralidharan & Muir, 2006).

Der Vorteil einer semisynthetischen Proteinherstellung besteht darin, dass die Ligation, je nach Proteinbeschaffenheit, in unterschiedlichen Medien durchgeführt werden kann. Am häufigsten erfolgt die Ligation im wässrigen Medium (Muir *et al.*, 1998; Severinov & Muir, 1998; Hauser & Ryan, 2007) oder unter denaturierenden Bedingungen wie z.B. in 6 M Gdn·HCl (Hackeng *et al.*, 1999; Muralidharan *et al.*, 2006). Die Ligation von löslichen Proteinen ist größtenteils etabliert. Eine Ligation unter denaturierenden Bedingungen hat den Nachteil, dass die Proteine anschließend zurückgefaltet werden müssen. Weitaus anspruchsvoller ist die Ligation von Membranproteinen. Viele hydrophobe Peptide ligieren ineffizient (Kochendoerfer *et al.*, 2005), sie lösen sich nicht im wässrigen Medium oder prä-

zipitieren. Um die Löslichkeit der Membranproteine zu erhöhen sind Zusätze, wie Detergentien oder Lipide notwendig. Diese können jedoch bei der Ligationsreaktion stören. Somit stellt die EPL-Methode von Membranproteinen zur Zeit noch eine Herausforderung dar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei Transducerkonstrukte unter Anwendung der *Expressed Protein Ligation* hergestellt werden. Der transmembrane Part (HtrII1-94) des Transducers wird als inteinfusioniertes Protein kloniert. Die zytoplasmatischen Teile (HtrII95-114) und (HtrII95-157) werden als GST-TEV-HtrII-Fusionskonstrukte exprimiert, welche durch den TEV-Protease-Verdau gespalten werden. Nach der Ligation sollen die Ligationsprodukte auf ihre Funktionalität hin überprüft werden.

3.3.1 Klonierungsstrategie von Transducersegmenten

Für die Klonierung des Thioesters wird das GyraseA MXE-Intein verwendet. Dieses Gen aus *Mucobacterium xenopi* befindet sich bereits auf dem käuflich erwerblichen Expressionsvektor pTXB1. Der MXE-Sequenz folgend befinden sich ebenso ein 6x-His-Affinitätstag und die CBD (*chitin binding domain*) auf diesem Vektor. Laut Schiffer (Schiffer Eric, 2005) stört die CBD bei der Expression des Transducers. Das Protein wird bei der Expression etwa zu 50 % in *inclusion bodies* exprimiert und zu 50 % in die Membran eingebaut. Daher wird vor der Verwendung des Vektors die CBD durch die Einführung von zwei Stop-Codons (2x TGA) nach dem His-Tag eliminiert. Die Amplifizierung des Transducergens erfolgt aus dem Vektor pRPS1 unter Verwendung der in Kapitel 2.3.3 angegebenen Primer. Die PCR-Amplifikate sowie der pTXB1-Vektor werden mit den Enzymen NdeI und SapI verdaut und anschließend ligiert. Bei der Ligaton schneidet sich die SapI-Schnittstelle heraus. Der resultierende Vektor pTXB1-HtrII1-94-MXE-His, welcher nun das Fusionskonstrukt enthält, wird in die BL21(DE3)-Zellen transformiert (Abb.3.3.2).

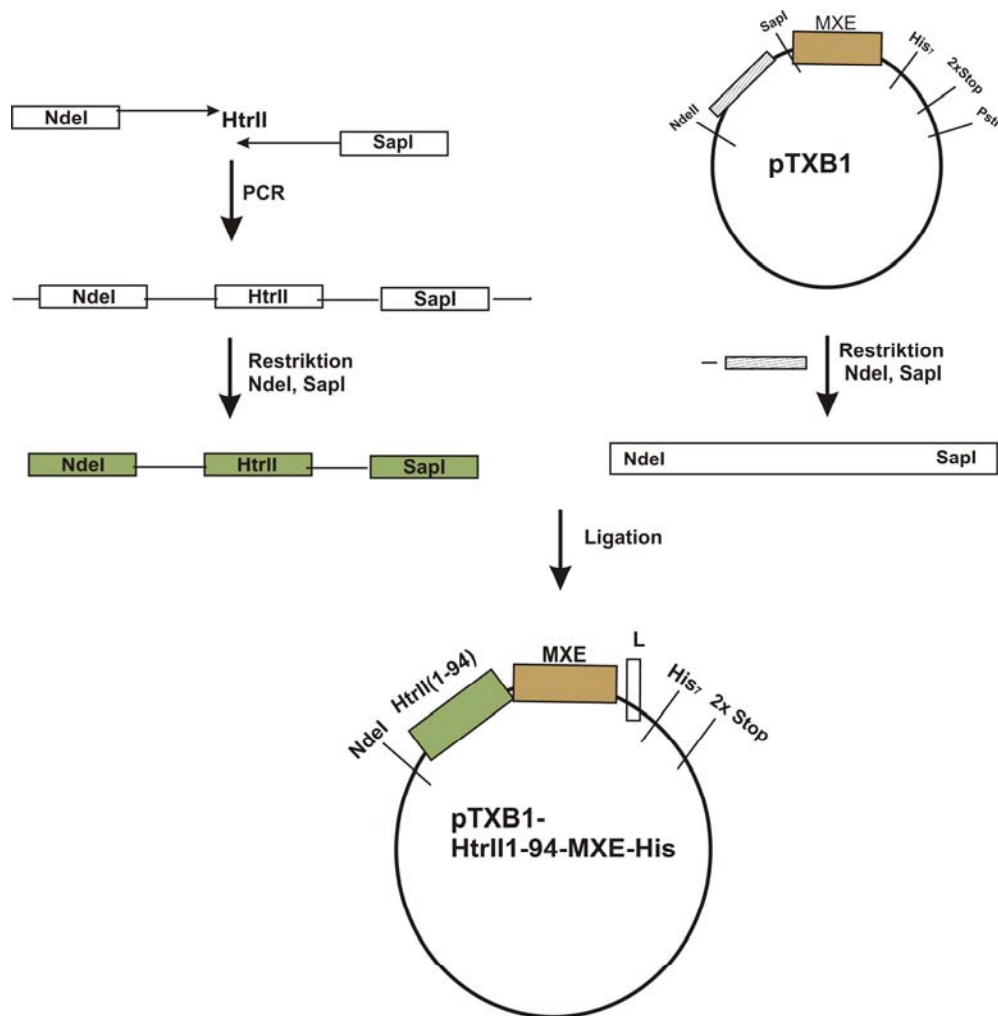


Abb. 3.3.2: Klonierungsstrategie des pTXB1-HtrII1-94-MXE-His-Fusionskonstrukts

Für die Klonierung der Transducerfragmente HtrIIA95C-114 bzw. HtrIIA95C-157 wird der käuflich erwerbliche Vektor pGEX2T verwendet. Auf diesem Vektor befindet sich bereits das Gen für die GST (*glutathione S-transferase* aus *Schistosoma japonicum*), welche als Aufreinigungstag für Glutathion-Sepharose verwendet wird. Zwischen dem GST-Tag und dem HtrII-Gen wird eine TEV-Protease-Schnittstelle (ENLYFQ) eingebaut. Die TEV-Protease-Schnittstelle wird durch Annealing mit BamHI- und TspRI-Schnittstellen hergestellt (Abb.3.3.3). Das entsprechende Gen für HtrII beginnend bei HtrII-K96 wird aus dem Vektor pRPS1 mit den Enzymschnittstellen TspRI und EcoRI amplifiziert. Der pGEX2T-Vektor wird nun mit den Enzymen BamHI und EcoRI geschnitten. Anschließend werden Annealing, PCR-Amplifikat und linearisierter Vektor in einem Schritt miteinander ligiert. Die resultierenden Vektoren pGEX2T-GST-TEV-HtrIIA95C-114 bzw. pGEX2T-GST-TEV-HtrIIA95C-157 werden in BL21-Zellen transformiert.

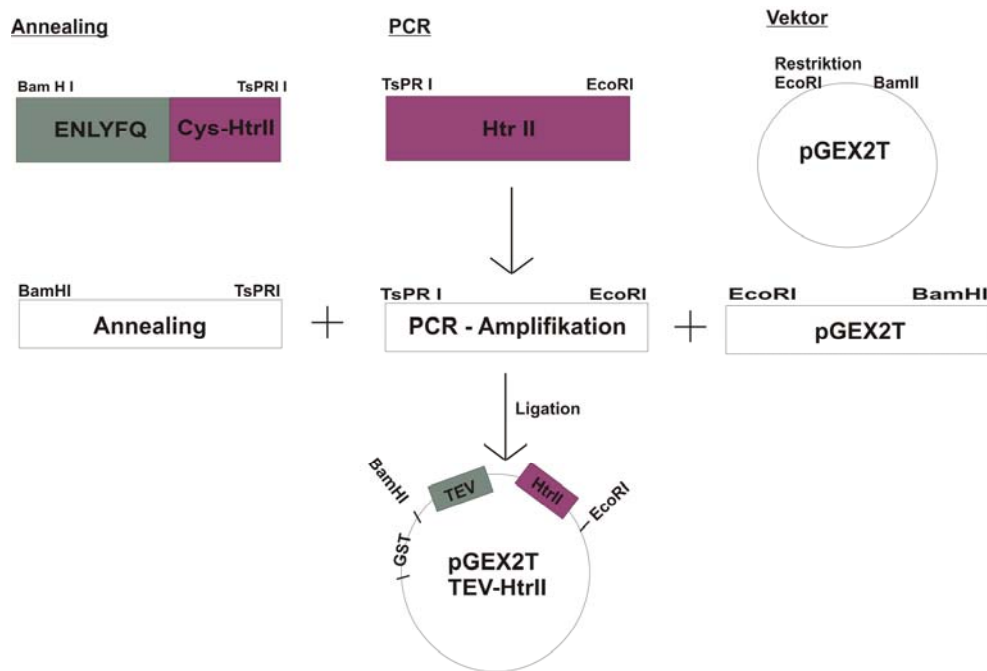


Abb. 3.3.3: Klonierungsstrategie von *pGEX2T-GST-TEV-HtrIIA95C-114* bzw. *pGEX2T-GST-TEV-HtrIIA95C-157*.

3.3.2 Expression und Aufreinigung des Fusionskonstrukts HtrII1-94-MXE-His

Die Expression des HtrII1-94-MXE-His-Fusionskonstrukts erfolgt bei 37°C in LB-Medium. Das Gen besitzt eine Ampicillin-Resistenz, welches in einer Konzentration von 100 mg/L dem Medium zugegeben wird. Die Kultur wird auf eine OD von 0,1 angeimpft. Bei einer optischen Dichte von 1 wird die Expression mit 0.5 mM IPTG induziert. Nach 3-4 h werden die Zellen geerntet. Das Fusionsprotein wird bei der Expression vollständig in die Membran eingebaut. Zellaufschluss und Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie erfolgen, wie in Kapitel 2.5 beschrieben. Die Kontrolle der Aufreinigungseffizienz erfolgt mittels SDS-PAGE (Abb. 3.3.4). Für Membranproteine wird grundsätzlich die von Schägger & Jagow (1987) entwickelte Methode verwendet (Vgl. Kap. 2.6.1). Das berechnete Molekulargewicht des HtrII1-94-MXE-His-Fusionskonstruktes beträgt 32 kDa. Die durchschnittliche Proteinausbeute liegt bei 11 mg/L_{Kultur}. Nach der Aufreinigung wird das Protein gegen Puffer G (Vgl. Kap. 2.5.2) dialysiert.

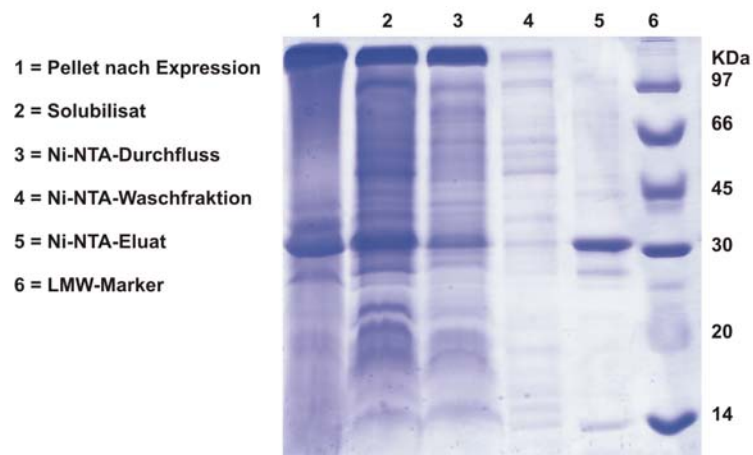


Abb. 3.3.4: SDS-Gel zur Aufreinigungskontrolle des *HtrII1-94-MXE-His-Fusionskonstrukts*. Die errechnete Masse beträgt 32 kDa.

Das SDS-Gel in der Abbildung 3.3.4 zeigt die Chronologie der Aufreinigung des *HtrII1-94-MXE-His-Fusionskonstrukts* nach der Expression bis zur Ni-NTA-Elution. Die erste Spur im Gel beschreibt das Pellet nach dem Zellaufschluss. Bei der prominenten Bande handelt es sich um das Zielprotein. Dieses wird mit detergentzhaltiger Lösung aus dem Pellet solubilisiert (Abb. 3.3.4, Spur 2). Die dritte Spur beschreibt den Ni-NTA-Durchfluss und die vierte die Waschfraktion. In der fünften Spur ist das aufgereinigte Fusionsprotein aufgetragen. Neben dem Zielprotein sind noch einige Proteinbanden im Ni-NTA-Eluat (Abb. 3.3.4, Spur 5) zu sehen. Wie es Anhand der Aufreinigungschronologie zu sehen ist, sind diese Banden bereits im Pellet (Abb. 3.3.4, Spur 1) als auch im Solubilisat (Abb. 3.3.4, Spur 2) und im Durchfluss (Abb. 3.3.4, Spur 3) zu sehen. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Proteine, die coexprimiert wurden. Da es sich bei der Ni-NTA-Affinitätschromatographie um eine Affinität zu natürlichen Aminosäure Histidin handelt, ist es wahrscheinlich, dass die Verunreinigungsproteine ebenfalls einige Histidine in ihrer Sequenz haben und ebenfalls an die Ni-NTA-Beads binden.

3.3.3 Expression und Aufreinigung des Fusionskonstrukts GST-TEV-

HtrIIA95C-114

Die Expression des GST-TEV-HtrIIA95C-114 erfolgt bei 37°C in Minimalmedium (Vgl. Kap. 2.5). Die Kultur wird mit Ampicillin (100 mg/L) versetzt und auf eine optische Dichte von 0,1 angeimpft. Bei einer OD von 1 - 1,5 werden die Zellen mit

0,5 mM IPTG induziert und 4 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend werden die Zellen geerntet. Der Zellaufschluss erfolgt wie in Kapitel 2.5 beschrieben.

Die Aufreinigung des GST-TEV-HtrIIA95C-114-Konstrukts erfolgt mittels GSH-Sepharose, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben. Das SDS-Gel, welches in der Abbildung 3.3.5 dargestellt ist, beschreibt die Aufreinigungschronologie des GST-TEV-HtrIIA95C-114-Konstrukts. In der ersten Spur ist die lösliche Fraktion nach dem Zellaufschluss aufgetragen. Die lösliche Fraktion, welche außer dem Zielprotein noch viele weitere Proteine enthält, wird auf die GSH-Säule aufgetragen. Der Durchfluß (Spur 2) enthält alle Proteine, die nicht an der Säule binden. Die GSH-Säule bindet GST hochspezifisch, daher ist in den GSH-Eluaten (Spuren 3 und 4) nur GST-TEV-HtrIIA95C-114 zu detektieren. Das GSH-Eluat wird mit Hilfe von Ultrafiltrationseinheiten (30_{cut-off}) ankonzentriert und die Konzentration über die Absorption der aromatischen Aminosäuren bei A₂₈₀ nm bestimmt. Die berechnete Masse für das GST-TEV-HtrIIA95C-114-Konstrukt beträgt 29,4 kDa. Der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm beträgt $\epsilon_{280} = 44600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

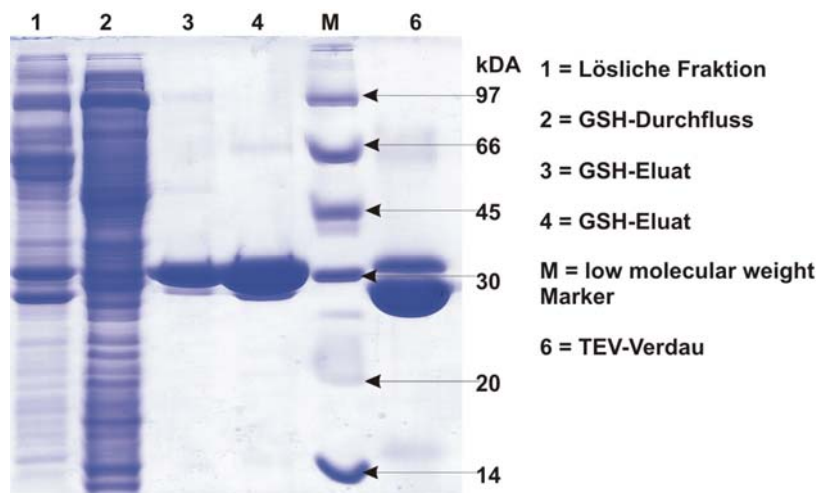


Abb. 3.3.5: SDS-Gel zur Kontrolle der GSH-Aufreinigung sowie des TEV-Protease-Verdaus des GST-TEV-HtrIIA95C-114-Fusionskonstrukts. Die erste Spur zeigt die lösliche Fraktion nach Zellaufschluss, die zweite den GSH-Durchfluss, die dritte die GSH-Waschfraktion und die vierte das GSH-Eluat. In der sechsten Spur ist der TEV-Protease-Verdau dargestellt. Die Masse des Fusionskonstruktes beträgt 29,4 kDa und die des GST-Tags 26,3 kDa.

Anschließend wird der Affinitätstag GST mittels TEV-Protease abgetrennt. Dazu wird zu der Proteinlösung TEV-Protease (Vgl. Kap. 2.5.10) im Verhältnis von 1:50 (w/w) sowie 1 mM TCEP zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Die Kontrolle des TEV-Protease-Verdaus erfolgt ebenfalls mittels SDS-

PAGE (Abb. 3.3.5). Die entsprechende Probe ist in Spur 6 ist aufgetragen. Bei der Bande unterhalb der 30 kDa handelt es sich um den abgetrennten GST-Tag (26,3 kDa). Die Effizienz des TEV-Verdau liegt etwa bei 90-95 %. Die Masse des abgespaltenen Peptides HtrII(A95C-114) beträgt 2280 Da und ist aufgrund der geringen Größe im Gel nicht zu detektieren. Die durchschnittliche Ausbeute bei diesem Konstrukt beträgt 25 mg/L_{Kultur}.

Nach dem TEV-Protease-Verdau ist oft ein farbloser Niederschlag in der Proteinlösung zu beobachten. Hierbei handelt es sich um den abgespaltenen GST-Tag. Die Menge des Niederschlags variiert je nach Proteinkonzentration. Der Niederschlag wird durch eine Zentrifugation bei 5000 rpm abgetrennt und verworfen. Das abgespaltene Peptid HtrII(A95C-114) wird über HPLC aufgereinigt, wie in Kapitel 5.2.5 beschrieben.

Die Charakterisierung des Peptids erfolgt über ESI-MS. Das entsprechende Spektrum ist in Abbildung 3.3.6 dargestellt und weist drei Peaks auf, die den jeweiligen Ladungszuständen von +2 bis +4 entsprechen. Das dekonvolutierte Spektrum (rechts) zeigt eine Masse von 2280 Da, was mit der berechneten Masse von 2280,5 Da in guter Übereinstimmung ist. Die Peptidausbeute beträgt 1,5 mg/L_{Kultur}.

