

**Signaltransfer des SRII/HtrII Komplexes und
strukturelle und funktionelle Untersuchung der
HAMP Domäne aus *Natronomonas pharaonis***

Dissertation

**Zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften
des Fachbereiches Chemie
der Technischen Universität Dortmund**

vorgelegt von
**Dipl.-Chem. Lin Li
aus Hunan (China)**

Dortmund, im April 2013

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. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Engelhard
2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Winter

Tag der Prüfung: 16. 07. 2013

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

Dortmund, April 2013

„Ich denke, also bin ich“
-----René Descartes

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

- Complex Formation and Light Activation in Membrane-Embedded Sensory Rhodopsin II as Seen by Solid-State NMR Spectroscopy. Etzkorn, M., Seidel, K., Li, L., Martell, S., Engelhard, M., and Baldus, M. (2010): *Structure* **18**, 293-300.
- Salt-driven equilibrium between two conformations in the HAMP domain from *Natronomonas pharaonis*: the language of signal transfer? Doebber, M., Bordignon, E., Klare, J.P., Holterhues, J., Martell, S., Mennes, N., Li, L., Engelhard, M., Steinhoff, H.J. (2008): *J. Biol. Chem.* **283**, 28691-28701.
- The Signal Transfer from the Receptor NpSR_{II} to the Transducer NpHtr_{II} Is Not Hampered by the D75N Mutation Holterhues, J.; Bordignon, E.; Klose, D.; Rickert, C.; Klare, J. P.; Martell, S.; Li, L.; Engelhard, M.; Steinhoff, H.-J. (2011): *Biophysical Journal* **100**, 2275-2282.
- Primary Photo induced Protein Response in Bacteriorhodopsin and Sensory Rhodopsin II. Groß, R., Wolf, M. M. N., Schumann, C., Friedman, N., Sheves, M., Li, L., Engelhard, M., Trentmann, O., Neuhaus, E., Diller, R. (2009): *Journal of the American Chemical Society* **131**, 14868-14878.

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
AS	Amphiphatische Sequenz
bp	Basenpaar
CheA	Chemotaxisprotein A
CheB	Chemotaxisprotein B
CheR	Chemotaxisprotein R
CheW	Chemotaxisprotein W
CheY	Chemotaxisprotein Y
CheZ	Chemotaxisprotein Z
DDM	N-Dodecyl- β -D-maltosid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
<i>H. salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
Htr	halobakterieller Transducer des Rhodopsins
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilodalton
M_r	relative Molekülmasse
MCP	methyl accepting chemotaxis protein
MTS	(1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-methyl) methanthiosulfonat
MTS-4-oxy	(1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-yl) carbamidoethyl-methanthiosulfonat
MSP	Membrane scaffold protein
<i>N. pharaonis</i>	<i>Natronobacterium pharaonis</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PML	purple membrane lipid
<i>NpHtrII</i>	<i>N. pharaonis</i> Transducer des sensorischen Rhodopsins II
<i>NpSRII</i>	<i>N. pharaonis</i> sensorisches Rhodopsin II

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDSL	site directed spin labeling
Tab.	Tabelle
TM	Transmembrane Helix
Upm	Umdrehungen pro Minute
<i>wt</i>	Wildtyp
λ	Wellenlänge des Lichtes

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

Inhaltverzeichnis

Abkürzungen und Symbole	ii
Inhaltverzeichnis	iv
1 Einleitung	1
1.1 Mikrobielle Rhodopsine.....	2
1.2 Sensorische Rhodopsine und Transducer.....	3
1.3 Modell der Transducer.....	6
1.4 Signaltransduktionskaskade.....	8
1.5 Die HAMP Domäne.....	9
1.6 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien	14
2.2 Instrumentation	15
2.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	16
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	18
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	18
2.4.2 Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten	18
2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion	19
2.4.4 Restriktionanalyse von DNA	20
2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten	20
2.4.6 Transformation in <i>E. coli</i>	21
2.4.7 DNA-Sequenzierung	21
2.4.8 Zellanzucht	21
2.5 Proteinchemische Methoden.....	22
2.5.1 Proteinexpression und Aufreinigung	22
2.5.1.1 Aufreinigung des zytoplasmatischen Proteins	22
2.5.1.2 Aufreinigung des Membranproteins.....	23

2.5.1.3	¹⁵ N, ¹³ C-Isotopenmarkierung des Proteins	24
2.5.1.4	Reverse-Markierung.....	25
2.5.2	Spinmarkierung.....	25
2.5.3	Rekonstitution der Membranproteine in PM-Lipide	25
2.5.4	Komplexbildung.....	26
2.5.5	Nanodiskformation	26
2.6	Analytische Methoden.....	26
2.6.1	Denaturierende Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	28
2.6.3	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS).....	28
2.6.4	Gelchromatographie.....	28
2.7	Biophysikalische Methoden und Strukturaufklärung.....	30
2.7.1	CD-Spektroskopie	30
2.7.2	Laserblitz-Absorptions-Spektroskopie.....	32
2.7.3	ANS-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie.....	33
2.7.4	ESR-Spektroskopie.....	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Untersuchung der HAMP Domänen des <i>NpHtrII</i>	35
3.1.1	Klonierung und Präparation der HAMP Domäne.....	35
3.1.1.1	Expressionseffizienz und Aufreinigung des <i>NpHtrII</i> 84-230-His.....	37
3.1.1.2	Konzentrationsbestimmung und Ausbeute	40
3.1.2	Gelfiltrationsanalysen der HAMP Domänen.....	42
3.1.3	Untersuchungen zur Struktur mittels CD-Spektroskopie.....	44
3.1.3.1	Strukturelle Charakterisierung von HAMP1 (<i>NpHtrII</i> 84-136-His) durch CD-Spektroskopie.....	44
3.1.3.2	Strukturelle Charakterisierung von HAMP2 (<i>NpHtrII</i> 137-230-His) durch CD-Spektroskopie	48

3.1.3.3	Strukturelle Charakterisierung von HAMP1+2 (<i>NpHtrII</i> 84-230-His) durch CD-Spektroskopie.....	50
3.1.3.4	Vergleich der verschiedenen <i>NpHtrII</i> -HAMP Domänen	54
3.1.4	ANS-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie	55
3.1.5	NMR Spektroskopie der HAMP Domänen	56
3.1.5.1	<i>NpHtrII</i> 84-136 (HAMP 1)	57
3.1.5.2	<i>NpHtrII</i> 84-230-His (HAMP1+2).....	58
3.1.5.3	<i>NpHtrII</i> 1-157-His	59
3.1.6	ESR-Untersuchungen zur Abhängigkeit der HAMP Domäne von der Salzkonzentration	61
3.2	Untersuchungen zur <i>NpHtrII</i> Struktur und Rezeptor-Transducer Komplexbildung... 63	
3.2.1	Untersuchungen zur Bildung des <i>NpSRII/NpHtrII</i> Komplexes mittels Gelfiltration.....	63
3.2.1.1	Gelfiltration des <i>NpHtrII</i>	63
3.2.1.2	Gelfiltration des <i>NpSRII</i>	64
3.2.1.3	Gelfiltration des <i>NpHtrII/NpSRII</i> Komplexes	65
3.2.1.4	Optimierung der Inkubationszeit.....	67
3.2.1.5	Optimierung der Temperatur	68
3.2.1.6	Stabilität des <i>NpSRII/NpHtrII</i> Komplexes	70
3.2.2	Einbau und Untersuchung des <i>NpSRII/NpHtrII</i> Komplex in Membran Nanodisks 71	
3.2.2.1	Nanodiskformation mit eingelagertem <i>NpSRII/NpHtrII</i> Komplex.....	72
3.2.2.2	Elektronenmikroskopie des <i>NpSRII/NpHtrII</i> Komplex in Nanodisks.....	73
3.2.2.3	Einfluss der Protein/Lipid-Umgebung auf den Photozyklus von <i>NpSRII</i> und den <i>NpSRII/NpHtrII</i> Komplex	74
3.3	Festkörper-NMR Untersuchung zur Licht-Aktivierung des Sensorrhodopsin-Transducer Komplexes.....	77
3.3.1	Herstellung des lichtaktivierten SRII.....	77
3.3.2	1D-NMR Spektroskopie von [¹⁵ N]Lysin-SRII.....	78

3.3.3	Konformationsänderungen des Rezeptors <i>NpSRII</i> bei der Lichtaktivierung durch 2D ssNMR Spektroskopie	79
4	Diskussion	84
4.1	Untersuchung zur Strukturaufklärung der HAMP Domäne.....	84
4.1.1	Stabilität der Sekundärstruktur der HAMP Domäne	85
4.1.2	Singalweiterleitung in der HAMP-Domäne von <i>NpHtrII</i>	87
4.1.3	NMR Spektroskopie der HAMP Domänen	88
4.2	Aufbau des Rezeptor/Transducer-Komplexes.....	91
5	Zusammenfassung	93
6	Literaturverzeichnis	95
7	Anhang	101
7.1	Proteinsequenzen.....	101
7.1.1	<i>NpHtrII</i> 84-230-His	101
7.1.2	<i>NpHtrII</i> 1-230-His.....	101
7.1.3	<i>NpHtrII</i> 84-136-His	101
7.1.4	<i>NpHtrII</i> 137-230-His	102
7.1.5	<i>NpSRII</i> -His.....	102
7.1.6	<i>NpHtrII</i> -His	102
7.2	Modelle der Zwei HAMP-Domäne	103
	Danksagungen	104