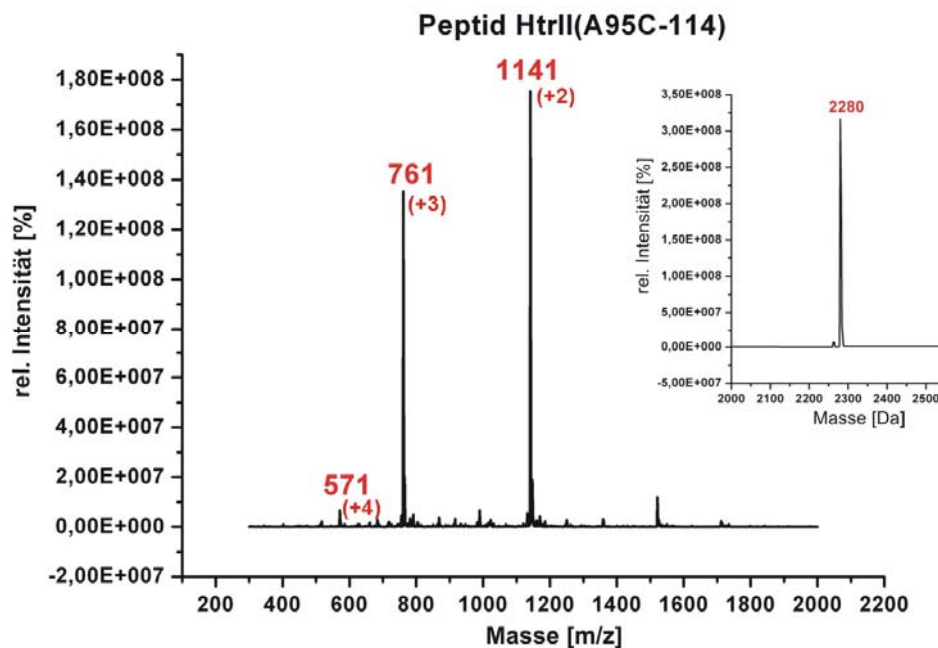


Abb. 3.3.6: ESI-MS-Spektrum des Peptids HtrII(A95C-114). Rechts oben: dekonvolutiertes Spektrum. Die berechnete Masse beträgt 2280,5 Da.

Zur Charakterisierung der Sekundärstruktur des Peptids werden CD-Spektren in Puffer und Liposomen aufgenommen (Vgl. Kap. 2.7.2). Die CD-Spektren sind in der Abbildung 3.3.7 dargestellt. Bei der CD-Messung in Puffer (10 mM KPi (Kaliumphosphat)) beträgt die Konzentration des Peptids 0,1 mM (Abb. 3.3.7, schwarz). Die Endkonzentration des Peptids in den Liposomen beträgt 0,025 mM (Abb. 3.3.7, rot). Die Peptide weisen sowohl in Puffer, als auch in Liposomen eine *random coil* Struktur auf, was sich durch ein Minimum bei 195 nm äußert.

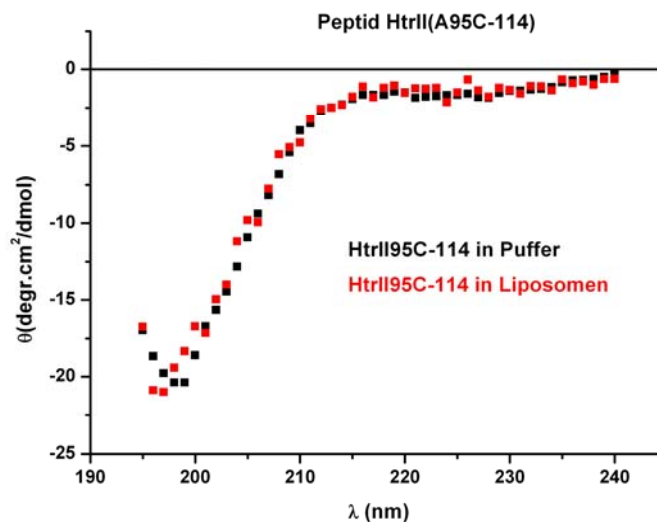


Abb. 3.3.7: CD-Spektren des Peptids HtrII(A95C-114) in 10 mM KPi-Puffer (schwarz) und in Liposomen (rot). Beide Peptide weisen eine *random coil* Struktur auf.

3.3.4 Expression und Aufreinigung des Fusionskonstrukts GST-TEV-

HtrIIA95C-157

Die Expression und Aufreinigung des GST-TEV-HtrIIA95C-157-Fusionskonstrukts erfolgt analog zur bereits beschriebenen Aufreinigung des GST-TEV-HtrIIA95C-114-Konstrukts. Die Proteincharakterisierung erfolgt mittels SDS-Gelelektrophorese (Abb. 3.3.8). In der ersten Spur ist der GSH-Durchfluss aufgetragen. Die Spuren zwei und drei beschreiben die GSH-Eluate und enthalten das aufgereinigte Zielprotein. Das berechnete Molekulargewicht des Konstrukts beträgt 34,3 kDa. Der Extinktionskoeffizient bei 280 nm beträgt $\epsilon_{280} = 43480 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Die durchschnittliche Ausbeute dieses Konstrukts beträgt 40 mg/L_{Kultur}. Nach der GSH-Aufreinigung wird zu der Proteinlösung die TEV-Protease in einem Verhältnis von 1:50 (w/w) sowie 1 mM TCEP zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die

entsprechende Probe ist im SDS-Gel (Abb. 3.3.9, Spur: TEV-Verdau) aufgetragen. Die Effizienz des TEV-Verdau liegt bei 90-95%. Neben der Bande bei 43 kDa, die dem Fusionskonstrukt entspricht, befinden sich noch zwei weitere prominente Proteinbanden (Abb. 3.3.9, TEV-Verdau) bei 27 kDa und bei 7 kDa. Bei der Bande bei ~ 27 kDa handelt es sich um den abgespaltenen GST-Affinitätstag. Die untere Bande beschreibt das Peptid HtrII(A95C-157) (7,2 kDa). Bei den Proteinbanden oberhalb des Fusionskonstrukts handelt es sich um unspezifisch gebundene Proteine.

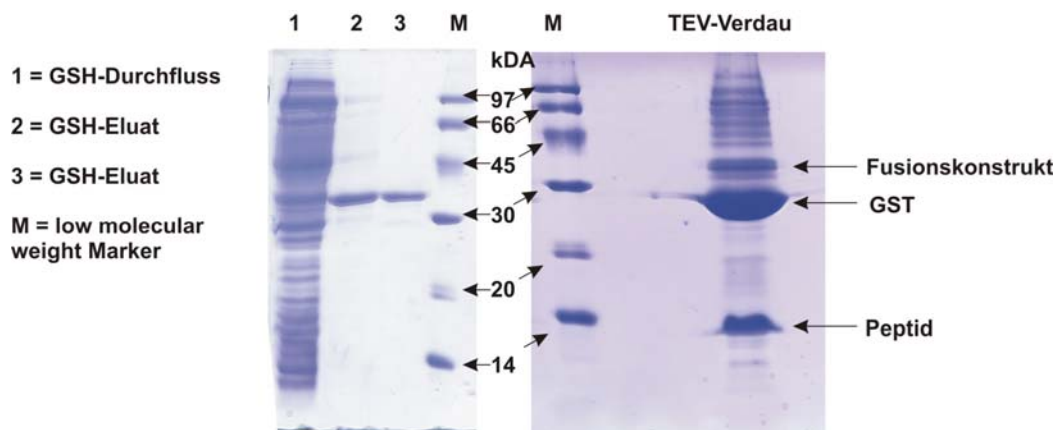


Abb. 3.3.8: SDS-Gel zur Kontrolle der GSH-Aufreinigung (links) sowie des TEV-Protease-Verdau des GST-TEV-HtrIIA95C-157-Fusionskonstrukts (rechts). Die erste Spur zeigt den GSH-Durchfluss, die zweite und die dritte das GSH-Eluat. Rechts: Der TEV-Protease-Verdau. Das Molekulargewicht des Fusionskonstrukts beträgt 34,3 kDa, die des GST-Tags 26,3 kDa und die des Peptids HtrII(A95C-157) 7,2 kDa.

Nach dem TEV-Protease-Verdau erfolgt analog zum Peptid HtrII(A95-114) die HPLC-Aufreinigung. Das Peptid HtrII(A95C-157) wird mittels ESI-MS charakterisiert (Abb. 3.3.9). Das ES-MS-Spektrum zeigt Ladungsverteilung des Peptids von +4 bis +8. Die aus der Ladungsverteilung berechnete Masse von 7180 Da ist im dekonvolvierten Spektrum (Abb. 3.3.9, rechts) dargestellt. Die theoretische Masse beträgt 7177,3 Da und stimmt im Rahmen der Messgenauigkeit mit der erhaltenen überein. Die Peptidausbeute beträgt 2,5 mg/L_{Kultur}.

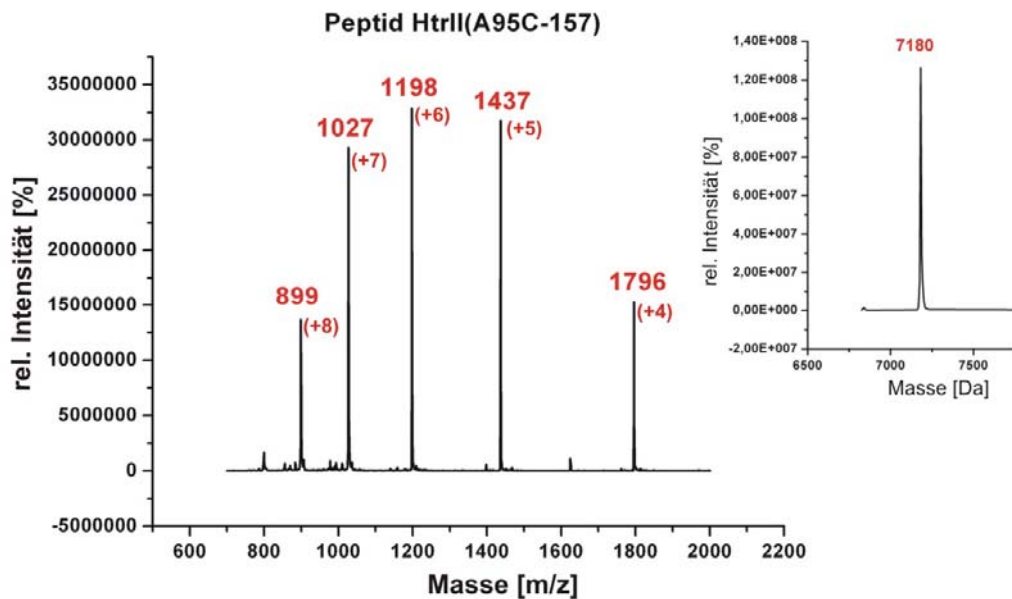


Abb. 3.3.9: ESI-MS-Spektrum des Peptids HtrII(A95C-157). Rechts: Das dekonvolutierte Spektrum. Die theoretische Masse beträgt 7177,3 Da.

3.3.5 Expressed Protein Ligation von HtrII(1-94)-Cys-(96-114)

Für die Darstellung des HtrII(1-94)-Cys-(96-114)-Konstrukts werden das Fusionskonstrukt HtrII(1-94)-MXE-His und das Peptid HtrII(A95C-114) eingesetzt. Die Thioestergenerierung von HtrII(1-94)-SR, die Rekonstitution in PM-Lipide und die Ligation erfolgen *in situ*. Das Fusionskonstrukt HtrII(1-94)-MXE-His liegt zu Beginn der Ligationsreaktion in Puffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris, ~ 0,1% DDM, pH 8) vor. Zu dieser Lösung wird in einem molaren Verhältnis von 1:2 (HtrII(1-94)-MXE-His: HtrII(A95C-114)) das Peptid zugegeben und vollständig gelöst. Anschließend werden PM-Lipide im Verhältnis von 1:1 (w/w) bezogen auf die Summe der Proteine zugegeben, 750 mM Mesna (2-Mercaptoethansulfonat-Natrium) eingestellt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Ligationsansatz so weit mit Ligationspuffer verdünnt, dass die Detergenzkonzentration unter die kritische Mizellenkonzentration herabgesetzt wird. Der Ansatz wird in einen $1_{\text{cut-off}}$ Dialyseschlauch gegeben und gegen den Ligationspuffer (500 mM NaCl, 10 mM Tris, 200 mM Mesna, pH 8) über Nacht bei RT dialysiert. Zusätzlich werden zu dem Puffer die Detergenzabsorber *Biobeads* zugegeben. Am folgenden Tag wird der Dialysepuffer gegen den Puffer G (500 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8) ausgetauscht.

Die Rekonstitution wird anhand der Trübung und vollständigen Entfernung von Detergenz beobachtet. Nach vollständiger Rekonstitution wird der Ansatz zentrifugiert (15', 5000 rpm, 4°C) und per SDS-Gel analysiert (Abb. 3.3.10).

In der ersten Spur ist das Pellet des Ligationsansatzes nach der Zentrifugation aufgetragen. Bei der oberen Bande handelt es sich um das abgespaltene MXE-Intein (M = 27 kDa), bei der unteren um das Ligationsprodukt HtrII(1-94)-Cys-(96-114) (M = 11,5 kDa). In der Spur 4 (Abb. 3.3.10) ist der gleiche Ansatz jedoch ohne die Zugabe von Peptid aufgetragen. Hierbei ist das abgespaltene MXE-Intein sowie der Thioester HtrII(1-94)-S-Mesna (9300 Da) zu sehen. Das Spleißen erfolgt vollständig.

Das Pellet wird in Solubilisierungspuffer (300 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 2 % DDM) resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgt eine erneute Zentrifugation (15', 5000 rpm, 4°C), wobei das Ligationsprodukt in die Detergenzhaltige Lösung übergeht und das Intein zusammen mit den Lipiden im Pellet verbleibt.

Das Pellet sowie der Überstand werden erneut über SDS-PAGE analysiert (Abb.3.3.10).

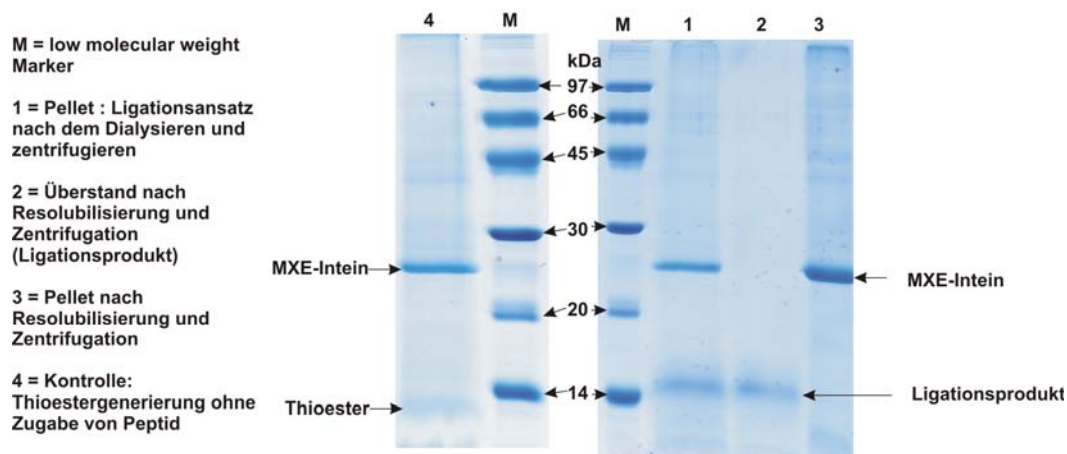


Abb. 3.3.10: SDS-Gel zur Ligationskontrolle. Die Spur 1 beschreibt das Pellet des Ligationsansatzes nach 3 Tagen Rekonstitution. Nach der Resolubilisierung in 2 % DDM-Puffer und erneute Zentrifugation beschreibt die zweite Spur den Überstand und die dritte das Pellet. Das Ligationsprodukt (M = 11.6 kDa) befindet sich im Überstand, das MXE-Intein (27 kDa) befindet sich im Pellet. Die Spur 4 zeigt die Kontrolle des Ligationsansatzes ohne Zugabe von Peptid. Hier ist nur MXE und Thioester HtrII(1-94)-S-Mesna (9300 Da) zu finden.

Im Überstand (Spur 2) ist das Ligationsprodukt zu finden. Diese Bande befindet sich knapp oberhalb der unteren Markerbande bei 14 kDa. Dies lässt sich auf die Lipide bzw. stark Detergenzhaltige Lösung zurückführen. Wie schon anhand des Wildtyp Rezeptors und des Transducers gezeigt (Vgl. Abb. 3.1.4) üben die Lipide und

Detergentien einen starken Einfluss auf das Laufverhalten der Proteine im Gel aus. Dass es sich hierbei um eine neu gebildete Produktbande handelt, zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von Peptid (Spur 4). Der mit ProtParam berechnete Extinktionskoeffizient bei 280 nm beträgt $\epsilon_{280} = 2980 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Konzentration des Ligationsprodukts wird über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Ligationsausbeute bezogen auf das aufgereinigte Endprodukt liegt bei 51 %.

3.3.6 Charakterisierung der Sekundärstruktur von HtrII(1-94)-Cys-(96-114)

Um die Faltung des Ligationsprodukts zu überprüfen, werden CD-Spektren in Abhängigkeit von der Salzkonzentration aufgenommen und mit denen des Wildtyps *NpHtrII*₁₁₄-His verglichen. Die Proteine werden vorher gegen Puffer (5 mM KPi, pH 8) mit Zugabe von 0,1 M bzw. 4 M KF dialysiert. Da die Proteine in einer Detergenzlösung von ~ 0,1 % DDM, welche die kritische Mizellenkonzentration überschreitet, vorliegen wird dem Dialysepuffer kein Detergenz zugegeben. Die Mizellengröße liegt bei 50 kDa daher können die Mizellen die Dialysemembran nicht passieren.

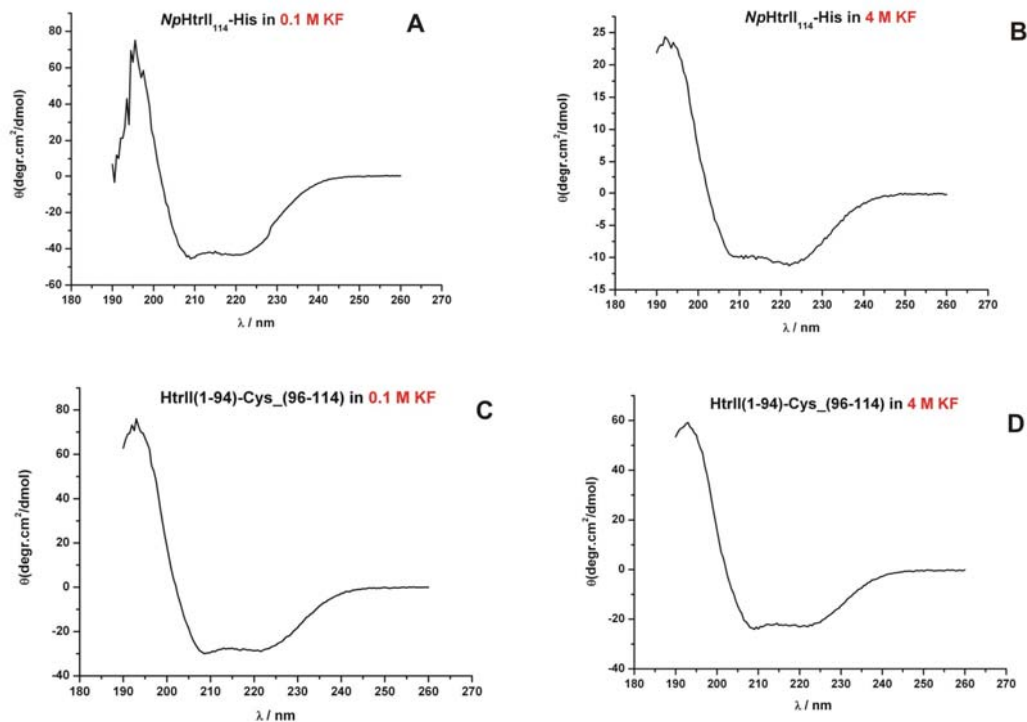


Abb. 3.3.11: CD-Spektren von *NpHtrII*₁₁₄-His in 0,1 mM KF (A) und in 4 M KF (B) und HtrII(1-94)-Cys-(96-114) in 0,1 mM KF (C) und in 4 M KF (D)

Die CD-Spektren (Abb. 3.3.11, A und B) beschreiben die Sekundärstruktur von *NpHtrII*₁₁₄-His in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Beide Spektren weisen typische Merkmale für einer α -helikalen Struktur auf, nämlich ein Absorptionsmaximum bei 190 nm sowie Absorptionsminima bei 204 nm und 220 nm (Winter *et al.*, 1998). Im Vergleich dazu sind die CD-Spektren des Ligationsprodukts (Abb. 3.3.11, C und D) abgebildet. Auch hier weisen die Spektren einen α -helikalen Charakter auf. Die Spektren des Ligationsprodukts entsprechen denen des Wildtyps. Es ist in beiden Fällen keine offensichtliche Salzabhängigkeit zu detektieren. Das Ligationsprodukt hat nach der Ligationsreaktion die korrekte α -helikale Faltung.