1 Einleitung

In Laufe der Evolution können nur die Lebewesen überleben und sich fortpflanzen, die sich an wechselnde Lebens- und Umweltbedingungen anpassen können. Sowohl einzellige Organismen wie Bakterien als auch höchst komplexe Lebensformen wie Evertebraten, haben die Fähigkeit, auf Stimuli aus der Umwelt zu reagieren, diese zu verarbeiten und schließlich eine physiologische Reaktion darauf auszulösen. Für diese Mechanismen stehen Signaltransduktions-kaskaden zur Verfügung, die auch in komplexen Netzwerken verknüpft sind. Für ein Verständnis dieser Prozesse sind Informationen über die Struktur der beteiligten Komponenten, ihre Wechselwirkung miteinander und struktureller Veränderungen von entscheidender Bedeutung.

Als prominentes Modellsystem hat nicht nur die Chemotaxis von Eubakterien erwiesen, sondern auch die Phototaxis von Halobakterien, wie *Halobacterium salinarum*. Dieser Archaea Bakterien besitzt einen stäbchenförmigen Zellkörper mit bipolar insertierten Flagellen. Diese bilden eine Art Schiffsschraube, die sich durch eine Drehung im Uhrzeigersinn rückwärts und gegen den Uhrzeigersinn vorwärts bewegt. Unter konstanten Bedingungen wechselt das Flagellenbündel seine Drehrichtung alle 10 Sekunden. Durch zufällige Winkelabweichung während der Umkehrphase führt die Zelle eine Richtungsänderung aus, die in der Summe zu einer Zufallsbewegung im Medium führt (Oesterhelt, Marwan et al., 1999).

Bei chemischen oder physikalischen Reizänderungen reagiert das Bakterium mit einer Änderung der Schaltfrequenz. Auf die Bestrahlung mit blauem Licht (negativer Stimulus) reagiert das Bakterium mit einer Erhöhung der Wechselfrequenz, hieraus resultiert eine 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 (Oesterhelt, Marwan et al., 1999). Dieser primitive bakterielle Sehprozeß wird als Phototaxis bezeichnet (Abb. 1.1).

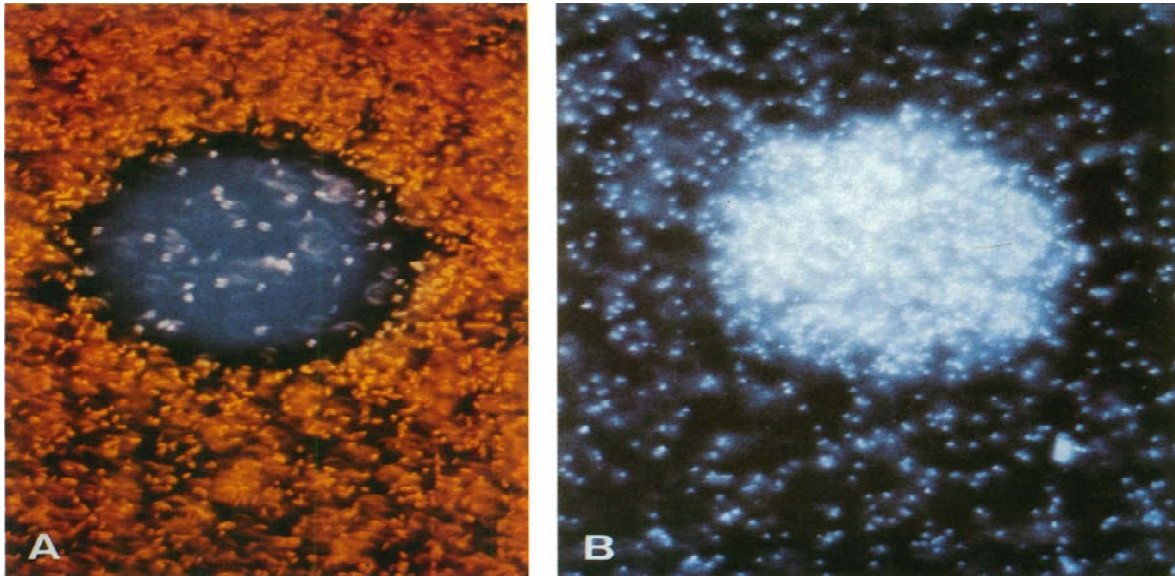


Abb. 1.1 Phototaxis und Schwimmverhalten von *Halobacterium salinarum*. (A) Photophobe Reaktion des Bakteriums auf Blaulicht. (B) Photophile Antwort auf oranges Licht. Das Bild wurde entnommen aus Stoeckenius et al.

1.1 Mikrobielle Rhodopsine

Für die Verarbeitung äußerer Reize sind membran-gebundene Rezeptoren verantwortlich. Die auf chemische Botenstoffe reagierenden Rezeptoren werden als Chemorezeptoren, die auf Licht reagierenden als Photorezeptoren bezeichnet. Vier verschiedene bakterielle Rhodopsine werden in *H. Salinarum* exprimiert: der Ionenpumpen Bakterierhodopsine (BR) und Halorhodopsin (HR) sowie die sensorischen Rhodopsine (SRI und SRII) (Abbildung 1.2). Es handelt sich bei alle vier Proteinen um Sieben-Helix-Membranrezeptoren, die einen Retinalchromphor über eine protonierte Schiff'sche Base binden.

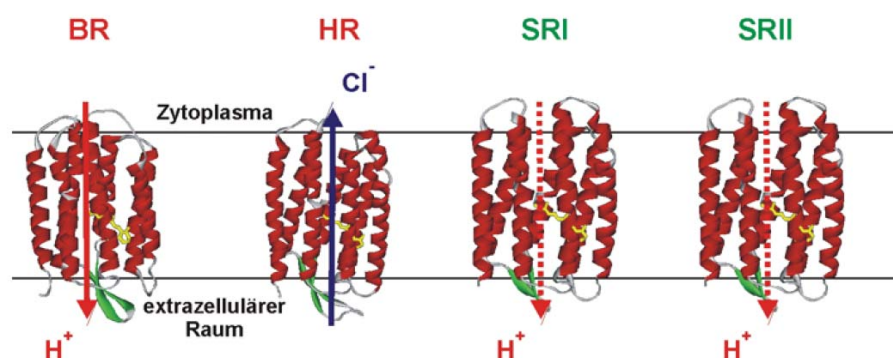


Abb. 1.2 Die vier archaebakteriellen Rhodopsine aus *H. salinarum*.

1.2 Sensorische Rhodopsine und Transducer

Die sensorischen Rhodopsine bilden jeweils einen 2:2 Komplex mit einem spezifischen „Halobacterial transducer of rhodopsin“, welches als HtrI bzw. als HtrII bezeichnet wird (Abb. 1.3). Diese Proteine bestehen aus einem transmembranen Bereich und einer zytoplasmatischen Domäne. Sequenzvergleiche der beschriebenen archaebakteriellen Transducer zeigen erhebliche Sequenz-Homologien zu den eubakteriellen Chemorezeptoren (MCP's: „Methyl accepting chemotaxis protein“), wie z.B. dem Aspartatrezeptor (Tar) oder dem Serinrezeptor (Tsr) aus *E. coli* auf. Insbesondere für den zytoplasmatischen Bereich lässt sich eine auffällige Homologie der Htr's zu den MCP's feststellen. Daraus lässt sich ableiten, dass diese beiden Klassen von Proteinen auch strukturell verwandt sein könnten.

Die Röntgenkristallographie hat detaillierte strukturelle Einblicke in bakterielle Rhodopsine und insbesondere in das SRII geliefert. Die Strukturen konnten sowohl für *NpSRII* allein (Luecke et al., und Royant et al., 2001), und auch für die Transducer gebundene Form, den *NpSRII/NpHtrII*-Komplex (Gordeliy et al., 2002) gelöst werden. Auch die Intermediate K und M im Photozyklus konnten auf atomarer Ebene charakterisiert werden ([Edman et al., 2002] und [Moukhametzianov et al., 2006]).

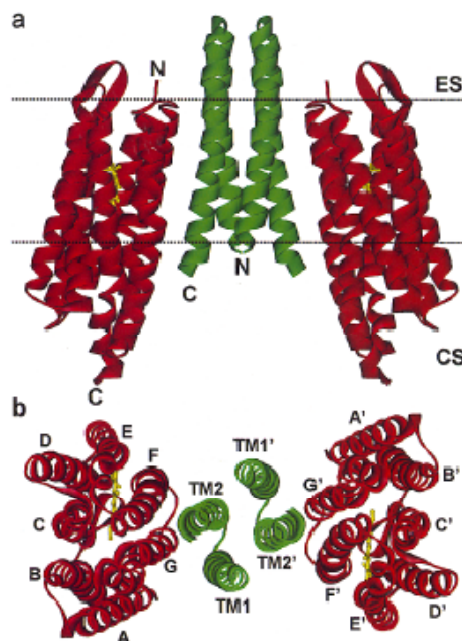


Abb. 1.3 Kristallstruktur des SRII-Transducer Komplexes aus *N.pharaonis*. Rot: Rezeptor; Grün: Transducer; Gelb: Retinal. **(a)** Blick aus Richtung der Membran; ES: extrazelluläre Seite; CS: Zytoplasma. Die gepunkteten Linien schließen den hydrophoben Teil der Proteine ein. **(b)** Der Blick aus Richtung des Zytoplasmas verdeutlicht den rotationsymmetrischen Aufbau des 2:2 Komplexes. (Klare et al., 2004)