3.3.7 Bindungsstudien von *HtrII(1-94)-Cys-(96-114)* an *NpSRII-His*

Um die Funktionalität des Ligationsprodukts zu überprüfen erfolgen Bindungsstudien mit dem Rezeptor *NpSRII-His* mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC). Hippler-Mreyen *et al.* haben bereits solche Studien mit dem Wildtyp Transducer unterschiedlicher Längen durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit mit dem Ligationsprodukt zu gewährleisten, werden dieselben Titrationsbedingungen (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003) gewählt. Dazu werden die Proteine mittels PD10-Entsalzungssäulen auf die gleichen Pufferbedingungen (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05 % DDM, pH 8) gebracht. Für die Titration werden 400 μ M *NpSRII-His* und 40 μ M Ligationsprodukt eingesetzt. Das Ligationsprodukt wird vorgelegt und der Rezeptor in 12 μ L Schritten in einem fünfminütigen Takt hinzu titriert. Die Basislinie wird, um die Puffereffekte auszuschließen mit dem Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05 % DDM, pH 8) aufgenommen. Die Titration erfolgt bei 45 °C.

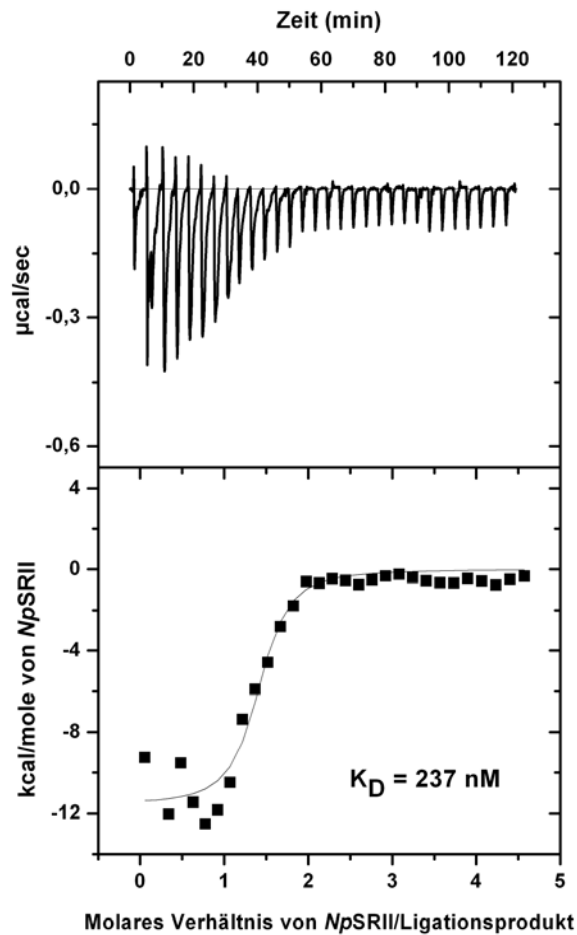


Abb. 3.3.12: ITC-Messung von NpSRII-His und NpHtrII(1-94)-Cys-(96-114).

Die Rohdaten (Abb. 3.3.12, oben) zeigen in Folge eines exothermen Prozesses Signale mit negativer Amplitude nach jeder Titration. Die Signale relaxieren nach einer Wartezeit von fünf Minuten zum Ausgangsniveau. Durch die Integration dieser Titrationskurve über die Zeit resultiert eine sigmoide Kurve (Abb. 3.3.12, unten). Daraus lässt sich die freigesetzte Wärme ΔH in kJ/mol berechnen. In der Tabelle 3.3.1 sind die erhaltenen Daten des Ligationsprodukts der ITC-Messung des Wildtyps der des NpSRII/NpHtrII₁₁₄ (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003) gegenübergestellt.

Tab. 3.3.1: Thermische Daten zur Titration von NpSR_{II}-His und NpHtr_{II}(1-94)-Cys-(96-114) im Vergleich zu NpSR_{II}-His und NpHtr_{II}₁₁₄-His (Hippler-Mreyen et al., 2003).

Daten	NpSR _{II} -His	NpSR _{II} -His
	NpHtr _{II} (1-94)-Cys-(96-114)	NpHtr _{II} ₁₁₄ -His
N	1,3	1,0
K _A [L/mol]	4,2 *10 ⁶	4,2 *10 ⁶
Δ H [kJ/mol]	-11,6	-17,6
Δ S [J/molK]	90,1	71,2
Δ G [kJ/mol]	-40,4	-40,4
K _D [nM]	237	240

Der Parameter N beschreibt das stöchiometrische Verhältnis der für die ITC verwendeten Proteine. Dieses entspricht im Rahmen der Messgenauigkeit dem Verhältnis 1:1, analog zu den Messungen vom Wildtyp. Die Assoziationskonstante K_A (Vgl. Kap. 2.7.3) beschreibt die Stärke der Komplexbildung. Je höher der K_A-Wert, desto stärker ist der gebildete Komplex. Der reziproke Wert dazu ist die sog. Dissoziationskonstante K_D. In diesem Fall gilt je niedriger der K_D-Wert, desto stärker ist der gebildete Komplex. Aus den Beziehungen $\Delta G = -RT \ln K$ und $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ lassen sich die Änderung der Gibbs-Energie ΔG sowie die Änderung der molaren Entropie ΔS berechnen. Vergleicht man die thermischen Daten zur Komplexbildung von NpSR_{II}-His mit dem Ligationsprodukt und dem Wildtyp, so bewegen sich diese in gleicher Größenordnung. Das semisynthetisch hergestellte Ligationsprodukt weist also eine dem Wildtyp analoge Funktionalität auf.

3.3.8 Expressed Protein Ligation von Htr_{II}(1-94)-Cys-(96-157)

Für die Darstellung des Htr_{II}(1-94)-Cys-(96-157)-Ligationsprodukts werden das Fusionskonstrukt Htr_{II}(1-94)-MXE-His und das Peptid Htr_{II}(A95C-157) eingesetzt. Die Thioestergenerierung von Htr_{II}(1-94)-SR, die Rekonstitution in PM-Lipide und die Ligation erfolgen *in situ*. Die Ansätze und Durchführung erfolgen analog zur bereits in Kapitel 3.3.5 beschriebenen Ligation des Htr_{II}(1-94)-Cys-(96-114)-Konstrukts. Die Ligationsreaktionen werden mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert, das entsprechende Gel ist in der Abbildung 3.3.12 dargestellt.

In der ersten Spur (Abb. 3.3.12) ist die Kontrolle aufgetragen. Dabei handelt es sich um den Ligationsansatz ohne die Zugabe des Peptids HtrII(A95C-157). Diese Spur weist zwei Banden auf, das MXE-Intein (~ 27kDa) und den Thioester HtrII(1-94)-S-Mesna (9,3 kDa). Nach der Ligationsreaktion wird das Produkt zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C). Die rekonstituierten Lipide (Pellet) enthalten dabei den nicht umgesetzten Thioester, das abgespaltene MXE-Intein sowie das Ligationsprodukt. Das Pellet wird in Puffer (300 mM NaCl, 10 mM Tris, 2% DDM, pH 8) resuspendiert und über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Am darauf folgenden Tag erfolgt erneut eine Zentrifugation. Die Proben des Pellets und des Überstands sind auf dem SDS-Gel (Abb. 3.3.12) aufgetragen. Der Überstand (Spur 2) enthält hauptsächlich das gebildete Ligationsprodukt HtrII(1-94)-Cys-(96-157) (16,4 kDa). Neben dem Ligationsprodukt enthält die Probe einen kleinen Anteil an MXE-Intein und den nicht umgesetzten Thioester. Das Pellet (Abb. 3.3.12, Spur 3) enthält hauptsächlich das MXE-Intein und den Thioester und nur einen geringen Anteil an Ligationsprodukt.

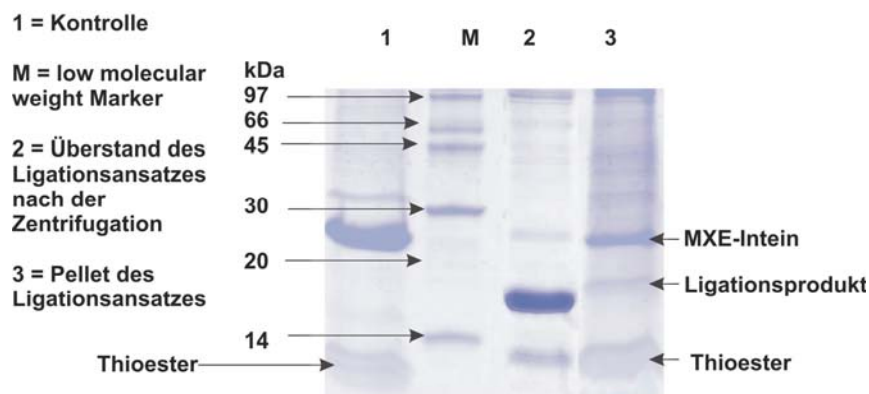


Abb. 3.3.12: SDS-Gel zur Ligationskontrolle von NpHtrII(1-94)-Cys-(96-157). Die erste Spur beschreibt die Kontrolle, Ligationsansatz ohne die Zugabe von Peptid HtrII(A95C-157). Bei der Bande bei ~27 kDa handelt es sich um das Abgespaltene MXE-Intein, bei 9300 Da um den HtrII(1-94)-S-Mesna-Thioester. Die zweite Spur beschreibt den Überstand und die dritte Spur das Pellet. Bei der neuen Bande bei ~ 17 kDa handelt es sich um das Ligationsprodukt ($M = 16,4$ kDa).

Die Ausbeute wird über die Absorption bei 280 nm bestimmt und beträgt 63 % bezogen auf das aufgereinigte Ligationsprodukt. Der Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon_{280} = 4470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.3.9 Charakterisierung der Sekundärstruktur von HtrII(1-94)-Cys-(96-157)

Wie in dem Kapitel 3.2 anhand der ESR-Daten gezeigt, übt die Salzkonzentration einen großen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Transducers *NpHtrII*₁₅₇ aus. Um dieses Verhalten am Ligationsprodukt HtrII(1-94)-Cys-(96-157) zu untersuchen, werden CD-Spektren in Abhängigkeit von der Salzkonzentration aufgenommen. Dazu wurden die Ligationsprodukte bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml gegen die jeweiligen Puffer (5 mM KPi, 0,05 % DDM, pH 8, X M KF) in Abhängigkeit von der KF-Konzentration über Nacht dialysiert. Die CD-Spektren wurden bei 0,1 M KF sowie bei 1M KF und 4 M KF aufgenommen. Vor den eigentlichen CD-Messungen werden die jeweiligen Dialysepuffer als Basislinie aufgenommen und von den Messdaten abgezogen.

Sämtliche in der Abbildung 3.3.13 dargestellten Spektren weisen eine α -helikale Struktur auf, wie anhand des Absorptionsmaximums bei 190 nm sowie der zwei Absorptionsminima bei 204 nm und 220 nm zu sehen ist. Es ist jedoch deutlich zu erkennen, dass der α -helikale Charakter der CD-Spektren mit zunehmender Salzkonzentration zunimmt. Die für die α -helikale Struktur typischen Merkmale sind bei 4 M Kaliumfluorid am stärksten ausgeprägt. Anhand dieser CD-Spektren lässt sich daher bestätigen, dass die hohe Salzkonzentration die α -helikale Struktur stabilisiert. Das Ligationsprodukt HtrII(1-94)-Cys-(96-157) ist nativ gefaltet.

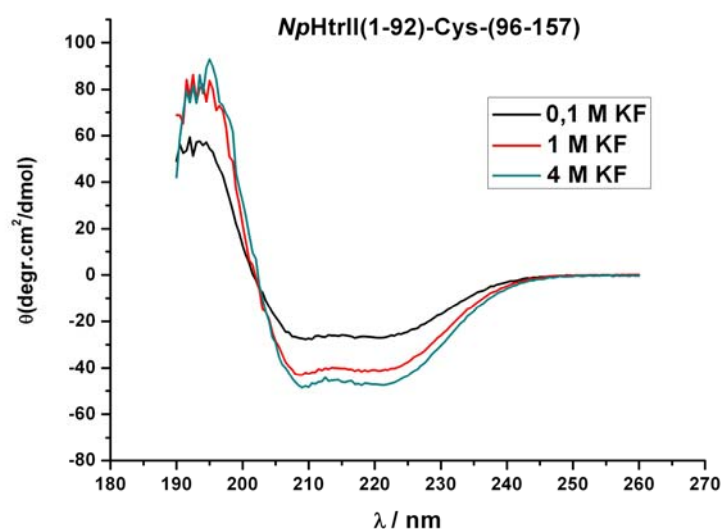


Abb. 3.3.13: CD-Spektren des Ligationsprodukts *NpHtrII*(1-94)-Cys-(96-157) in Abhängigkeit von der KF-Konzentration (0,1 M KF, schwarz, 1 M KF, rot, 4 M KF, türkis).

3.3.10 Bindungsstudien von HtrII(1-94)-Cys-(96-157) an NpSRII-His

Analog zu dem verkürzten Ligationsprodukt wird auch bei dem längeren Konstrukt die Funktionalität anhand von Bindungsstudien mit dem Rezeptor mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) überprüft. Als Referenz werden erneut die von Hippler-Mreyen durchgeführten ITC-Messungen mit analogem Wild-Typ Transducer NpHtrII₁₅₇-His und dem Rezeptor NpSRII-His (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003) verwendet. Die Proteine werden mittels PD10-Entsalzungssäulen auf gleiche Pufferbedingungen (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05 % DDM, pH 8) gebracht. Für die Titration werden 300 μ M NpSRII-His und 30 μ M Ligationsprodukt eingesetzt. Das Ligationsprodukt (1,5 ml) wird vorgelegt und der Rezeptor in 12 μ L Schritten in einem fünfminütigen Takt hinzu titriert. Die Basislinie wird, um Puffereffekte auszuschließen, in dem Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05 % DDM, pH 8) aufgenommen. Die Titration erfolgt bei 45 °C. Das resultierende ITC-Spektrum ist in der Abbildung 3.3.14 dargestellt.

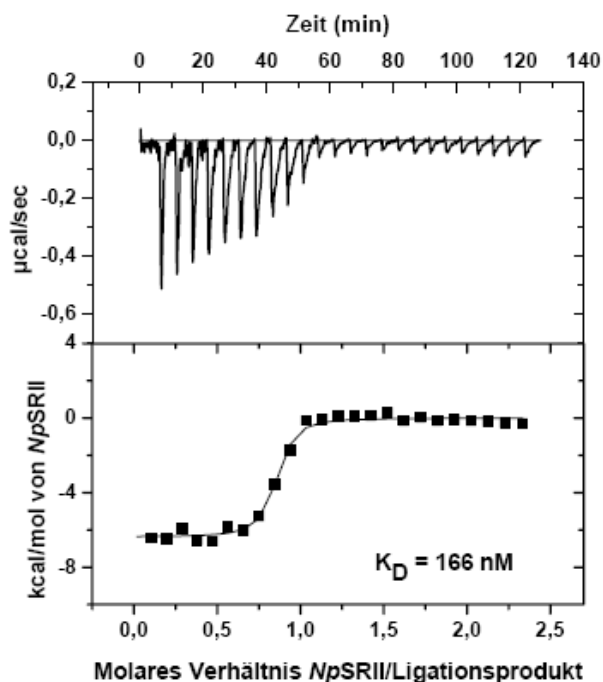


Abb. 3.3.14: ITC-Messung von NpSRII-His mit dem Ligationsprodukt NpHtrII(1-94)-Cys-(96-157).

Das obere Spektrum in der Abbildung 3.3.14 stellt die Titrationskurve dar. Durch die Integration dieser Titrationskurve über die Zeit resultiert die sigmoide Kurve (Abb. 3.3.14, unteres Spektrum). Aus dieser lässt sich die umgesetzte Energie sowie

der stöchiometrische Faktor N ablesen. Die thermischen Daten sind in der Tabelle 3.3.2 wiedergegeben.

Tab. 3.3.2: Thermische Daten der ITC-Messungen des Ligationsprodukts und des Rezeptors verglichen mit Literaturdaten des Wildtyps (Hippler-Mreyen et al., 2003).

Daten	NpSRII-His	NpSRII-His
	NpHtrII(1-94)-Cys-(96-157)	NpHtrII₁₅₇-His
N	0,8	1,0
K _A [L/mol]	6,2 *10 ⁶	6,2 *10 ⁶
Δ H [kJ/mol]	-6,4	-17,9
Δ S [J/molK]	109,7	73,8
Δ G [kJ/mol]	-41,3	-41,3
K _D [nM]	166	163

Die Dissoziationskonstanten K_D sowohl vom Ligationsprodukt, als auch von dem Wildtyp liegen in der gleichen Größenordnung. Somit besitzt das semisynthetische Ligationsprodukt NpHtrII(1-94)-Cys-(96-157) die gleichen funktionellen Eigenschaften wie der Wildtyp.

Vergleicht man die Dissoziationskonstante (K_D = 163) der Komplexbildung des Rezeptors mit NpHtrII₁₅₇-His mit der des verkürzten Transducers NpHtrII₁₁₄-His (Vgl. Kap. 3.3.8) (K_D = 240 mM), so ist die Komplexbildung mit dem längeren Transducerkonstrukt stärker. Derselbe Effekt ist ebenfalls bei den Ligationsprodukten NpHtrII(1-94)-Cys-(96-157) (K_D = 166) und NpHtrII(1-94)-Cys-(96-114) (K_D = 237) zu beobachten.

3.4 Wechselwirkungen zwischen Rhodopsin und *peptide 18*

Dieses Projekt ist aus der Initiative von Reiner Vogel aus der Universität Freiburg entstanden.

3.4.1 Klonierungsstrategie von *peptide 18*

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen dem Rhodopsin und *peptide 18*, einem Peptidanalogen des Bindungsmotivs aus der α -Untereinheit des Transducins, sollte ein Peptid mit der Sequenz: M L E N L K D C G L F kloniert werden. Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 3.4.1 dargestellt.

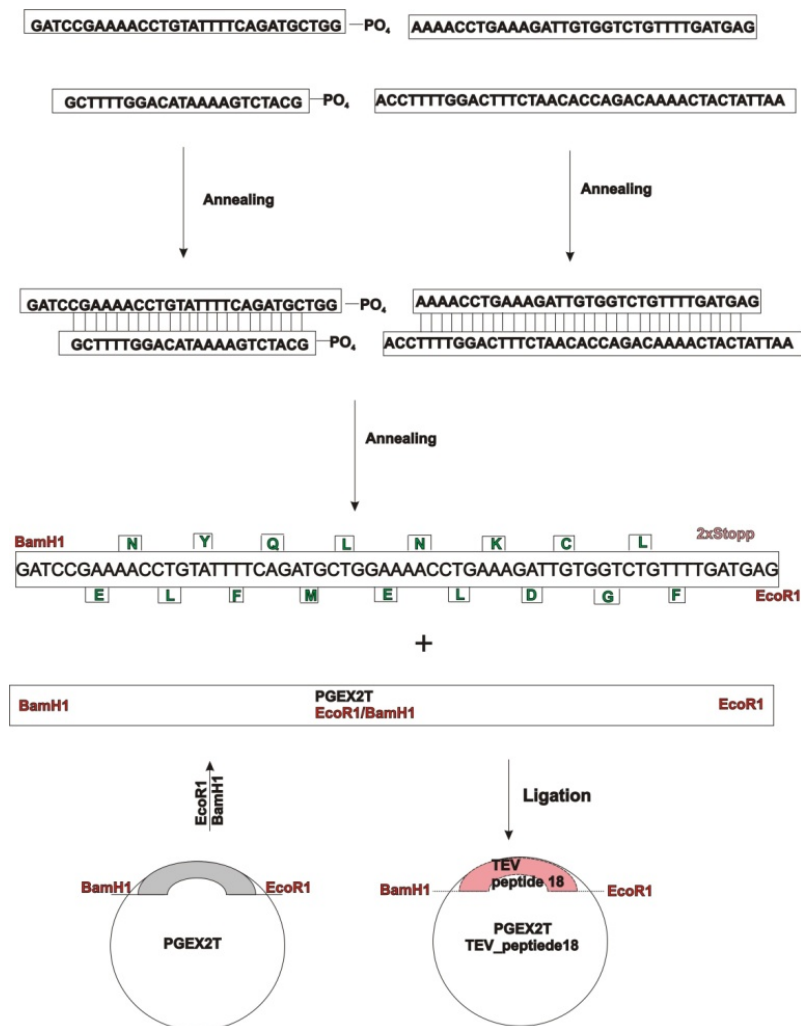


Abb. 3.4.1: Klonierungsstrategie des *peptide 18*.