In Abb. 1.3 ist die bisher bekannte *NpSRII/NpHtrII*-Komplex Kristallstruktur dargestellt (Klare et al. 2004). Der Komplex, bestehend aus *NpSRII* und einer verkürzten Transducer Variante (*NpHtrII*1-114), kristallisiert in einer 2:2 Stöchiometrie. Dies stimmt mit der Stöchiometrie des natürlichen Komplexes in der Membran von *N. pharaonis* überein (Wegener, et al., 2001). *NpSRII* (rot) und *NpHtrII* (grün) sind in der Membran über die beiden transmembranen Helizes TM1 und TM2 des Transducers und die Helizes F und G des Rezeptors assoziiert (Mennes 2006). Da der Abstand zwischen der Transducerhelix TM2 zu den beiden Rezeptorhelizes etwa gleich ist, besteht die Möglichkeit des Signalaustausches über Helix F oder G (Martell 2008). Der in den extrazellulären Raum herausragende Teil des Transducer-Dimers stellt vermutlich das evolutionäre „Überbleibsel“ der Ligandenbindungsdomäne eines Proto-Chemorezeptors dar, aus dem sich die Phototransducer entwickelt haben könnten (Vgl. HtrII aus *H. salinarum*, welcher eine Serin-rezeptor Domäne besitzt)(Hou et al., 1998). In der Kristallstrukturanalyse des Komplexes konnte jedoch nur der transmembrane Bereich des *NpHtrII* aufgelöst werden (Aminosäure 24-82). Strukturinformationen über die restlichen Bereiche, speziell den für den Signaltransfer wichtigen C-Terminus (HtrII83-114), fehlen.

In der archeabakteriellen Phototaxis bewirkt eine Lichteinstrahlung (500 nm) eine Aktivierung der sensorischen Rhodopsine, wodurch es zu einem sogenannten Photozyklus kommt. Der Photozyklus ist charakterisiert durch verschiedene Intermediate, bevor schließlich wieder in den Grundzustand erreicht wird. Der Photozyklus des *NpSRII* ist schematisch in Abbildung 1.4 dargestellt. Die Absorption eines Photons führt zu einer Isomerisierung des Retinals im *all-trans* Grundzustand zur *13-cis* Konfiguration (K-Intermediat). Dieses verursacht wiederum eine Konformationsänderung des Proteins vom K- zum L-Zustand. Die Schiff'sche Base wird daraufhin deprotoniert und gibt ihr Proton an die Aminosäure Asp-75 ab, die im extrazellulären Protonenkanal lokalisiert ist, wodurch das M1-Intermediat gebildet wird. Der funktional entscheidende Schritt ist der Übergang von M1 nach M2. In dieser Umwandlung erfolgt eine Konformationsänderung des Proteins, wodurch das Signal an den Transducer weitergegeben wird. Die anschließenden Schritte beinhalten die Reprotonierung der Schiff'schen Base und die Reisoomerisierung des Retinals (M \rightarrow O), wobei schließlich wieder der Grundzustand erreicht wird.

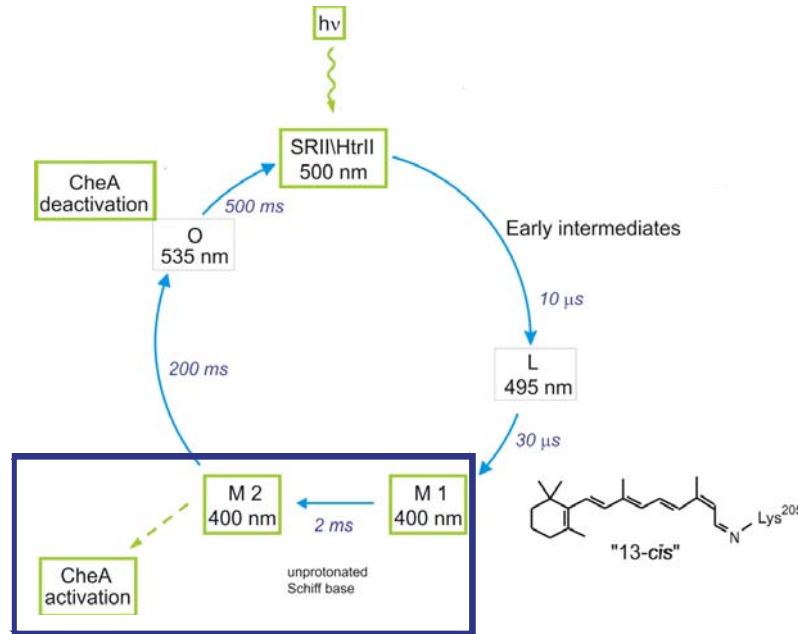


Abb. 1.4 Modell des Photozyklus des *NpSRII* aus *N.pharaonis*. Die Intermediate sind mit den Buchstaben L, M und O bezeichnet. Die Absorptionsmaxima der Intermediate sind ebenfalls angegeben (Engelhard & Hofmann, 2005).

Für die ermöglichten umfangreiche Elektronen Spin Resonanz (ESR) Messungen Wegener et al. einen Mechanismus vorzuschlagen, bei dem die Ausklappbewegung der Helix F des *NpSRII* eine Rotationsbewegung der TM2 des Transducers um 15° induziert (Wegener et al., 2001). Die beiden Bewegungen, die Auswärtsbewegung der Helix F des *NpSRII* und die Rotationsbewegung der TM2 des Transducer geschehen simultan (Abbildung. 1.5). Bei den Relaxationen in den Grundzustand erfolgt eine Entkopplungsreaktion zwischen dem Rezeptor und der TM2. Die Rückrotation der TM2-Helix erfolgt etwa 200 ms später, als die des Rezeptors.

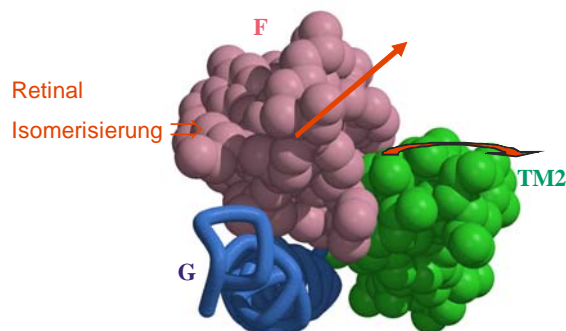


Abb. 1.5 Modell für die Signalübertragung durch lichtinduzierte Auswärtsbewegung der Helix F und Rotationsbewegung der TM2 basierend auf ESR-Daten (Klare et al., 2004).

Die Auswärtsbewegung der Helix F konnte allerdings in Kristallstrukturuntersuchungen nicht nachgewiesen werden. Im Kristall wird eine TM2 Rotation um 15° stattfindet und eine Verschiebung der der Helix G um $0,5 \text{ \AA}$ induziert (Moukhametzianov et al. 2006)(Abbildung 1.6). Die Unterschiede zwischen beiden Methoden könnte an der Kristallpackung liegen, die eine Bewegung der Helix F verhindert.

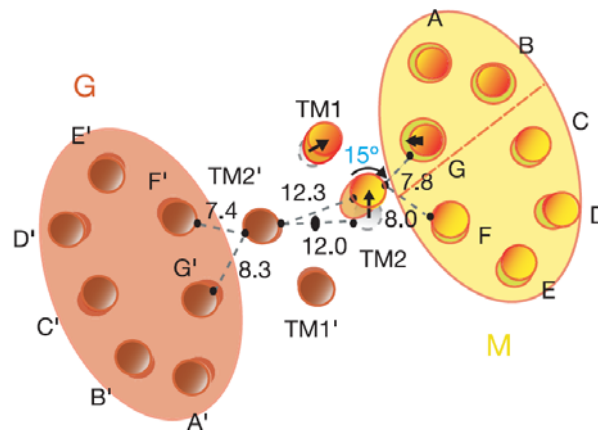


Abb. 1.6 Schematische Darstellung von Helixinteraktionen zwischen Transducer und Rezeptor von der cytoplasmatischen Seite. Der Grundzustand-Komplex ist in rot dargestellt und der M-Zustand-Komplex in gelb. Die Abstände zwischen Ca -Atomen von Helix F (Leu 170) zu TM2 (Leu 77), von Helix G (V203) zu TM2 (Leu 77) und TM2 (Leu 78) sind ebenfalls markiert (Moukhametzianov et al. 2006).

1.3 Modell der Transducer

Anhand von Untersuchungen der Primärstruktur des Transducer-Proteins *NpHtrII* (Seidel et al., 1995; Wegener, 2000; Zhang et al., 1996;) ist eine Homologie zu den bakteriellen Chemotaxis-Rezeptoren (=MCP (Methyl accepting proteins) -Rezeptoren) festgestellt worden. Aufgrund dieser Analogien sind einige Voraussagen bezüglich der Sekundärstruktur des *NpHtrII*-Transducers getroffen worden (Abbildung 1.7).