Das Peptid wird als GST_TEV-Fusionsprotein kloniert. Es werden vier Primer mit der entsprechenden Sequenz konzipiert und über drei Annealingreaktionen zu einer EcoR1/BamH1-flankierenden TEV_*peptide 18* Sequenz kloniert. Diese wird in einen kommerziell erhältlichen pGEX2T-Vektor, welcher ebenfalls mit den Enzymen EcoR1/BamH1 geschnitten ist, ligiert. In dem Vektor befinden sich bereits die Sequenzen für die Ampizillinresistenz und die N-terminale Glutathion-S-Transferase (GST), welche für die Affinitätsaufreinigung über die GSH-Sepharose benutzt wird. Der fertige pGEX2T_TEV_*peptide18* Vektor wird in *E. Coli* BL21-Zellen transformiert.

3.4.2 Expression und Aufreinigung von *peptide 18*

Die Expression des GST_TEV_*peptide18*-Fusionsproteins erfolgt in Minimalmedium. Im Falle der isopenmarkierten Expression wird dem Minimalmedium ^{13}C -Glukose und ^{15}N -Ammoniumchlorid zugesetzt. Als Antibiotikum wird Ampizillin verwendet. Das Medium wird auf eine optische Dichte (OD) von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD = 1,2-1,4 bei 37 °C geschüttelt. Anschließend erfolgt die Induktion mit 0,5 mM IPTG, wonach die Kultur für weitere 4 Stunden bei 37 °C geschüttelt wird. Nach der Expression werden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Das lösliche GST_TEV_*peptide18*-Fusionsprotein wird über GSH-Sepharose aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über die Absorption bei 280 nm. Der Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon_{280} = 44600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Die zu erwartende Größe des Proteins beträgt 28,4 kDa. Die Ausbeute beträgt 7 mg/L_{Kultur}. Die Charakterisierung und Qualität der Aufreinigung wird mittels SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 3.4.2).

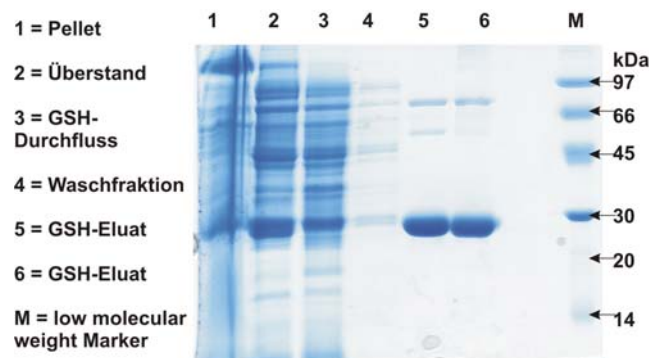


Abb. 3.4.2: Lämmli-SDS-Gel zur Aufreinigungskontrolle des GST_TEV_*peptide18*-Fusionsproteins (28,4 kDa).

Das entsprechende Pellet und Überstand nach Zellaufschluss sind in Spuren 1 und 2 aufgetragen. Bei der prominenten Bande im Überstand (Spur 2) bei etwa 30 kDa handelt es sich um das Zielprotein. Die dritte Spur zeigt den GSH-Durchfluss und die vierte die Waschfraktion. Die Spuren 5 und 6 entsprechen den GSH-Elutaten und beinhalten hauptsächlich das Zielprotein.

Zur errechneten Proteinmenge wird die TEV-Protease im Verhältnis 1:50 (w/w) (Protease:Protein) zugegeben und die Proteinlösung mit 1 mM TCEP zur Reduktion der Disulfidbrücken, versetzt. Anschließend wird über Nacht bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Nach dem TEV-Verdau erfolgt die *reverse phase*-HPLC-Aufreinigung wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben.

Das aufgereinigte Peptid wird mittels ESI-MS charakterisiert. Bei dem nichtmarkierten *peptide 18* beträgt die theoretische Masse 1282,5 Da, die des ^{13}C , ^{15}N -isotopenmarkierten Peptids 1351,5 Da. Die gemessenen Spektren sind in Abbildung 3.4.3 dargestellt.

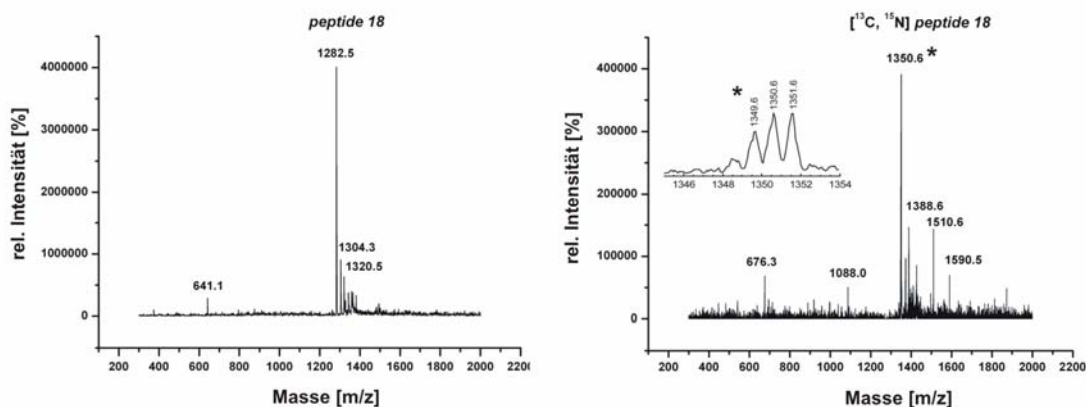


Abb. 3.4.3: Massenspektren von *peptide 18* (links) und $[^{13}\text{C},^{15}\text{N}]$ *peptide 18* (rechts). Das mit * markierte Insert zeigt die Isotopenaufspaltung des zugehörigen Massenpeaks. Die berechnete Effizienz der Isotopenmarkierung beträgt 98 %.

Die theoretische Masse für das nichtmarkierte Peptid stimmt mit der gemessenen von 1282,5 Da exakt überein. Die gemessene Masse des ^{13}C , ^{15}N -isotopenmarkierten Peptids weicht um 1 Da ab. Dies resultiert aus nicht vollständiger Isotopenmarkierung. Die Peaks bei 641,1 Da (Abb. 3.4.3, linkes Spektrum) sowie bei 676,3 Da (Abb. 3.4.3, rechtes Spektrum) beschreiben jeweils den zweifach geladenen Zustand der Peptide. Das mit * markierte Fenster im rechten Spektrum

zeigt die Isotopenaufspaltung des zugehörigen Peaks. Die berechnete Effizienz der Isotopenmarkierung beträgt 98 %. Die Peptidausbeute beträgt 130 $\mu\text{g}/\text{L}_{\text{Kultur}}$.

3.4.3 Verfolgung struktureller Änderungen zwischen Rhodopsin und *peptide 18* während der Komplexbildung mittels FTIR-Spektroskopie

Um die strukturellen Veränderungen am *peptide 18* während der Bildung des Komplexes zu beobachten, wird zunächst ein Differenzspektrum von Rhodopsin im Grundzustand und im aktivierten (Meta II) Zustand jeweils mit und ohne das *peptide 18* aufgenommen (Abb. 3.4.4).

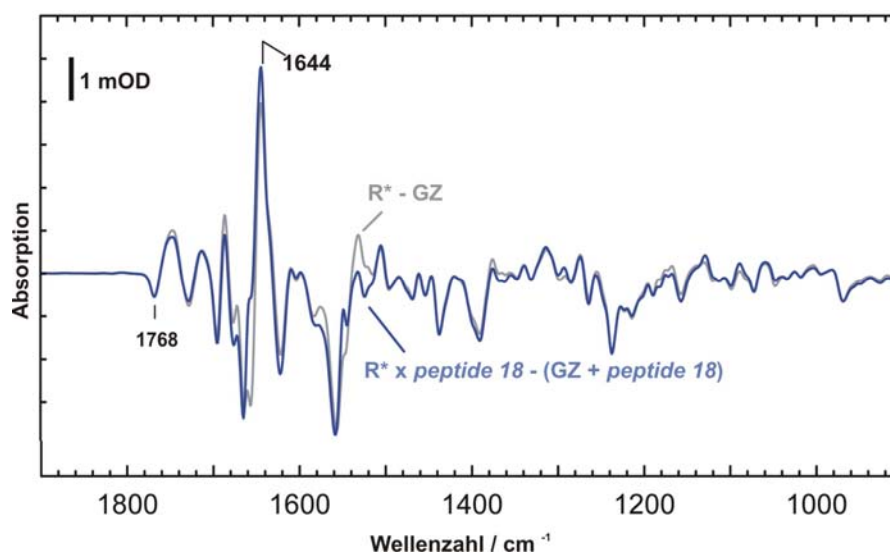


Abb. 3.4.4: Differenzspektrum von lichtinduziertem Rhodopsin R^* abzüglich Rhodopsin im Grundzustand GZ (grau). Differenzspektrum von lichtinduziertem Rhodopsin R^* im Komplex mit *peptide 18* ($R^* \times \text{peptide 18}$) abzüglich Rhodopsin im Grundzustand in Anwesenheit von *peptide 18* ($GZ + \text{peptide 18}$) (blau).

Das Differenzspektrum ($R^* - GZ$) beschreibt das resultierende FTIR-Spektrum von lichtaktiviertem Rhodopsin R^* abzüglich dem Spektrum von Rhodopsin im Grundzustand (GZ) (grau). Im Vergleich dazu ist ein Differenzspektrum vom gebildeten Komplex aus aktiviertem Rhodopsin mit *peptide 18* minus dem Spektrum von Rhodopsin im Grundzustand und ungebundenem *peptide 18* ($R^* \times \text{peptide 18} - GZ + \text{peptide 18}$) (blau), dargestellt. Die Abweichungen im Spektrum bei Anwesenheit des Peptids resultieren aus strukturellen Änderungen bei der Komplexbildung zwischen dem Peptid und Rhodopsin.

Nach Subtraktion der beiden Spektren ($R^* - GZ$) - ($R^* \times \text{peptide 18} - GZ + \text{peptide 18}$) ergibt sich das Peptidbindungsspektrum (PBS). Das Peptidbindungsspektrum mit unmarkiertem Peptid ist in der Abbildung 3.4.5 in blau und das mit dem isotonenmarkierten Peptid in rot dargestellt.

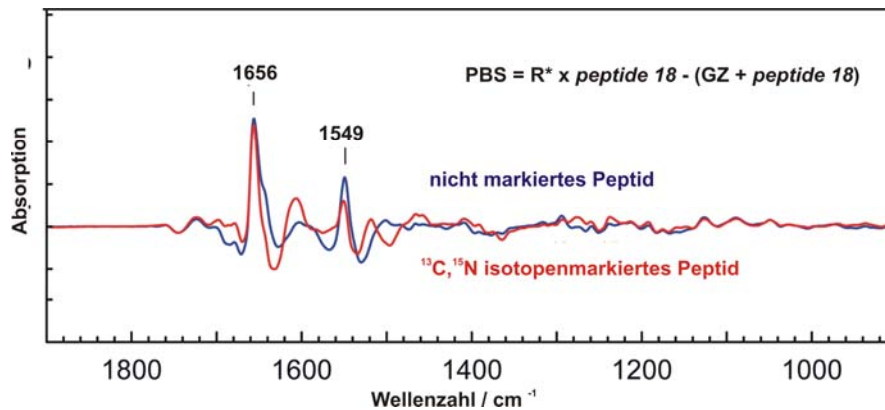


Abb. 3.4.5: Peptidbindungsspektrum (PBS). Das Spektrum resultiert aus der Differenz von FTIR-Spektren aktivierten Rhodopsins R^* gebunden und ungebunden an peptide 18. In blau dargestellt ist das Peptidbindungsspektrum des nicht markierten Peptids und in rot das des von [¹³C, ¹⁵N]-isotonenmarkierten.

Die Absorptionsbanden in den beiden Spektren gehen aus der Komplexbildung mit Rhodopsin hervor. In diesem Spektrum können zwei Differenzbanden detektiert werden. Diese entsprechen den Amid I- und Amid II-Schwingungen und liefern Informationen über Peptidrückgratschwingungen in Proteinen. Die Amid I-Bande bei 1656 cm^{-1} resultiert aus der C=O Streckschwingung der Peptidbindung. Die Amid II-Bande bei 1549 cm^{-1} beschreibt die C-N Streckschwingung. Die Unterschiede zwischen dem nicht markierten und dem isotonenmarkierten Peptid basieren auf unterschiedlichen Atommassen.

Die lichtinduzierten strukturellen Änderungen während der Komplexbildung werden in der Abbildung 3.4.6 dargestellt. Die detektierten Amid I und Amid II Banden im PBS (Abb. 3.4.6 A) resultieren aus den Konformationsänderungen des peptidgebundenen aktivierten Rezeptors. Um die einzelnen Änderungen zu separieren wird vom PBS-Spektrum das IR-Spektrum von peptide 18 abgezogen. Das resultierende Spektrum ΔPeptid (Abb. 3.4.6 B, blau) zeigt die strukturelle Änderungen des aktivierten Rezeptors. Dem ΔPeptid -Spektrum gegenübergestellt ist das Differenzspektrum ΔR^* , welches sich aus der Subtraktion von PBS- und dem Differenzspektrum R^* ergibt (Abb. 3.4.6 B, rot). ΔR^* beschreibt die Konformationsänderung des peptid-

gebundenen Rhodopsinkomplexes, welche nur aus Änderungen des Peptids zurückzuführen ist. Anhand der Gegenüberstellung (Abb. 3.4.6 B) ist deutlich zu erkennen, dass die Intensitäten in Bereich der Amid I- und Amid II-Banden bei ΔR^* wesentlich intensiver sind als beim Δ Peptid. Dies zeigt, dass das Peptid durch die Bindung an den Rezeptor eine signifikante strukturelle Änderung erfährt.

Demnach bestätigt sich die Theorie einer Konformationsänderung beim Peptid während der Komplexbildung mit Rhodopsin (Kisselev *et al.*, 1998; Koenig *et al.*, 2002; Kisselev *et al.*, 2003), im Gegensatz zu Beobachtungen aus Kristallstrukturuntersuchungen, welche keine strukturelle Änderungen beim Peptid feststellen (Lambright *et al.*, 1996).

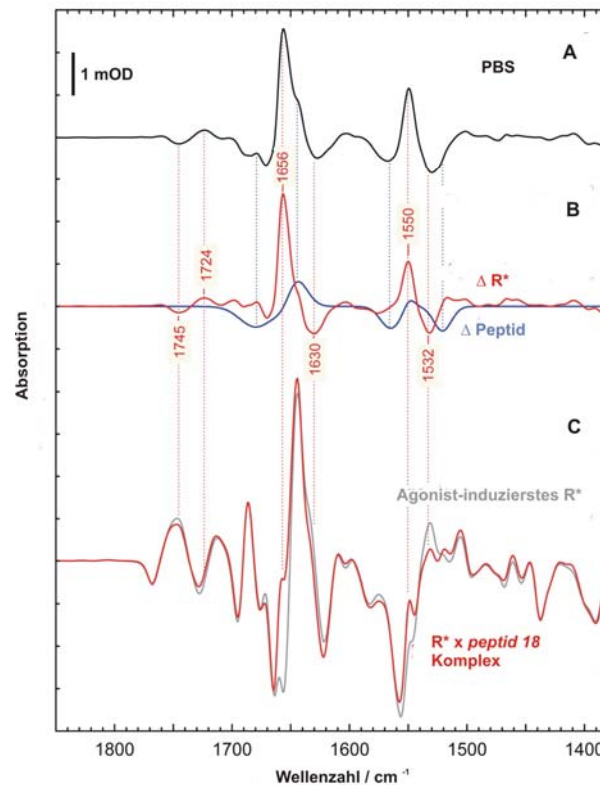


Abb. 3.4.6: Strukturelle Änderungen im aktivierten Rhodopsin R^* und beim peptide 18. A: Peptidbindungsspektrum (PBS) resultierend aus dem Differenzspektrum von aktiviertem und nichtaktiviertem Komplex ($R^* \times \text{peptide 18} - (\text{GZ} + \text{peptide 18})$). B: spezifische Konformationsänderungen während der Komplexbildung des Peptids ΔR^* (rot) und des Rezeptors Δ Peptid (blau). C: Vergleich zwischen dem aktiviertem Rhodopsin, ausschließlich durch das all-trans-Retinal stabilisiert (Analog zu Abb. 3.4.4) (grau), und dem peptidgebundenen Komplex ($R^* \times \text{peptide 18}$) (rot).

Der Vergleich der Konformationsänderungen zwischen dem aktivierten Rezeptor R* und dem peptidgebundenen aktivierten Rezeptor (Abb. 3.4.6) verdeutlicht den Einfluss des Peptids auf den Rezeptor. Das Spektrum des aktivierten Rezeptors R* ist in Abbildung 3.4.6 C (grau) gezeigt. Das gebildete R* wird ausschließlich von dem *all-trans*-Retinal stabilisiert. Im Vergleich dazu wird der aktive Zustand des peptidgebundenen Rhodopsin-Komplexes einerseits vom *all-trans*-Retinal und andererseits vom *peptide 18* stabilisiert. Das resultierende Spektrum (Abb. 3.4.6 C, rot) weist geringe Unterschiede in der Absorption auf, welche ausschließlich auf den Einfluss des Peptids zurückzuführen sind. Das Peptid induziert demnach zusätzliche strukturelle Änderungen in dem Rezeptor.

4. Diskussion

Die Signaltransduktion der archaebakteriellen Phototaxis weist eine starke Homologie zu dem Zwei-Komponenten-System der eubakteriellen Chemotaxis auf. Die Signalübertragung erfolgt von dem Rezeptor zu dem Transducer, wobei beide Proteine Konformationsänderungen erfahren. Der genaue Mechanismus der Signaltransduktionskaskade ist nicht bekannt.

In dieser Arbeit sollten die konformationellen Änderungen des Rezeptors *NpSRII* bei der Signalübertragung zum Transducer untersucht werden. Dazu sollten ortsgerichtete Mutagenesen an dem Rezeptor durchgeführt werden, um Cysteine an ausgewählte Positionen einzuführen, welche anschließend mit MTS-Spinlabel markiert werden. Unter Anwendung der ESR-Spektroskopie sollten lichtinduzierte Konformationsänderungen sowie die Abstandsänderungen zwischen zwei Spinmarkierungen ermittelt werden.

Zur Überprüfung des Einflusses der Mutation bzw. des Spinlabels auf die Rezeptorproteine wurden die Photozyklen der spinmarkierten Rezeptoren unter Anwendung der Blitzlichtphotolyse gemessen.

Zur Aufklärung der Sekundärstruktur der HAMP-Domäne sollten ebenfalls ausgewählte Positionen durch Cysteine ersetzt und mit Spinlabel markiert werden. Mittels ESR-Spektroskopie wurden Untersuchungen insbesondere in Hinblick auf die Salzabhängigkeit der Struktur durchgeführt.

Im Weiteren ist die Aufgabenstellung dieser Arbeit die semisynthetische Herstellung zweier verkürzter Transducerkonstrukte unter Anwendung der Methode der *Expressed-Protein-Ligation*. Diese Konstrukte sollten anschließend auf ihre Faltung und Funktionalität hin untersucht werden. Dazu wurden die Methoden der CD-Spektroskopie sowie Isotherme Titrationskalorimetrie angewendet.

Durch die Bindungsstudien des Peptidanalogs des Transducins an das bovine Rhodopsin unter Anwendung der FTIR-Spektroskopie sollten Informationen über die Konformationsänderung des Peptids bei der Bindung an Rhodopsin gewonnen werden.

4.1 ESR-Untersuchungen zur Signaltransduktion des Rezeptor-Transducer Komplexes *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇

Die Studien der lichtinduzierten Signalübertragung von dem Rezeptor zum Transducer wurden in den letzten Jahren mittels zahlreicher biophysikalischer Methoden, wie FTIR, X-ray, FRET und ESR durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen liefern teilweise unterschiedliche Daten bezüglich der konformationellen Änderungen des Rezeptors während der Signalübertragung.

Die sensorischen Rhodopsine haben eine große strukturelle Ähnlichkeit mit der lichtbetriebenen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin. Für die lichtinduzierte Konformationsänderung von Bakteriorhodopsin wurde eine auswärtsgerichtete Bewegung der Helix 6 beobachtet (Luecke *et al.*, 1999; Subramaniam *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2008).

Die ESR-spektroskopischen Untersuchungen an dem Rezeptor-Transducer-Komplex *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇ (Wegener *et al.*, 2000; Wegener *et al.*, 2001; Klare *et al.*, 2004; Bordignon *et al.*, 2007) haben in Analogie zu Bakteriorhodopsin, eine lichtinduzierte Auswärtsbewegung der Helix F gezeigt.

Die FTIR-Studien an dem Rezeptor (*NpSRII*) sowie dem Rezeptor-Transducer-Komplex (*NpSRII/NpHtrII*₁₄₇), rekonstituiert in Phospholipide (Bergo *et al.*, 2003), haben die mittels ESR gewonnenen Daten bezüglich der Helix F Bewegung bestätigt.

Die Kristallstrukturuntersuchungen (Moukhametzianov *et al.*, 2006) zeigen dagegen eine lichtinduzierte Bewegung der Helix G. Die Abbildung 4.1 zeigt die mittels Kristallstrukturuntersuchungen ermittelten lichtinduzierten Verschiebungen der Helices G und TM2. Die Anordnung der Helices G und F im Grundzustand sind in der Abbildung 4.1 in rot und im M-Zustand in gelb dargestellt. Die berechneten Abstände zwischen den C- α -Atomen der in der Abbildung 4.1 angegebenen Aminosäuren zeigen eine Verschiebung der Helix G um 0,5 Å in Richtung zytoplasmatischer Seite. Für die Helix F können über Kristallstrukturuntersuchungen keine lichtinduzierten Verschiebungen detektiert werden (Moukhametzianov *et al.*, 2006). Die Transducerhelix TM2 im Grundzustand ist in der Abbildung 4.1 in grau und im aktiven Zustand in grün dargestellt. Die Kristallstrukturuntersuchungen zeigen in Übereinstimmung mit ESR-Daten (Klare *et al.*, 2004) eine rezeptoraktivierte Rotation um 15 ° von TM2.

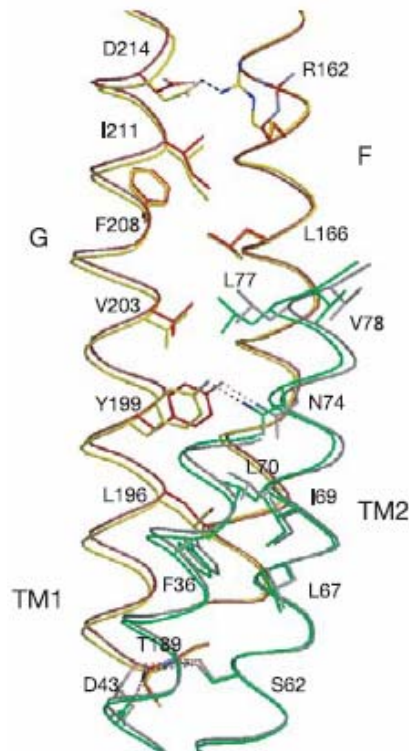


Abb. 4.1: Interhelikale Wechselwirkungen zwischen den Rezeptorhelices F und G im Grundzustand (rot) und M-Zustand (gelb) sowie Transducerhelix TM2 im Grundzustand (grau) und im aktiven Zustand (grün) (Moukhametzianov *et al.*, 2006).

Die Kristallstrukturuntersuchungen (Moukhametzianov *et al.*, 2006) und die ESR-Studien (Wegener *et al.*, 2001; Klare *et al.*, 2004) des aktivierten Komplexes *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇ zeigen somit übereinstimmend die gleiche Konformationsänderung der TM2-Helix. Beide Studien schlagen jedoch unterschiedliche Mechanismen bezüglich der Konformationsänderung des Rezeptors, die zur Aktivierung der TM2 führt, vor.

Möglicherweise können die Kristallstrukturuntersuchungen die Bewegung der Helix F nicht detektieren, weil der E-F-Loop aufgrund der dichten Packung des Kristalls starr und unflexibel ist. Fluoreszenz-Studien (Yang *et al.*, 2004) an *NpSRII* belegen, dass die Zugänglichkeiten des Fluoreszenzlabels (Lucifer yellow iodoamine) im Bereich des E-F-Loops durch den Transducer inhibiert werden, was diese Theorie untermauern würde. Dieser Effekt ist besonders bei der Mutante *NpS154C*, welche sich in diesem Loop befindet, zu beobachten. Die Zugänglichkeit des Fluoreszenzlabels ist nur bei dem Rezeptor-Transducer-Komplex *NpSRII/NpHtrII* blockiert. Bei der Rezeptormutante alleine ist die Position *NpS154C* leicht zugänglich. Die Abbildung 4.2 zeigt den von Yang *et al.* vorgeschlagenen Wechselwirkungsmechanismus zwischen dem Rezeptor und dem Transducer. Die

Seitenansicht des Rezeptors ist in dunkelgrau dargestellt. Die Helix F ist in der Abbildung 4.2 im Grundzustand (grün) und im M-Zustand (gelb) zu sehen. Die Struktur des Transducers in grau dargestellt stammt aus der Kristallstruktur [1H2S] und der zytoplasmatische Teil (Abb. 4.2, lila) stellt ein theoretisches Modell, basierend auf Fluoreszenzuntersuchungen (Yang *et al.*, 2004), dar.

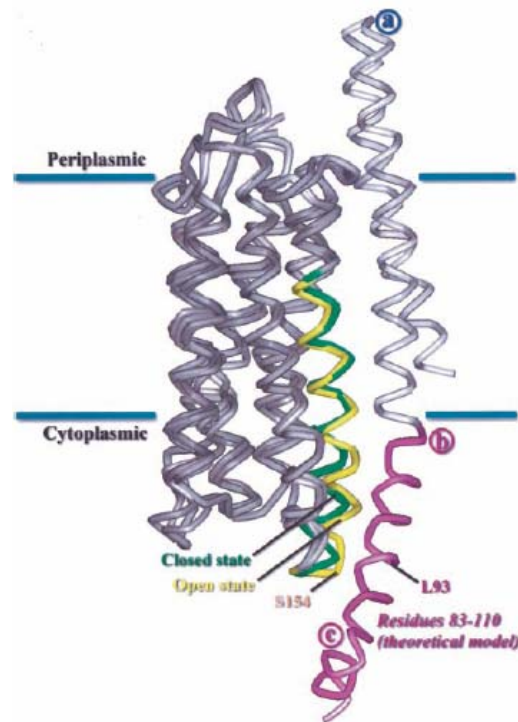


Abb. 4.2: Modell für die cytoplasmatische Domäne des Transducers und der konformationellen Änderungen des Rezeptors. Seitenansicht des Rezeptors NpSRII (dunkelgrau). Die Helix F im Grundzustand ist in grün und im M-Zustand in gelb dargestellt. Die Transducerhelix dargestellt in grau basiert auf Kristalldaten [1H2S], die Struktur des zytoplasmatischen Teils des Transducers (lila) stellt ein theoretisches Modell, basierend auf Fluoreszenzmessungen (Yang *et al.*, 2004), dar.

Zu dem selben Ergebnis, wie es Yang *et al.* beschreiben, führen die Zugänglichkeitsuntersuchungen mit paramagnetischen Substanzen basierend auf ESR-Daten (Klare *et al.*, 2006). Es konnte insbesondere demonstriert werden, welche Rolle die Umgebung für den Rezeptor/Transducer-Komplex spielt. In Detergenzhaltiger Lösung bilden Rezeptor und Transducer einen 1:1 Komplex aus, während in der Membran ein 2:2 Komplex ausgebildet wird. Die ESR-Untersuchungen zeigen, dass der Transducer bei Anwesenheit von Detergenz viel stärker an den Rezeptor bindet, als in der Membran. Dort wechselwirken die Transducerproteine stärker miteinander unter Ausbildung eines Vier-Helix-Bündels. Die Abbildung 4.3 beschreibt das Modell für die zytoplasmatische Domäne des Transducers basierend auf den Zugänglichkeiten von Chromoxalat. Bei dem Chromoxalat handelt es sich um eine

paramagnetische Substanz, die in der ESR-Spektroskopie für Untersuchungen der Proteinumgebung eingesetzt wird. Das Chromoxalat hat eine hohe Löslichkeit und Diffusionsfähigkeit im wässrigen Medium. Zu der Lipid-Doppelschicht findet diese Substanz keinen Zugang. Die Struktur des Rezeptors (Abb.4.3, dunkelblau) und Transducers (Abb. 4.3, hellblau) basieren auf Kristallstrukturdaten [1H2S]. Die Struktur des zytoplasmatischen Teils des Transducers stellt ein Modell basierend auf ESR-Daten (Klare *et al.*, 2006) dar. Die Zugänglichkeit für Chromoxalat wurde im Transducerbereich 95-101 untersucht und farbig dargestellt. Das Maß für die Zugänglichkeit ist in der Abbildung 4.3 als Farbcode angegeben. Dabei stehen der Rot-Gelb-Übergang für nahezu keine Zugänglichkeit für Chromoxalat und der Grün-Blau-Übergang für eine gute Zugänglichkeit.

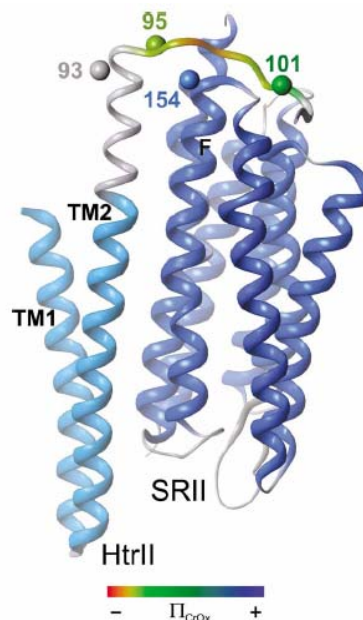


Abb. 4.3: Modell für den zytoplasmatischen Bereich des Transducers in der Sequenz von 84-101 basierend auf ESR-Untersuchungen (Klare *et al.*, 2006). Die Struktur des Rezeptors (dunkelblau) und des Transducers (hellblau) stammen von Kristalldaten [1H2S]. Der Farbcode (unten) beschreibt die Zugänglichkeit für die paramagnetische Substanz Chromoxalat im Bereich des Transducers 95-101, wobei rot keine Zugänglichkeit und blau sehr gute Zugänglichkeit bedeutet.

Da es sich bei dem Transducer im Bereich von 84-101 um den zytoplasmatischen Teil des Transducers handelt, wäre zu erwarten, dass das Chromoxalat eine leichte Zugänglichkeit aufweist. Die Farbcodierung (Abb. 4.3) jedoch zeigt das Gegenteil. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass der Transducer stark mit dem Rezeptor, welcher sich in der Lipiddoppelschicht befindet, wechselwirkt.

Wie in den Abbildungen 4.3 und 4.2 gezeigt, kommen die Fluoreszenz-Messungen (Yang *et al.*, 2004) und die ESR-Studien (Klare *et al.*, 2006) übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass der E-F-Loop eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der TM2 spielt sowie dass die TM2-Aktivierung über die Auswärtsbewegung der Helix F wahrscheinlich ist.

Die Diskrepanzen bezüglich der lichtinduzierten Konformationsänderungen des Rezeptors basierend auf den Kristallstrukturuntersuchungen, ESR- und Fluoreszenz-Messungen machen weitere Studien auf diesem Gebiet notwendig.

In dieser Arbeit werden neue Daten bezüglich der strukturellen Änderungen sowie der Rezeptor-Transducer-Wechselwirkungen präsentiert. Für die ESR-Studien sind Cysteinmutationen an den Helices B, C, F und G eingeführt und mit MTS-Spinlabel markiert worden. Die Seitenketten Y36R1^B und L90R1^C an dem Rezeptor sind nach innen orientiert.

Während die Seitenkette an der Helix B eine lichtinduzierte Mobilitätzunahme aufweist, nimmt die Mobilität der Seitenkette an der Helix C infolge einer Lichtaktivierung ab. Dieses lässt sich basierend auf molekulardynamischen Simulationen durch Reorientierung der Y36R1^B-Seitenkette erklären. Die analoge Position der Seitenkette Y36R1^B an Bakteriorhodopsin (BR) stellt die Seitenkette T46R1² dar. Im Gegensatz zu Y36R1^B lässt sich bei BR eine Abnahme der Mobilität beobachten (Rink *et al.*, 1997). Die Seitenkette T46 bei BR ist in den Prozess des Protonenpumpens involviert (Schmies *et al.*, 2000), die Rolle von Y36 bei SRII ist bislang nicht aufgeklärt.

Die analoge Position von L90R1^C an *Np*SRII ist die L100R1³ in BR. Für diese Position können keine strukturellen Änderungen an BR detektiert werden, während die Seitenkette V101R1³ an BR eine Abnahme in der Mobilität analog zu L90R1^C an *Np*SRII aufweist (Rink *et al.*, 2000). Dieses ist auf eine dichte Packung des terminalen Endes der Helix C zurückzuführen.

Die Seitenkette R34R1^B ist nach Außen orientiert und zeichnet sich durch eine starke Immobilität im Grundzustand aus. Nach einer Lichtaktivierung kann für die R34R1^B-Seitenkette zwar eine Zunahme der Mobilität detektiert werden, diese ist jedoch im Vergleich zur Y36R1^B-Seitenkette sehr gering. Für diese Position liegen keine vergleichbaren Daten für Bakteriorhodopsin vor.

Die zum Teil unterschiedlichen Mobilitäten der Spinlabel bei dem sensorischen Rhodopsin und Bakteriorhodopsin kommen unter anderen durch unterschiedliche

Funktionalitäten der beiden Pigmente zustande. Während das Bakteriorhodopsin ausschließlich als Protonenpumpe arbeitet, ist das sensorische Rhodopsin bifunktional. Bei Abwesenheit von Transducer pumpt SRII Protonen, analog zum Bakteriorhodopsin (Sasaki *et al.*, 1999). In Gegenwart von Transducer funktioniert SRII als ein sensorischer Rezeptor. So zeigen die Fluoreszenzmessungen am Rezeptor in Gegenwart und Abwesenheit von Transducer (Yoshida H. *et al.*, 2004), dass die Affinitäten zwischen dem Rezeptor und Transducer bei M- bzw. O-Intermediaten unterschiedlich sind. Der Transducer übt einen Einfluss auf die strukturellen Änderungen des Rezeptors aus.

Hierbei wird die Rolle der Asparaginsäure D75 wichtig. Diese negativ geladene Aminosäure stellt das Gegenion zu der protonierten Schiff Base dar. Die Protonierung erfolgt während des L-M-Übergangs. Wie die ESR-Untersuchungen (Klare *et al.*, 2004) zeigen, stellt der M1-M2-Übergang den aktiven Zustand des Rezeptors dar, bei dem die Signalübertragung stattfindet. Die Eliminierung des Gegenions durch Mutation der Position von D75 zu D75N verhindert die Bildung des M-Zustands. Die Arbeiten von Schmies *et al.*, Sudo *et al.* sowie Hein *et al.* haben gezeigt, dass diese Mutante bei der Transduceraktivierung den selben konformationellen Änderungen unterworfen ist und dass die Deprotonierung der Schiff Base nur beim Protonenpumpen eine Rolle spielt (Schmies *et al.*, 2000; Sudo *et al.*, 2002; Hein *et al.*, 2004).

Die ESR-Untersuchungen an L89R1^C sind sowohl am Wildtyp, als auch an der D75N- L89R1^C-Mutante durchgeführt worden. In beiden Fällen ist eine lichtinduzierte Mobilitätszunahme detektiert worden. Für die Seitenkette an der D75N-Mutante ist die Mobilitätszunahme stärker ausgeprägt als beim Wildtyp. Ein gegenläufiger Effekt konnte bei den Seitenketten L159R1^F und D75N- L159R1^F festgestellt werden. In diesem Fall ist die Zunahme der Mobilität bei der L159R1^F-Seitenkette signifikanter. Dieses deutet auf viel stärkere konformationelle Änderungen in der Helix F-Umgebung bei dem Wildtyp und in der Helix C-Umgebung bei der D75N-Mutante hin. Die ESR-Untersuchungen an L213R1^G sowie an D75N-L213R1^G zeigen nur eine vergleichsweise geringe Mobilitätszunahme nach einer Lichtaktivierung. Dieses unterstützt die Theorie der TM2-Aktivierung über die Auswärtsbewegung der Helix F, da sonst viel stärkere strukturelle Änderungen in der Helix G-Umgebung zu vermuten wären.

Die von Hippler-Mreyen mittels ITC gemessene Dissoziationskonstante K_D im Rezeptor-Transducer-Komplex $NpSR11/NpHtr11_{157}$ beträgt 163 nM (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003). Die Dissoziationskonstante vom dem Komplex im M-Zustand, detektiert von Sudo unter Anwendung von Laserblitzspektroskopie (Sudo *et al.*, 2002), beträgt 15 μ M. Dieses lässt darauf schließen, dass die Rezeptor-Transducer-Affinität des M-Intermediats viel schwächer ist, als im Grundzustand.

Die Bindungsstudien (Sudo *et al.*, 2002) an der D75N-Mutante mit dem Transducer im aktivierten Komplex weisen eine Dissoziationskonstante K_D von 146 nM auf. Dieser Wert ähnelt dem von Hippler-Mreyen gemessenen K_D -Wert für den Rezeptor-Transducer-Komplex in dem Grundzustand (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003).

Basierend auf den Fluoreszenzmessungen (Yoshida H. *et al.*, 2004) vermuten Yoshida und Mitarbeiter, dass die Helix F-Bewegung für die Eigenschaft des Rezeptors als Protonenpumpe essentiell ist und im Komplex in viel geringerem Ausmaß stattfindet. Die Untersuchungen mittels Blitzlichtphotolyse am Rezeptor bzw. am Komplex (Sudo *et al.*, 2006) zeigen, dass die Bewegung der Helix F ausschließlich in Abwesenheit von Transducer stattfindet. Dieses widerspricht jedoch den ESR-Studien (Wegener *et al.*, 2000; Wegener *et al.*, 2001; Klare *et al.*, 2004) sowie den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten.

Die ESR-Analysen von Cysteinmutanten bei tiefen Temperaturen haben lichtinduzierte Polaritätsänderungen für die Seitenketten $L89R1^C/L159R1^F$, $D75NL89R1^C/L159R1^F$ und $D75NL159R1^F/L213R1^G$ ergeben, wobei die Polarität für die Wildtypmutante abnimmt und für die D75N-Mutanten zunimmt. Die Intensität der Polaritätsänderung ist bei der $D75NL89R1^C/L159R1^F$ um Faktor 2 gegenüber der $D75NL159R1^F/L213R1^G$ größer. Die Abnahme der Polarität bei der $L89R1^C/L159R1^F$ ist um einen Faktor 10 geringer. Die Änderung der Polarität lässt sich grundsätzlich mit einer Bewegung der Spinseitenketten erklären. Der Rezeptor ist in die polaren Lipide rekonstituiert, die hydrophile Kopfgruppen und hydrophobe Seitenketten aufweisen. Je nach Richtung der Bewegung des Spinlabels kann sich die Umgebung ändern. Da die Messungen bei tiefen Temperaturen durchgeführt wurden, resultiert die Polaritätsänderung nicht aus einer Reorientierung der Seitenketten. Somit deutet das Ausmaß der Polaritätsänderung bei der $D75NL89R1^C/L159R1^F$ auf eine Verschiebung der Seitenketten hin und unterstützt die Theorie der Helix F Bewegung.