1.4 Signaltransduktionskaskade

Die Signaltransduktionskaskade verläuft analog zum Mechanismus der prokaryotischen Chemotaxis, wie z.B. in *E. coli*, beginnend am zytoplasmatischen Bereich des Transducers bis zum Flagellar-Motor im Inneren der Zelle. Der Rezeptor wird durch die Absorption von Licht aktiviert, was in einer frühen Reaktion zur Isomerisierung des Retinals führt. Anschließend wird die Schiffsche Base deprotoniert und ein Proton wird in das extrazelluläre Medium abgegeben. In diesem Zeitbereich werden auch Konformationsänderungen des Proteins beobachtet, die eine Auswärtsbewegung der Helix F/ Helix G bewirken. Das Signal wird über den Transducer zu dessen zytoplasmatischem Ende weitergeleitet. Im Zytoplasma folgt ein Zweikomponentensystem, wobei die Sensor-Kinase CheA über ein Adapter-Protein (CheW) an die Signaldomäne gebunden ist, durch die Stimulation des Rezeptors wird die Kinase CheA autophosphoryliert. CheA kann dann im darauffolgenden nächsten Schritt, die Response Regulatoren CheY oder CheB phosphorylieren. Phosphoryliertes CheY dient als ein Schalter für den Flagellar-Motor. Die Adaptationsprozesse werden durch die phosphorylierte Methylesterase CheB und der Methyltransferase CheR reguliert. Die Signaltransduktionskette der Phototaxis ist in Abbildung 1.8 schematisch aufgezeigt.

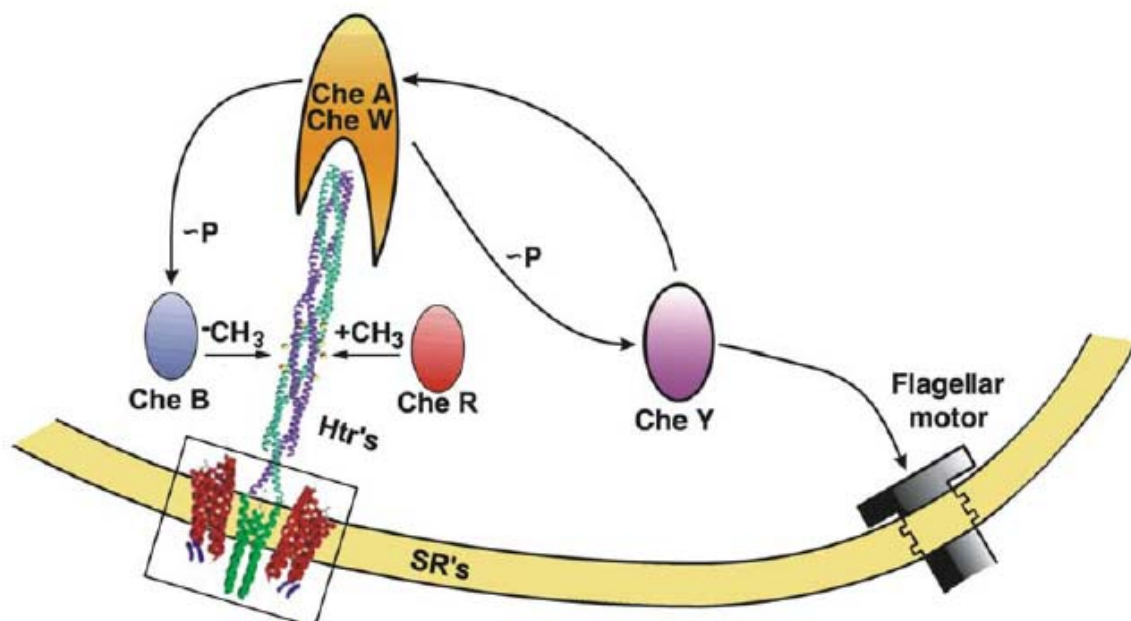


Abb. 1.8 Schematische Darstellung der archaebakteriellen Signaltransduktion. Gordeliy *et al.*, 2002

Im Allgemeinen wird heute davon ausgegangen, dass die Rezeptoren nicht als voneinander unabhängige Dimere in der Zelle vorkommen, sondern dass sie in der Nähe der Flagellen größere Aggregate bilden. In einem Modell wird ein „Trimer von Dimer“ angenommen, die

sich in einem Cluster organisieren (Ames et al., 2002; Kim et al., 2002; Maddock & Shapiro, 1993). In diesen Clustern wurden auch CheA und CheW Proteine gefunden, was vermuten lässt, dass die Rezeptoren durch diese Che-Proteine in einem zweidimensionalen Gitter zusammengehalten werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteine im Verhältnis 6 Tsr:4 CheW:1 CheA in einem Komplex angeordnet sind (Levit et al., 2002) (Abb. 1.9).