Die detektierten Abstandsänderungen zwischen zwei Seitenketten zeigen bei den Wildtyp-Cysteinmutanten eine lichtinduzierte Abstandsvergrößerung zwischen den Helices C und F. Im Fall von L89R1^C und L159R1^F um 0,4 nm, im Fall von L90R1^C und L159R1^F um 0,1 nm. Keine Abstandsänderungen konnten zwischen den Helices C und G sowie zwischen F und G detektiert werden.

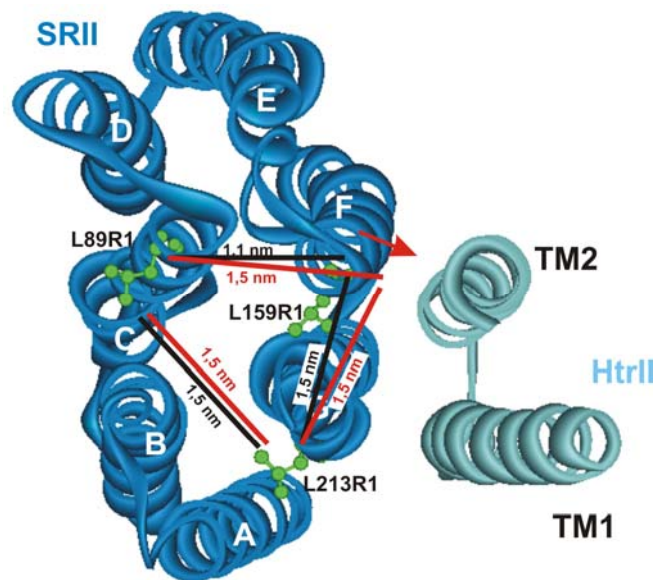


Abb. 4.4: Kristallstruktur des Rezeptor-Transducer-Komplexes [1H2S] mit entsprechenden Spinmarkierungen. Die Abstände basierend auf TT-ESR-Messungen zwischen zwei Seitenketten sind im Grundzustand (schwarz) und im M-Zustand (orange) dargestellt. Der rote Pfeil zeigt die Richtung der Auswärtsbewegung der Helix F zur Aktivierung der Transducerhelix TM2.

Ein Modell für die lichtinduzierte Rezeptoraktivierung ist in der Abbildung 4.4 dargestellt. Es ist der Rezeptor-Transducer-Komplex, basierend auf den Kristallstrukturdaten [1H2S] dargestellt. Die mittels TT-ESR-Messungen ermittelten Abstände im Grundzustand sind in schwarz, die im M-Zustand sind in rot dargestellt. Die ermittelten Abstandsänderungen stimmen mit der Theorie der Helix F Bewegung überein. Der vorgeschlagene Mechanismus der Aktivierung der Transducerhelix TM2 über die Helix F ist durch den roten Pfeil dargestellt.

Für die spinmarkierten Cysteinmutanten des SRIID75N-Rezeptors können lichtaktivierte Abstandsvergrößerungen zwischen den Helices C und G (0,2 nm), sowie zwischen F und G (0,1 nm) detektiert werden. In der Abbildung 4.5 sind die mittels TT-ESR-Daten ermittelten lichtinduzierten Abstandsänderungen des D75N-Rezeptors dargestellt. Die eingezeichneten Abstände in schwarz beschreiben die

Anordnung im Grundzustand. Die Abstände in orange zeigen die Distanzen nach einer Lichtaktivierung.

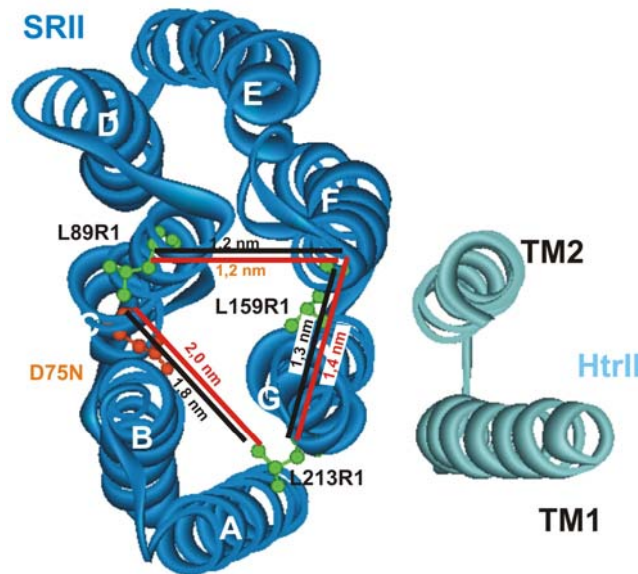


Abb. 4.5: Kristallstruktur des Rezeptor-Transducer-Komplexes [1H2S] mit entsprechenden Spinmarkierungen und D75N-Mutation. Die Abstände basierend auf TT-ESR-Messungen zwischen zwei Seitenketten sind im Grundzustand (schwarz) und im M-Zustand (orange) dargestellt.

Die detektierten Abstände sind vergleichsweise gering und lassen zur Zeit keine Modellbildung zu. Die ermittelten Daten widersprechen jedoch nicht der Theorie der Transduceraktivierung über die Auswärtsbewegung der Helix F. Die Vergrößerung des Abstandes zwischen den Helices C und G lässt zunächst vermuten, dass sich womöglich, entsprechend der Theorie der TM2-Aktivierung über die Helix G (Moukhametzianov *et al.*, 2006), die Helix G bewegt. Vergleicht man die Rezeptor-Transducer-Anordnung in Bezug auf Helix G und TM2 (Abb. 4.5), so müsste sich der Abstand zwischen den Helices F und G verkleinern, wenn die TM2-Aktivierung mittels Helix G induziert werden sollte. Dies ist jedoch nicht der Fall. Eine Bewegung der Helix G weg von der TM2 kann ausgeschlossen werden, da die Aktivierung sonst nicht stattfinden kann. Ebenso sprechen die relativ kleinen Amplituden bei den Transientenmessungen von D75N-L213R1G eher für eine Bewegung im Helix C-Bereich, als in dem Bereich von Helix G. Es ist wahrscheinlicher, dass sich die Helices C und F simultan bewegen, so dass sich der Abstand gegenüber dem Grundzustand nicht ändert.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Kristallstrukturuntersuchungen an dem Rhodopsin (Park *et al.*, 2008) überein. Sie zeigen eine Auswärtsbewegung der Helix 6, welche

der Nomenklatur für die Rezeptorhelix F entspricht, um 6-7 Å in Richtung der Helix 3, welche der Helix C am SRII entspricht. Zudem können Park et al. eine Bewegung um 2-3 Å der Helix 5 an Rhodopsin, analog zu Helix E am SRII, detektieren.

Die ESR-Untersuchungen haben gezeigt, dass die Signalübertragung vom Rezeptor zum Transducer während des M1-M2-Übergangs erfolgt (Klare *et al.*, 2004). Dazu wurden Transientenänderungen von den Komplexen *NpSRII-L159R1/NpHtrII₁₅₇* und *NpSRII/NpHtrII₁₅₇-V78R1* gemessen. Die Abbildung 4.6 zeigt das entsprechende Experiment. Die Transientenänderungen der Komplexe *NpSRII-L159R1/NpHtrII₁₅₇* und *NpSRII/NpHtrII₁₅₇-V78R1* (Abb. 4.6, *NpSRII-L159R1* blaues Spektrum, *NpHtrII₁₅₇-V78R1* rotes Spektrum) zeigen, dass während des M1- und M2-Übergangs die Konformationsänderungen beider Proteine simultan erfolgen. Die Relaxation in den Grundzustand ist jedoch entkoppelt. Der Rezeptor relaxiert etwa 200 ms schneller in seinen Grundzustand als der Transducer.

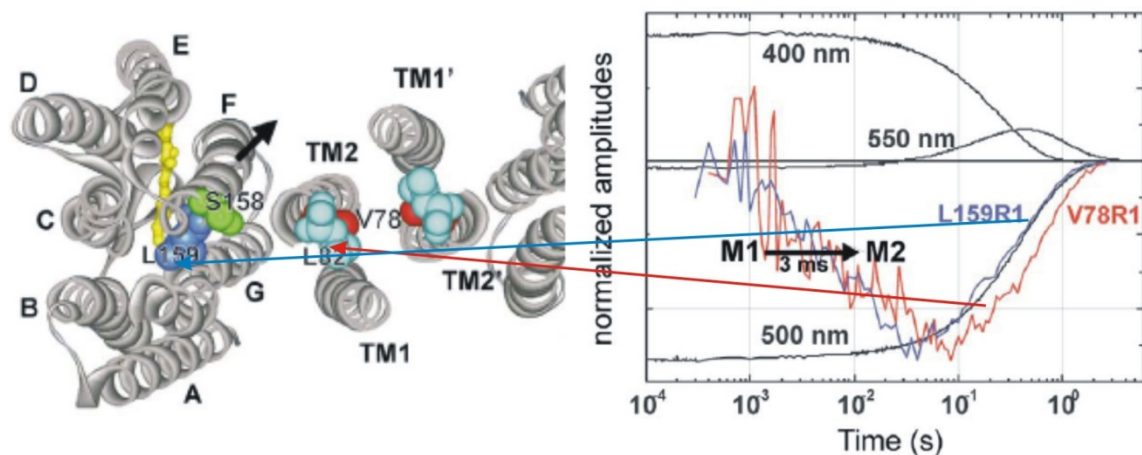


Abb. 4.5: Konformationsänderungen des Rezeptor/Transducerkomplexes. Rechts: Die Kristallstruktur des Rezeptor/Transducerkomplexes mit entsprechend markierten Positionen von eingeführten Spinlabels (L159R1 blau, S158R1 grün, V78R1 türkis). Links: ESR-Transientenänderungen für die Rezeptorseitenkette L159R1 (blau) und Transducerseitenkette V78R1 (rot) mit entsprechenden optischen Absorptionen (400nm: M-Intermediat, 550 nm: O-Intermediat, 500 nm: Grundzustand) (Klare *et al.*, 2004).

Die vergleichenden Experimente für die Aktivierung der Transducerhelix TM2 sind im Rahmen dieser Arbeit mit den spinmarkierten D75N-Mutanten durchgeführt worden. Es konnte gezeigt werden, dass die D75N-Mutante die Transducerhelix analog zum Wildtyp aktiviert. Die Rezeptor-Transducer-Entkopplung nach der Signalübertragung konnte nur bei der D75N-L89R1^C-Mutante beobachtet werden. Im Allgemeinen sind

bei dem D75N-Rezeptor im Vergleich zum Wildtyp wesentlich gravierende lichtinduzierte strukturelle Änderungen der Helix C detektiert worden.

Der genaue Mechanismus der Signalübertragung und die Rolle der Helix C bei der TM2-Aktivierung sind zurzeit noch unklar. Es steht jedoch fest, dass die in dieser Arbeit gewonnenen Daten bezüglich der Rezeptor-Transducer-Wechselwirkungen mit der Theorie der TM2-Aktivierung über die Auswärtsbewegung der Helix F übereinstimmen. Die Aufklärung der Phototaxis von *Natronobacterium pharaonis* kann als Modellsystem für die Signaltransduktion verstanden werden und kann einen Beitrag zur Aufklärung ähnlicher Systeme liefern. Die konformationellen Änderungen in Rezeptorproteinen sind essentiell für den Mechanismus der Signalübertragung.

4.2 ESR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung der HAMP-Domäne

Der zweite Schritt in der Signaltransduktionskaskade ist die Weiterleitung des, durch den Rezeptor empfangenen, Signals ins Zellinnere. Die Architektur des Transducers *NpHtrII* kann allgemein in vier Bereiche unterteilt werden, den transmembranen Teil, der Linkerregion, Methylierungs- und Signaldomänen. In der Membran formt der Transducer *NpHtrII* einen 2:2 Komplex mit dem Rezeptor *NpSRII*. Bereits die verkürzte Variante des Transducers (1-114) reicht aus, um die Protonenpumpe zu blockieren (Sudo *et al.*, 2001; Schmies *et al.*, 2001).

Die Struktur des transmembranen Bereiches ist durch die Kristallstruktur (Gordeliy *et al.*, 2002) bis einschließlich der Position 82 aufgeklärt. Die Struktur der darauf folgenden Linkerregion ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Die Linkerregion erfasst die so genannte HAMP-Domäne (histidine kinase, adenylyl cyclase, methyl-accepting chemotaxis proteins, phosphatase), welche für die Signaltransduktion verantwortlich ist. Basierend auf den NMR-Strukturuntersuchungen (Hulko *et al.*, 2006) sowie an Disulfidbrücken-Studien (Swain & Falke, 2007) an Chemorezeptoren ist eine parallele Vier-Helix-Bündelstruktur für die HAMP-Domäne vorgeschlagen.

Die HAMP-Domäne besteht aus zwei amphiphatischen Sequenzen AS1 (83-101) und AS2 (117-131), welche durch den *Connector*, bislang undefinierter Struktur, verbunden sind. Die wesentlichen strukturellen Unterschiede der HAMP-Domänen von Chemorezeptoren und archaebakteriellen Transducern sind in der *Connector*-Region zu finden (Swain *et al.*, 2007). Die AS1-Sequenz lässt sich in drei Segmente aufteilen, die sich durch eine unterschiedliche Sekundärstruktur und Dynamik

unterscheiden (Bordignon *et al.*, 2005). Die Sequenz (78-87) ist charakterisiert durch einen α -helikalen Bereich hoher Periodizität und dichter Packung. Für die darauf folgende Sequenz (88-94) ist ebenso eine α -helikale Struktur vorausgesagt (Klare, 2003), dieser unterscheidet sich jedoch von dem vorherigen Bereich durch eine höhere Mobilität.

Die strukturellen und dynamischen Eigenschaften des letzten Segments (95-101) unterscheiden sich durch eine starke Mobilität völlig von den vorherigen (Bordignon *et al.*, 2005). Die Sequenzabfolge Gly⁸³-Gly⁸⁴-Asp⁸⁵-Thr⁸⁶, insbesondere die aufeinander folgenden Glycine (Bordignon *et al.*, 2005), soll für die Unterbrechung der Periodizität verantwortlich sein (Yang and Spudich, 2001). Während die Eliminierung von Gly⁸⁴C keinen Einfluss auf die Funktionalität des Transducers ausübt, setzt der Austausch des Gly⁸³ durch Cystein bzw. Phenylalanin die Phototaxis vollständig außer Kraft (Yang *et al.*, 2001).

Die Untersuchungen zahlreicher halophiler Enzyme (Lanyi, 1974) haben gezeigt, dass sich die Struktur der Proteine je nach gewählten Bedingungen ändert. Die natürliche Umgebung der Halobakterien besteht aus hoher Salzkonzentration. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Funktionalität und die Stabilität der HAMP-Domäne stark von der Salzkonzentration abhängen (Bordignon *et al.*, 2005). Die α -helikale Struktur der HAMP-Domäne wird nur unter Hochsalzbedingungen (bis 4 M NaCl) vermutet, unter Niedrigsalzbedingungen liegt die sog. *molten-globule*-Struktur vor (Bordignon *et al.*, 2005). Die HAMP-Struktur unter Hochsalzbedingungen entspricht der nativen Struktur dieser Domäne. Sie ist sehr kompakt in ihrer Struktur und wird daher als cHAMP (compact) bezeichnet (Doebber *et al. in revision*). Die mehr dynamische und partiell ungeordnete Struktur der HAMP-Domäne unter Niedrigsalzbedingungen wird als dHAMP (dynamic) bezeichnet.

In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften der HAMP-Domäne bezüglich der koexistenten Struktur in Abhängigkeit von Salz untersucht. Dazu wurden ortsgerechte Mutagenesen mit anschließenden Spinmarkierungen an Positionen G118R1, A122R1 und A148R1 eingeführt. Da die Positionen in der AS1-Sequenz der HAMP-Domäne nahezu durchgehend untersucht sind (Bordignon *et al.*, 2005), wird im Rahmen dieser Arbeit die Struktur der AS2-Sequenz untersucht. Die AS2-Sequenz erstreckt sich von der Position 117 bis 131. Somit befinden sich die Spinmarkierungen G118R1 und A122R1 innerhalb dieser Sequenz. Die Position der

Spinmarkierung A148R1 liegt in einem Bereich unbekannter Struktur außerhalb der AS2-Sequenz.

Es konnte für alle drei Positionen eine starke Salzabhängigkeit der Mobilität festgestellt werden. Während die Seitenketten unter Niedrigsalzbedingungen (150 mM NaCl) eine sehr starke mobile Komponente aufweisen, wird diese bei einer Erhöhung der Salzkonzentration (3.5 M NaCl) enorm eingeschränkt. Besonders ist dieser Effekt für die Spinmarkierung von G118R1 zu beobachten. Wird die Ionenstärke erhöht, so verstärken sich die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren. Die ausgeprägte Einschränkung in der Mobilität in der Position G118R1 deutet auf die Ausbildung einer *coiled-coil*-Struktur hin.

Die Mobilitätseinschränkung unter Hochsalzbedingungen für die Seitenketten A122R1 und A148R1 ist nicht so stark ausgeprägt, wie für die Position G118R1. Daher kann nicht zwingend auf die Ausbildung einer *coil-coiled*-Struktur geschlossen werden. Der α -helikale Charakter nimmt jedoch mit zunehmender Salzkonzentration zu.

Der Strukturwechsel der Proteine ist ausschließlich auf die Salzkonzentration zurückzuführen. Um dies zu verifizieren wurden zu der A122R1-Proteinlösung unterschiedliche Additive zugegeben, um die Viskosität der Proteinlösung zu erhöhen bzw. um das Protein zu entfalten. Nach einer Erhöhung der Viskosität der Proteinlösung durch Zugabe einer 20 %igen Glycerinlösung in Gegenwart von 150 mM NaCl wurde die Mobilität der Seitenkette kaum beeinflusst. Dieses zeigt, dass die Struktur der Proteine bei einer hohen Salzkonzentration nicht aufgrund von Erhöhung der Viskosität beeinflusst wird.

Um die strukturelle Koexistenz der HAMP-Domäne zu demonstrieren wurde zu der Seitenkette A122R1 eine 6 M Harnstoff-Lösung in Abhängigkeit der Salzkonzentration titriert. Die Mobilität des Spinlabels unter Niedrigsalzbedingungen wurde nur geringfügig erhöht. Dieser kleine Einfluss von 6 M Harnstoff ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass das Protein bereits partiell entfaltet vorlag. Dasselbe Experiment unter Hochsalzbedingungen (3,5 M NaCl) zeigte eine stärkere Zunahme der Mobilität der Seitenkette. In Gegenwart von Salz bildet der Transducer stabile Helices aus, welche durch die Harnstoff-Lösung alleine nicht vollständig entfaltet werden können. Daher können die aus den ESR-Messungen gewonnenen Daten die Theorie der strukturellen Koexistenz von cHAMP und dHAMP bestätigen.

Die Aufklärung der Sekundärstruktur der HAMP-Domäne ist ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Signaltransduktionskaskade von Photorezeptoren. Die hohe strukturelle Homologie der Photorezeptoren zu Chemorezeptoren, deren Signaltransduktion als ein Zwei-Komponenten-System beschrieben wird, macht einen ähnlichen Mechanismus wahrscheinlich. Jedoch unterscheidet sich die HAMP-Domäne von Photorezeptoren, deren Struktur für die Funktionalität verantwortlich ist, strukturell von dem Linkerbeich der Chemorezeptoren. Daher ist die Aufklärung dieser Domäne zwingend zum Verständnis der Signaltransduktion von Photorezeptoren notwendig.

4.3 Expressed Protein Ligation von Transducerfragmenten

Der Aufklärung der Struktur und Funktion von Proteinen sind viele molekularbiologische Studien gewidmet. Oft sind Standardmodifikationen, wie Spinmarkierung, Fluoreszenzmarkierung oder Isotopenmarkierung limitiert. Die Einführung von unnatürlichen Aminosäuren war vor einiger Zeit nur mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS) möglich. Diese ist jedoch stark größenlimitiert (~ 50 Aminosäuren) (Muir *et al.*, 1998).

Die Methode der nativen chemischen Ligation (NCL) erlaubt es zwei synthetisch hergestellte Peptide durch eine chemoselektive Reaktion mit einander zu einer nativen Peptidbindung zu verknüpfen (Dawson *et al.*, 1994; Muir, 1995). Dies eröffnete neue Möglichkeiten zur Herstellung von Proteinen sowie deren Modifikation und macht es möglich Proteine bis zu ~ 15 kDa synthetisch herzustellen (Muir *et al.*, 1998).

Die Methode der *Expressed-Protein-Ligation* (EPL) ist eine Weiterentwicklung der NCL (Muir *et al.*, 1998; Muralidharan *et al.*, 2006). Bei der EPL können ein oder beide zu ligierende Peptide bzw. Proteinsegmente durch Expression hergestellt werden, was die semisynthetische Herstellung der Proteine größenunabhängig macht.

Die NCL und EPL wurden vielfach angewendet an kleinen und großen Proteinen (Dawson *et al.*, 1994; Muir, 1995; Muir *et al.*, 1998; Severinov *et al.*, 1998; David *et al.*, 2004; Hauser *et al.*, 2007; Olschewski *et al.*, 2007). Das Prinzip der nativen chemischen Ligation ist ein nukleophiler Angriff der N-terminalen Cysteinseitenkette

auf einen C-terminalen Aktivthioester. Infolgedessen erfolgt eine intramolekulare Umlagerung unter Ausbildung einer nativen Peptidbindung.

Generell müssen bei der EPL viele Faktoren beachtet werden. Die Proteinfaltung spielt eine wichtige Rolle, da die Ligationsstelle zugänglich sein muss. Eine Möglichkeit ist die Ligation unter denaturierenden Bedingungen durchzuführen, welche den Nachteil einer erforderlichen Rückfaltung mit sich bringt. Für die Ligation unter nativen Bedingungen sollten, falls möglich, die Ligationsstellen so gewählt werden, dass sie zwischen zwei von einander unabhängigen gefalteten Domänen liegen (Muralidharan *et al.*, 2006).

Für die Herstellung des inteinfusionierten Proteins ist es von größter Bedeutung das richtige Intein zu verwenden. Zurzeit stehen mehr als hundert Inteine zur Verfügung (Perler *et al.*, 2000). Die Inteine funktionieren jedoch ausschließlich wenn sie richtig gefaltet sind. Manche Inteine dulden keine Zusätze, wie Chaotrope und Detergentien in der Proteinlösung.

Am meisten verwendet wird das *Mycobacterium xenopi* DNA gyrase A Intein (MXE GyrA). Dieses Intein hat sehr viele positive Eigenschaften, wie eine geringe Größe (198 Aminosäuren). Es kann mit unterschiedlichen Thiolen abgespalten werden, ist stabil bei Zugabe von Additiven wie Detergenzien oder geringen Konzentrationen von organischen Lösungsmittel und lässt sich relativ einfach zurückfalten (Muralidharan *et al.*, 2006).

Unter Anwendung der EPL konnten z.B. Fluoreszenzlabel in die SH3-Domäne in das Crk-Protein eingeführt werden um die Ligandbindungseigenschaften zu studieren (Muralidharan *et al.*, 2004). Die NMR-Studien von großen Proteinen machen aufgrund der Fülle an Signalen die Zuordnung sehr schwierig. Die EPL bietet die Möglichkeit einer segmentellen Isotopenmarkierung, wie es anhand der β -Untereinheit von H-ATPase demonstriert wurde (Yagi *et al.*, 2004) sowie am Beispiel der Phospholipase A2 (Tatulian *et al.*, 2005) gezeigt wurde. Die postranslationale Modifikation am Beispiel der GPTase YPT1 (Rak *et al.*, 2003) sowie die Einführung unnatürlicher Aminosäuren am KcsA Kaliumkanal (Valiyaveetil *et al.*, 2004) sind ebenfalls unter Anwendung von EPL durchgeführt worden.

Die Methode der proteinchemischen Ligation von löslichen Proteinen ist weitestgehend etabliert (Kochendoerfer *et al.*, 2005). Die Ligation von Membranproteinen ist zurzeit noch nicht optimiert. Viele hydrophobe Peptide bzw. Proteinsegmente ligieren ineffizient oder gar nicht, was oft eine Folge der

Unlöslichkeit oder Aggregation ist. Ligation von Membranproteinen bedarf einer Optimierung vieler Aspekte, wie z.B. Ligationsmedium, Ligationszeit, Aktivierungreagentien, Löslichkeitsvermittler, Ligationsdauer, Temperatur und pH-Wert. Daher stellte die Semisyntese der verkürzten Transducerproteine *NpHtrII*₁₁₄ und *NpHtrII*₁₅₇ eine Herausforderung dar. Zu den Schwierigkeiten gehört, dass die Ligationstelle (A95) in einer α -helicalen *coil-coiled*-Region liegt. Der Thioester (1-94SR), welcher als MXEGyrA-Fusionsprotein exprimiert wird, ist ein Membranprotein und ist nur bei Zugabe von Detergenz löslich. Das Detergenz bildet Mizellen und erschwert zusätzlich die Zugänglichkeit der Transducersegmente 95C-114 und 95C-157, welche zum zytoplasmatischen Teil des Transducers gehören und daher löslich sind.

Um das Problem der Zugänglichkeit zu umgehen, erfolgte die Ligation in Lipiden. Die Lipide bauen das membranständige N-terminale Transducersegment in die Lipiddoppelschicht ein, wobei das C-terminale Ende aus den Lipiden herausragt und damit die Zugänglichkeit für das Peptid ermöglicht.

Da das Intein löslich ist, wird nur der transmembrane Teil des Transducers in die Lipide eingebaut. Die Rekonstitution in die Lipide, die Thioestergenerierung sowie die Ligation erfolgen *in situ*. Die Ligation erfolgt unter basischen Bedingungen (pH 8), was eine Gefahr der Hydrolyse des Aktivesters mit sich bringt. Die Hydrolyse wird jedoch durch die simultane Reaktion weitestgehend unterdrückt. Weiterhin hat die Ligation in Lipiden den Vorteil einer konzentrierten Kontaktfläche. In Lösung müsste die Konzentration der Proteine sehr hoch sein, um Effizient zu sein.

Mit dieser Methode der Ligation konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei Transducerkonstrukte semisynthetisch unter nativen Bedingungen hergestellt werden. Es konnten Ausbeuten von 51 % im Falle von HtrII(1-94)-Cys-(96-114) und 63 % bei HtrII(1-94)-Cys-(96-157) erzielt werden. Die Faltung der Ligationsprodukte wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht und mit Wildtyp verglichen. Beide Ligationsprodukte weisen eine α -helikale Struktur auf. Bei dem längeren Konstrukt HtrII(1-94)-Cys-(96-157) konnte analog zum Wildtyp *NpHtrII*₁₅₇-His eine Salzabhängigkeit festgestellt werden. Der α -helikale Charakter ist bei 4 M KCl-Konzentration stärker ausgeprägt.

Weiterhin konnten die Funktionalitäten der Ligationsprodukte durch Bindungsstudien mit dem Rezeptor demonstriert werden. Die Dissoziationskonstante bei dem

Ligationsprodukt HtrII(1-94)-Cys-(96-114) beträgt 237 nM, die von dem Wildtyp *NpHtrII*₁₁₄-His liegt bei 230 nM (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003).

Bei dem Ligationsprodukt HtrII(1-94)-Cys-(96-157) beträgt die Dissoziationskonstante 166 nM, die von dem Wildtyp *NpHtrII*₁₅₇-His 160 nM. Damit konnte gezeigt werden, dass die Ligation weder die Struktur noch die Funktion der Transducerproteine beeinträchtigt hat. Die Ligationsprodukte entsprechen den der Wildtypproteine mit Ausnahme der Ligationsstelle (95), die statt Alanin ein Cystein trägt.

4.4 Wechselwirkungen zwischen Rhodopsin und *peptide 18*

Protein-Protein-Wechselwirkungen spielen eine Schlüsselrolle bei allen Prozessen der Signaltransduktion. Die Wechselwirkung des visuellen Rhodopsins mit dem Transducin gehört zu dem inizierenden Teil der visuellen Signaltransduktionskaskade (Vogel *et al.*, 2007). Nach einer Lichtaktivierung des Rhodopsins erfolgt eine Isomerisierung des Retinals von der 11-*cis* zur all-*trans*-Konfiguration. Rhodopsin bindet in seinem aktiven Meta II-Zustand die α -Untereinheit des G-Proteins Transducin (Gt) (Janz *et al.*, 2004) und initiiert damit den Austausch von GDP durch GTP. Die so aktivierte α -Untereinheit des Transducins aktiviert seinerseits die Phosphodiesterase (PDE), welche die Signale weiter ins Zellinnere weiterleitet (Bruckert *et al.*, 1992).

Die Wechselwirkung des Transducins mit dem Rhodopsin, insbesondere die dabei eintretenden konformationellen Änderungen ist von großem Interesse. Rhodopsin führt eine lichtinduzierte Helix F Bewegung aus, welche einen hydrophoben Bereich freilegt und so die Bindung von Transducin ermöglicht (Janz *et al.*, 2004). Die Studien der konformationellen Änderungen des Transducin liefern unterschiedliche Ergebnisse (Vogel *et al.*, 2007). So zeigen NMR-Bindungsstudien (Kisselev *et al.*, 1998; Koenig *et al.*, 2002; Kisselev *et al.*, 2003) von Peptidanaloga des Transducins mit Rhodopsin, dass bei der Bindung eine konformationelle Änderung des Transducinbindungsmotivs stattfindet. Die zunächst ungeordnete Struktur faltet sich während der Wechselwirkung mit Rhodopsin α -helikal. Die Kristallstrukturuntersuchungen (Lambright *et al.*, 1996) dagegen stellen keinen strukturellen Wechsel des Bindungsmotivs fest.

Um die strukturellen Änderungen des Transducins bei der Bindung an Rhodopsin zu studieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Bindungsstudien mit dem Peptidanalogen *peptide 18* unter Anwendung der FTIR-Spektroskopie durchgeführt. Das Peptidanalogen mit der Sequenz MLENLKDCGLF stimmt zu 80 % mit dem Bindungsmotiv des Transducins überein. Die Differenzspektren von aktiviertem Rhodopsin mit und ohne Peptidanalogen zeigen anhand der Amid I- und Amid II-Banden bei 1650 cm^{-1} und 1550 cm^{-1} die strukturellen Änderungen. Die Amid I-Absorption resultiert aus der C=O Streckschwingung der Peptidbindung. Die Amid II-Bande beschreibt die C-N-Streckschwingung.

Das Peptidanalogen wurde ^{13}C und ^{15}N isotoopenmarkiert sowie nicht markiert eingesetzt. Aufgrund der schwereren Atommassen beim isotoopenmarkierten Peptidanalogen resultieren Absorptionsverschiebungen in FTIR-Differenzspektren, die nur auf strukturelle Änderungen des Peptids zurückzuführen sind. Die Differenzspektren des gebildeten Rhodopsin-Peptid-Komplexes unterscheiden sich von denen von Rhodopsin in Gegenwart von Peptid. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass das Peptid eine strukturelle Änderung bei der Bindung an Rhodopsin vollzieht.

Die FTIR-Bindungsstudien haben in Übereinstimmung mit NMR-Strukturuntersuchungen (Kisselev *et al.*, 1998; Koenig *et al.*, 2002; Kisselev *et al.*, 2003) gezeigt, dass das Peptidanalogen *peptide 18* eine konformationelle Änderung bei der Bindung an Rhodopsin durchführt.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Studien zur Erforschung der bakteriellen Signaltransduktion durchgeführt. Der initiierte Teil der Signaltransduktion ist die Aktivierung der Transducerhelix TM2 über den aktivierten Rezeptor. Diese TM2-Aktivierung erfolgt mechanisch über die konformationellen Änderungen des Rezeptors. Aufgrund der Architektur des Rezeptor-Transducer-Komplexes, welche eine Kontaktfläche zwischen den Rezeptorhelices F und G mit der Transducerhelix TM2 bildet, besteht die Möglichkeit der TM2-Aktivierung durch beide Rezeptorhelices. Die Theorie der TM2-Aktivierung über die Helix G basierend auf Kristallstrukturuntersuchungen (Moukhametzianov *et al.*, 2006) konnte weitestgehend widerlegt werden. Die ESR-Untersuchungen (Wegener *et al.*, 2000; Wegener *et al.*, 2001; Klare *et al.*, 2004; Bordignon *et al.*, 2007) zeigen eine Aktivierung der TM2-Helix über die Auswärtsbewegung der Helix F. In dieser Arbeit wurden Cysteinmutationen in den Wildtyprezeptor sowie in die D75N-Mutante eingeführt. Die Untersuchungen an der D75N-Mutante sollen die strukturellen Änderungen im Rezeptor im Komplex mit dem Transducer anzeigen, jedoch ohne die Bildung von dem signalgebenden M-Intermediat. Die eingeführten Cysteinmutationen wurden mit MTS-Spinlabel markiert. Um den Einfluss der Mutationen auf die Funktionalität des Rezeptors auszuschließen erfolgten Photozyklusmessungen. Die Mutationen haben lediglich einen geringen Einfluss auf die Dauer einzelner Intermediate, beeinflussen die Funktionalität des Rezeptors jedoch nicht. Durch die Raumtemperatur-ESR-Messungen konnten die Mobilitäten der Seitenketten im Grundzustand untersucht werden. Die Transientenmessungen gaben Auskunft über die lichtinduzierten Mobilitäten der Spinmarkierungen. Die Tieftemperatur-ESR-Untersuchungen beschreiben die Änderungen der Abstände sowie der Umgebung nach einer Lichtaktivierung des Rezeptors. Alle gewonnenen Ergebnisse stimmen mit der Theorie der Aktivierung der Transducerhelix TM2 über die Auswärtsbewegung der Rezeptorhelix F.

Die ESR-spektroskopischen Untersuchungen der HAMP-Domäne haben eine starke Salzabhängigkeit der Transducerstruktur gezeigt. Es konnte gezeigt werden, dass die Struktur der HAMP-Domäne unter Niedrigsalzbedingungen partiell entfaltet vorliegt. Mit Erhöhung der Salzkonzentration nimmt der α -helicale Charakter des Transducers zu. Dieses unterstützt die Theorie einer koexistenten Struktur der

HAMP-Domäne als *molten-globule*-Struktur (*dHAMP*) unter Niedrigsalzbedingungen und α -helikalen Struktur (*cHAMP*) unter Hochsalzbedingungen.

Für die semisynthetische Herstellung von den Transducerkonstrukten HtrII(1-94)-Cys-(96-114) und HtrII(1-94)-Cys-(96-157) wurde die Methode der *Expressed-Protein-Ligation* (EPL) angewendet. Das N-terminale Fragment des Transducers wurde als HtrII(1-94)-MXE-His-Fusionskonstrukt exprimiert. Die C-terminalen Fragmente sind als Fusionsproteine GST-TEV-HtrII(A95C-114) und GST-TEV-HtrII(A95C-157) exprimiert worden. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Methode für die Ligation transmembraner Proteine in polaren Lipiden erarbeitet und optimiert werden. Die Ligationskonstrukte weisen eine α -helikale Struktur analog zu jeweiligen Wildtypproteinen auf. Die Bindungsstudien mit Rezeptor haben eine biologisch relevante Funktionalität der Ligationsprodukte demonstriert.

Aufgrund der Diskrepanzen von NMR-Studien und Kristallstrukturuntersuchungen bezüglich der strukturellen Änderungen der α -Untereinheit des Transducins wurden im Rahmen dieser Arbeit Bindungsstudien von dem Transducinpeptidanalogen *Peptide 18* und visuellen Rhodopsin unter Anwendung der FTIR-Spektroskopie durchgeführt. Es konnte in Übereinstimmung mit NMR-Untersuchungen gezeigt werden, dass das Peptidanalogen des Transducins eine konformationelle Änderung bei der Bindung an Rhodopsin eingeht.

6. Literatur

1. Alam, T.M. and Oesterhelt, D. (1984). Morphology, function and isolation of halobacterial flagella. *Journal of Molecular Biology*, **15**, 459-475.
2. Appleman, J.A. and Stewart, V. (2003). Mutational Analysis of a Conserved Signal-Transducing Element: the HAMP Linker of the Escherichia coli Nitrate Sensor NarX. *J. Bacteriol.*, **185**, 89-97.
3. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, New York.
4. Bergo, V., Spudich, E.N., Spudich, J.L., and Rothschild, K.J. (2003). Conformational Changes Detected in a Sensory Rhodopsin II-Transducer Complex. *J. Biol. Chem.*, **278**, 36556-36562.
5. Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
6. Bockaert, J. and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO Journal*, **18**, 1723-1729.
7. Bordignon, E., Klare, J.P., Doebber, M., Wegener, A.A., Martell, S., Engelhard, M., and Steinhoff, H.J. (2005). Structural analysis of a hamp domain: The linker region of the phototransducer in complex with sensory Rhodopsin II. *J. Biol. Chem.* **280**, 38767-38775.
8. Bordignon, E., Klare, J.P., Holterhues, J., Martell, S., Krasnaberski, A., Engelhard, M., and Steinhoff, H.J. (2007). Analysis of Light-Induced Conformational Changes of Natronomonas pharaonis Sensory Rhodopsin II by Time Resolved Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, **83**, 1-10.
9. Bruckert, F., Chabre, M., and Vuong, T.M. (1992). Kinetic analysis of the activation of transducin by photoexcited rhodopsin. Influence of the lateral diffusion of transducin and competition of guanosine diphosphate and guanosine triphosphate for the nucleotide site. *Biophys. J.*, **63**, 616-629.
10. Chen Xinpu and 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.
11. Chizhov, I., Chernavskii, D.S., Engelhard, M., Mueller, K.H., Zubov, B.V., and Hess, B. (1996). Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.*, **71**, 2329-2345.

12. Chizhov,I. and Engelhard,M. (2001). Temperature and Halide Dependence of the Photocycle of Halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*. *Biophys. J.*, **81**, 1600-1612.
13. Chizhov,I., Schmies,G., Seidel,R., Sydor,J.R., Luttenberg,B., and 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.
14. David,R., Richter,M.P.O., and Beck-Sickinger,A.G. (2004). Expressed protein ligation. Method and applications. *European Journal of Biochemistry*, **271**, 663-677.
15. Dawson,P.E., Muir,T.W., Clark-Lewis,I., and Kent,S.B. (1994). Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, **266**, 776-779.
16. Dole,M., Mack,L.L., Hines,R.L., Mobley,R.C., Ferguson,L.D., and Alice,M.B. (1968). Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics*, **49**, 2240-2249.
17. Dower,W.J., Miller,J.F., and Ragsdale,C.W. (1988). High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 6127-6145.
18. Dunham,T.D. and Farrens,D.L. (1999). Conformational Changes in Rhodopsin. Movement of Helix F detected by Site-Specific Chemical Labeling and Fluorescence Spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1683-1690.
19. Ehresmann,B., Imbault,P., and Well,J.H. (1973). Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Analytical Biochemistry*, **54**, 454-463.
20. Eisenbach M (1996). Control of bacterial chemotaxis. *Molecular Microbiology*, **20**, 903-910.
21. Fenn,J.B. (2002). Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began. *J Biomol Tech*, **13**, 101-118.
22. Gordeliy,V.I., Labahn,J., Moukhametzianov,R., Efremov,R., Granzin,J., Schlesinger,R., Buldt,G., Savopol,T., Scheidig,A.J., Klare,J.P., and Engelhard,M. (2002). Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex. *Nature*, **419**, 484-487.
23. Greenfieldi N. and Fasman G.D. (1969). Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry*, **8**, 4108-4116.
24. Hackeng,T.M., Griffin,J.H., and Dawson,P.E. (1999). Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology. *PNAS*, **96**, 10068-10073.
25. Hamm,H.E. (2001). How activated receptors couple to G proteins. *PNAS*, **98**, 4819-4821.

26. Hauser,P.S. and Ryan,R.O. (2007). Expressed protein ligation using an N-terminal cysteine containing fragment generated in vivo from a pelB fusion protein. *Protein Expression and Purification*, **54**, 227-233.
27. Hein,M., Radu,I., Klare,J.P., Engelhard,M., and Siebert,F. (2004). Consequences of Counterion Mutation in Sensory Rhodopsin II of *Natronobacterium pharaonis* for Photoreaction and Receptor Activation: An FTIR Study. *Biochemistry*, **43**, 995-1002.
28. Hein,M., Wegener,A.A., Engelhard,M., and Siebert,F. (2003). Time-Resolved FTIR Studies of Sensory Rhodopsin II (NpSRII) from *Natronobacterium pharaonis*: Implications for Proton Transport and Receptor Activation. *Biophys. J.*, **84**, 1208-1217.
29. Hesse M., Meier H., and Zeeh B. (1995). *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag.
30. Hildebrand,E.I.L.O. and Dencher,N.O.R.B. (1975). Two photosystems controlling behavioural responses of *Halobacterium halobium*. *Nature*, **257**, 46-48.
31. Hippler-Mreyen,S., Klare,J.P., Wegener,A.A., Seidel,R., Herrmann,C., Schmies,G., Nagel,G., Bamberg,E., and Engelhard,M. (2003). Probing the Sensory Rhodopsin II Binding Domain of its Cognate Transducer by Calorimetry and Electrophysiology. *Journal of Molecular Biology*, **330**, 1203-1213.
32. Ho,S.N., Hunt,H.D., Horton,R.M., Pullen,J.K., and Pease,L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59.
33. Hubbell,W.L. and Altenbach,C. (1994). Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling. *Current Opinion in Structural Biology*, **4**, 566-573.
34. Hulko,M., Berndt,F., Gruber,M., Linder,J.U., Truffault,V., Schultz,A., Martin,J., Schultz,J.E., Lupas,A.N., and Coles,M. (2006). The HAMP Domain Structure Implies Helix Rotation in Transmembrane Signaling. *Cell*, **126**, 929-940.
35. Janz,J.M. and Farrens,D.L. (2004). Rhodopsin Activation Exposes a Key Hydrophobic Binding Site for the Transducin {alpha}-Subunit C Terminus. *J. Biol. Chem.*, **279**, 29767-29773.
36. Kamada,K., Furutani,Y., Sudo,Y., Kamo,N., and Kandori,H. (2006). Temperature-Dependent Interactions between Photoactivated *Pharaonis* Phoborhodopsin and Its Transducer. *Biochemistry*, **45**, 4859-4866.
37. Kapust,R.B., Tozser,J., Copeland,T.D., and Waugh,D.S. (2002). The P1′ specificity of tobacco etch virus protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294**, 949-955.

38. Kisselev, O.G. and Downs Maureen A. (2003). Rhodopsin Controls a Conformational Switch on the Transducin γ Subunit. *Structure*, **11**, 367-373.
39. Kisselev, O.G., Kao, J., Ponder, J.W., Fann, Y.C., Gautam, N., and Marshall, G.R. (1998). Light-activated rhodopsin induces structural binding motif in G protein alpha subunit. *PNAS*, **95**, 4270-4275.
40. Klare, J.P., Gordeliy, V.I., Labahn, J., Büldt, G., Steinhoff, H.J., and Engelhard, M. (2004). The archaeal sensory rhodopsin II/transducer complex: a model for transmembrane signal transfer. *FEBS Letters*, **564**, 219-224.
41. Klare, J. P. Strukturelle und funktionelle Untersuchungen des photophoben Rezeptor/Transducer-Komplexes aus *Natronobacterium pharaonis*. 2003. Universität Dortmund.
42. Klare, J.P., Bordignon, E., Doebber, M., Fitter, J., Kriegsmann, J., Chizhov, I., Steinhoff, H.J., and Engelhard, M. (2006). Effects of Solubilization on the Structure and Function of the Sensory Rhodopsin II/Transducer Complex. *Journal of Molecular Biology*, **356**, 1207-1221.
43. Klare, J.P., Schmies, G., Chizhov, I., Shimono, K., Kamo, N., and Engelhard, M. (2002). Probing the Proton Channel and the Retinal Binding Site of *Natronobacterium pharaonis* Sensory Rhodopsin II. *Biophys. J.*, **82**, 2156-2164.
44. Kochendoerfer, G.G., Clayton, D., and Becker, C. (2005). Chemical Synthesis Approaches to the Engineering of Ion Channels. *Protein & Peptide Letters*, **12**, 737-741.
45. Koenig, B.W., Kontaxis Georg, Mitchell Drake C., Louis, J.M., Litman Burton J., and Bax Ad (2002). Structure and Orientation of a G Protein Fragment in the Receptor Bound State from Residual Dipolar Couplings. *Journal of Molecular Biology*, **322**, 441-461.
46. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
47. Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature*, **379**, 311-319.
48. Lanyi, J.K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **38**, 272-290.
49. LeMoual, H. and Koshland, D.E.J. (1996). Molecular Evolution of the C-terminal Cytoplasmic Domain of a Superfamily of Bacterial Receptors Involved in Taxis. *Journal of Molecular Biology*, **261**, 585.

50. Li Jade, Edwards Patricia C., Burghammer Manfred, Villa,C., and Schertler,G.F.X. (2004). Structure of Bovine Rhodopsin in a Trigonal Crystal Form . *Journal of Molecular Biology*, **343**, 1409-1438.
51. Luecke,H., Schobert,B., Richter,H.T., Cartailler,J.P., and Lanyi,J.K. (1999). Structural Changes in Bacteriorhodopsin During Ion Transport at 2 Å Resolution. *Science*, **286**, 255-260.
52. Moukhametzianov,R., Klare,J.P., Efremov,R., Baeken,C., Göppner,A., Labahn,J., Engelhard,M., Büldt,G., and Gordeliy,V.I. (2006). Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer. *Nature*, **440**, 115-119.
53. Muir,T.W. (1995). A chemical approach to the construction of multimeric protein assemblies. *Structure*, **3**, 649-652.
54. Muir,T.W., Sondhi,D., and Cole,P.A. (1998). Expressed protein ligation: A general method for protein engineering. *PNAS*, **95**, 6705-6710.
55. Muralidharan,V., Cho,J., Trester-Zedlitz,M., Kowalik,L., Chait,B.T., Raleigh,D.P., and Muir,T.W. (2004). Domain-Specific Incorporation of Noninvasive Optical Probes into Recombinant Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 14004-14012.
56. Muralidharan,V. and Muir,T.W. (2006). Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins. *Nat Meth*, **3**, 429-438.
57. Oesterhelt,D. and Marwan,W. (2005). Salz in der Suppe des Lebens. *Biospektrum*, **1**, 60-62.
58. Olschewski,D., Seidel,R.P., Miesbauer,M., Rambold,A.S., Oesterhelt,D., Winklhofer,K.F., Tatzelt,J., Engelhard,M., and Becker,F.W. (2007). Semisynthetic Murine Prion Protein Equipped with a GPI Anchor Mimic Incorporates into Cellular Membranes. *Chemistry & Biology*, **14**, 994-1006.
59. Oprian,D.D. (2003). Phototaxis, chemotaxis and the missing link. *Trends in Biochemical Sciences*, **28**, 167-169.
60. Palczewski,K., Kumasaka,T., Hori,T., Behnke,C.A., Motoshima,H., Fox,B.A., Trong,I.L., Teller,D.C., Okada,T., Stenkamp,R.E., Yamamoto,M., and Miyano,M. (2000). Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science*, **289**, 739-745.
61. Pande,V.S. and Rokhsar,D.S. (1998). Is the molten globule a third phase of proteins? *PNAS*, **95**, 1490-1494.
62. Park,J.H., Scheerer,P., Hofmann,K.P., Choe,H.W., and Ernst,O.P. (2008). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*.

63. Perler,F. and Bartl,F. (2000). Protein splicing and its applications. *Current Opinion in Biotechnology*, **11**, 377-383.
64. Rak,A., Pylypenko,O., Durek,T., Watzke,A., Kushnir,S., Brunsveld,L., Waldmann,H., Goody,R.S., and Alexandrov,K. (2003). Structure of Rab GDP-Dissociation Inhibitor in Complex with Prenylated YPT1 GTPase. *Science*, **302**, 646-650.
65. Rink,T., Riese,J., Oesterhelt,D., Gerwert,K., and Steinhoff,H.J. (1997). Spin-labeling studies of the conformational changes in the vicinity of D36, D38, T46, and E161 of bacteriorhodopsin during the photocycle. *Biophys. J.*, **73**, 983-993.
66. Rink,T., Pfeiffer,M., Oesterhelt,D., Gerwert,K., and Steinhoff,H.J. (2000). Unraveling Photoexcited Conformational Changes of Bacteriorhodopsin by Time Resolved Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Biophys. J.*, **78**, 1519-1530.
67. Sambrook,J., Maniatis T, and Fritsch,E.F. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
68. Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *PNAS*, **74**, 5463-5467.
69. Sasaki,J. and Spudich,J.L. (1999). Proton Circulation During the Photocycle of Sensory Rhodopsin II. *Biophys. J.*, **77**, 2145-2152.
70. Schägger,H. and Jagow,G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 KDa. *Analytical Biochemistry*, **166**, 368-379.
71. Schägger,H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protocols*, **1**, 16-22.
72. Schiffer Eric. Domain specific isotope labelling of membrane proteins NMR and FTIR spectroscopy of SRII/HtrII complexes from Natronobacterium pharaonis. 2005.
73. Schmies,G., Engelhard,M., Wood,P.G., Nagel,G., and Bamberg,E. (2001). Electrophysiological characterization of specific interactions between bacterial sensory rhodopsins and their transducers. *PNAS*, **98**, 1555-1559.
74. Schmies,G., Luttenberg,B., Chizhov,I., Engelhard,M., Becker,A., and Bamberg,E. (2000). Sensory Rhodopsin II from the Haloalkaliphilic Natronobacterium pharaonis: Light-Activated Proton Transfer Reactions. *Biophys. J.*, **78**, 967-976.
75. Schuster,S.C., Swanson,R.V., Alex,L.A., Bourret,R.B., and Simon,M.I. (1993). Assembly and function of a quaternary signal transduction complex monitored by surface plasmon resonance. *Nature*, **365**, 343-347.

76. Seidel,R., Scharf,B., Gautel,M., Kleine,K., Oesterhelt,D., and 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. *PNAS*, **92**, 3036-3040.
77. Severinov,K. and Muir,T.W. (1998). Expressed Protein Ligation, a Novel Method for Studying Protein-Protein Interactions in Transcription. *J. Biol. Chem.*, **273**, 16205-16209.
78. Spudich,J.L. and Bogomolni,R.A. (1984). Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature*, **312**, 509-513.
79. Subramaniam,S. and Henderson,R. (2000). Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin. *Nature*, **406**, 653-657.
80. Sudo,Y., Iwamoto,M., Shimono,K., and Kamo,N. (2002). Association between a photo-intermediate of a M-lacking mutant D75N of *pharaonis* phoborhodopsin and its cognate transducer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **67**, 171-176.
81. Sudo,Y., Furutani,Y., Kandori,H., and Spudich,J.L. (2006). Functional Importance of the Interhelical Hydrogen Bond between Thr204 and Tyr174 of Sensory Rhodopsin II and Its Alteration during the Signaling Process. *J. Biol. Chem.*, **281**, 34239-34245.
82. Sudo,Y., Iwamoto,M., Shimono,K., Sumi,M., and Kamo,N. (2001). Photo-Induced Proton Transport of Pharaonis Phoborhodopsin (Sensory Rhodopsin II) is ceased by Association with the Transducer. *Biophys. J.*, **80**, 916-922.
83. Swain,K.E. and Falke,J.J. (2007). Structure of the Conserved HAMP Domain in an Intact, Membrane-Bound Chemoreceptor: A Disulfide Mapping Study. *Biochemistry*, **46**, 13684-13695.
84. Takahashi,T., Broecker,W.S., and Langer S. (1985). Redfield ratio based on chemical data from isopycnal surfaces. *Journal of Geophysical Research*, **90**, 6907-6924.
85. Tatulian,S.A., Qin,S., Pande,A.H., and He,X.M. (2005). Positioning Membrane Proteins by Novel Protein Engineering and Biophysical Approaches. *Journal of Molecular Biology*, **351**, 939-947.
86. Valiyaveetil,F.I., Sekedat,M., MacKinnon,R., and Muir,T.W. (2004). Glycine as a D-amino acid surrogate in the K⁺-selectivity filter. *PNAS*, **101**, 17045-17049.
87. Vogel,R., Martell,S., Mahalingam,M., Engelhard,M., and Siebert,F. (2007). Interaction of a G Protein-coupled Receptor with a G Protein-derived Peptide Induces Structural Changes in both Peptide and Receptor: A Fourier-transform Infrared Study Using Isotopically Labeled Peptides. *Journal of Molecular Biology*, **366**, 1580-1588.

88. Wegener, A. A. Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaebakteriellen Lichtrezeptors pSRII mit seinem Transducerprotein pHtrII. 2000.
89. Wegener, A.A., Gordeliy, V.I., Labahn, J., Büldt, G., Steinhoff, H.J., and Engelhard, M. (2001). Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis. *The EMBO Journal*, **20**, 5312-5319.
90. Wegener, A.A., Chizhov, I., Engelhard, M., and Steinhoff, H.J. (2000). Time-resolved detection of transient movement of helix F in spin-labelled *pharaonis* sensory rhodopsin II. *Journal of Molecular Biology*, **301**, 881-891.
91. Winter, R. and Noll, F. (1998). *Methoden der Biophysikalischen Chemie. Teubner Studienbücher*
92. Xu, M.Q. and Evans, J. (2001). Intein-Mediated Ligation and Cyclization of Expressed Proteins. *Methods*, **24**, 257-277.
93. Yagi, H., Tsujimoto, T., Yamazaki, T., Yoshida, M., and Akutsu, H. (2004). Conformational Change of H⁺-ATPase β -Monomer Revealed on Segmental Isotope Labeling NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16632-16638.
94. Yang, C.S. and Spudich, J.L. (2001). Light-Induced Structural Changes Occur in the Transmembrane Helices of the *Natronobacterium pharaonis* HtrII Transducer. *Biochemistry*, **40**, 14207-14214.
95. Yang, C.S., Sineshchekov, O., Spudich, E.N., and Spudich, J.L. (2004). The Cytoplasmic Membrane-proximal Domain of the HtrII Transducer Interacts with the E-F Loop of Photoactivated *Natronomonas pharaonis* Sensory Rhodopsin II. *J. Biol. Chem.*, **279**, 42970-42976.
96. Yoshida H., Sudo, Y., Shimono, K., Iwamoto, M., and Kamo, N. (2004). Transient movement of helix F revealed by photo-induced inactivation by reaction of a bulky SH-reagent to cysteine-introduced *pharaonis* phoborhodopsin (sensory rhodopsin II). *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 537-542.

7. Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ALLEN, die mich im Laufe der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, begleitet und unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. Martin Engelhard für die interessante Aufgabenstellung und fortwährende Unterstützung bei der Umsetzung dieser Aufgaben. Auch möchte ich herzlich für die Ermöglichung der Teilnahme an vielen Konferenzen, die mich in die Welt der Wissenschaft eingeführt haben, danken. Weiterhin danke ich Ihm für die vielen Hilfestellungen bei der Formulierung und Verbesserung dieser Arbeit. Ebenso danke ich Ihm für die Schaffung einer guten Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe, die nicht zuletzt durch zahlreiche Ausflüge oder gemütliche Beisammensein entstand, wodurch meine Zeit am Institut verschönert wurde.

Ich danke Prof. Dr. Roger S. Goody für die Aufnahme in die Abteilung und die Bereitstellung der Mittel, die diese Forschungsarbeit ermöglicht haben.

Ich möchte Prof. Dr. Bernhard Lippert für die freundliche Übernahme des Korreferates danken.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Heinz-Jürgen Steinhoff und der kompletten Arbeitsgruppe an der Universität Osnabrück für die Messung der ESR-Spektren. Insbesondere sei Enrica Bordignon, Johann P. Klare, Julia Holterhues und Meike Doebber für die Einweihung in die Kunst der ESR-Spektroskopie und zahlreicher Hilfestellungen bei der Interpretation der Spektren sowie der Anregung neuer Experimente gedankt.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Friedrich Siebert und seinen Mitarbeitern Sven Reisdorf und Reiner Vogel für die Messungen der FTIR-Spektren danken. Besonders Reiner möchte ich für die Initiierung des Projekts sowie die Messungen und Interpretation der FTIR-Spektren des Peptidanalogs des Transducins danken.

Mein Dank gilt Marc Baldus von MPI Göttingen und seinen Mitarbeitern Karsten Seidel, Manuel Etzkorn und Ovidu C. Andronesi für die Feststoff-NMR-Messungen. Igor Chizhov danke ich für die Messung der Photozyklen. Außerdem für die MD-Simulationen und Hilfestellung bei der Auswertung der kinetischen Daten.

Ich danke ganz herzlich Christian Becker und Ralf Seidel für interessante Diskussionen und Hilfestellungen. Ralf danke ich zusätzlich für die Beihilfe zur Stärkung des Charakters☺.

Mein liebster Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen, die mich immer unterstützt und begleitet haben. Darunter sind...

... Martina Wischnewski für die gute Atmosphäre im Labor und zahlreiche praktische Tipps und Tricks.

... Anke Reulen, Karin Vogel-Bachmayr, Marion Hülseweh, Annika Göppner für die gute Laboratmosphäre und freundliche Unterstützung.

... Nina Ludwig, Sascha Genz, Philipp Adamitzki, Sunanda Lahiri, Kester Lausecker, Lin Li, David Wiegand, Ines Heinrich, Andrea Braunshausen, Holger Gerlach, Marc Dittmann, Young-Jun Kim, Tobias Schubeis, Julian Oeljeklaus, Helen Salia danke ich für Schaffung guter Atmosphäre im Labor, Büro und Freizeitgestaltung.

... Diana Olschewki danke ich für zahlreiche Tipps bei der Entwicklung der Methode der *Expressed Protein Ligation* und für die schönen Unterhaltungen.

... Jörg Sauermann und Miria Schumacher danke ich für die schöne Zeit am Institut und besonders in die Einweihung in die Kunst des Skifahrens.

Ich danke ganz herzlich Alexander Schneider für die Unterstützung und Hilfestellung in technischen Sachen und Medien, für die Freizeitgestaltung und eine schöne Zeit.

Lars Gogolin danke ich besonders für viele gemeinsame Hobbies, wie Tanzen oder Schachspielen, für viele Unterhaltungen und für große Unterstützung in schwierigen Zeiten. Ich danke Ihm für die Durchsicht meiner Arbeit und für die Begleitung in der letzten Etappe dieser Zeit.

and last but not least bedanke ich mich bei meiner Mutter und meiner Schwester, denen diese Arbeit gewidmet ist. Sie haben mich seit meiner Geburt begleitet, fortwährend unterstützt und aufgefangen.

Ich danke euch, dass ich euch habe!!!

Lebenslauf

Name: Swetlana Martell

Geboren: 03.04.79 in Lugowoje/Kasachstan

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

1986-1992: Besuch der Mittelschule in Kasachstan

Mai 1992: Übersiedlung nach Deutschland

1992-1995: Besuch des St. Ursula Gymnasiums in Werl

1995-2000: Besuch des St. Ursula Gymnasiums in Dorsten

Mai 2000: Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

WS 2000-SS 2004: Hochschulstudium der Chemie
an der Universität Dortmund

August 2004-Januar 2005: Anfertigung der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut
für molekulare Physiologie in der Abteilung der
physikalischen Biochemie mit dem Thema
„Untersuchungen zur Signaltransduktion in der
archaebakteriellen Phototaxis mittels ortsspezifisch
spinmarkierten Rezeptor-Proteinen“

Januar 2005-Juli 2008: Dissertation am Max-Planck-Institut
für molekulare Physiologie in der Abteilung der
physikalischen Biochemie mit dem Thema
„Untersuchung von Struktur und Funktion der Sieben-
Helix-Membranrezeptoren“ unter Leitung von
Prof. Dr. Martin Engelhard.