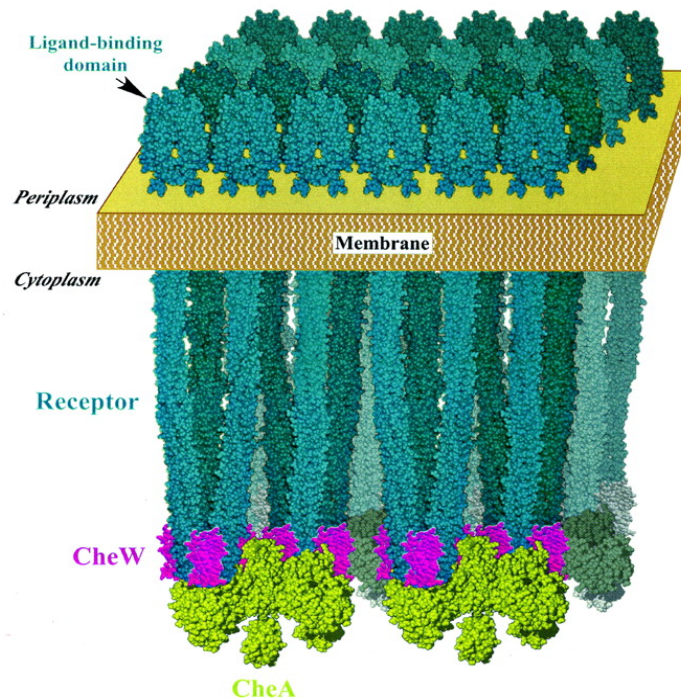


Abb. 1.9 Modell der Rezeptor/CheW/CheA Bildung bei den Chemorezeptoren nach Evit et al. (Levit et al., 2002).

Hazellbauer et. al. haben die Chemoreceptor in Phospholipiddoppelschicht-Nanodisks eingelagert und in eine Nanodisks einen oder wenige chemoreceptor Dimere enthalten. Es ist gefunden, dass Rezeptor-Dimere Liganden binden und durchführt transmembrane Signalsierung kann, aber keine chemotaxis Histidine Kinase CheA aktivieren. Nur die Nanodiscs, die drei Chemoreceptor Dimer enthalten, können CheA aktivieren (Boldog et al. 2006). Das Ergebnis beweist, dass die Amplifikation des Signals über diese Trimer of Dimer Cluster von Rezeptor erfolgt.

1.5 Die HAMP Domäne

HAMP Domänen wurden 1994 zum ersten Mal in Histidinkinasen und Chemotaxisrezeptoren entdeckt (Jin und Inouye, 1994) und 1999 von Aravind und Ponting mit HAMP bezeichnet

(Aravind and Ponting, 1999). Das Akronym HAMP leitet sich vom Erscheinen dieser Domäne in **H**istidinkinasen, **A**denylatcyclasen, **M**ethylierten Chemotaxisrezeptoren und **P**hosphatasen ab. Derzeit sind HAMP Domänen in über 8000 Proteinen gefunden worden. Über ein Fünftel aller Histidinkinasen und über zwei Drittel der Chemotaxisrezeptoren besitzen die HAMP Domäne. Wenige HAMP Domänen wurden auch in Pilzen, Pflanzen und Protisten gefunden. Ihr Ursprung ist wahrscheinlich durch lateralen Gentransfer aus endosymbiontischen Vorfahren zu erklären (Koretke et al., 2000).

Im Jahr 1998 vermuteten Butler und Falke, dass HAMP Domänen aus zwei α -Helizes bestehen und strukturell ein Coiled-Coil Motiv besitzen. Die Strukturen von Coiled-Coil Domänen beruhen auf der Periodizität hydrophober Aminosäuren in den α -Helizes. Typische Coiled-Coils haben eine Periodizität von 7 Aminosäuren (Heptadenmuster), wobei die Positionen der Periodizität der Aminosäuren mit den Buchstaben abcdefg wiedergegeben werden. Die Positionen e und g sind meist polare Aminosäuren; b, e und f sind hydrophil und zeigen nach außen. Die Positionen a und d sind mit hydrophoben Aminosäuren, bevorzugt Leu und Ile, besetzt. Diese Anordnung stabilisiert die Dimerisierung der Helizes durch hydrophobe Wechselwirkungen. Die hydrophoben Positionen a und d sind an der Ausbildung der Helixpackung beteiligt, auch für die Transducer Proteine HtrI und HtrII beide HAMP-Domänen identifiziert worden (Abb. 1.11). Diese wird durch den Aufbau einer kanonischen Coiled-Coil Struktur definiert auch für die Transducer Proteine HtrI, HtrII und HAMP Domänen identifiziert worden. Der Sequenzvergleich zeigt zum Teil deutliche Übereinstimmungen der Sequenzen der Transducerproteine mit den Chemorezeptoren (Abb. 1.10).

		-----AS1-----	-----AS 2-----
NpHtrII-1	86	TAASLSTLAAKASRMGDDLVELET-RREDEIGDLYAAFDEMQRQSV131	
NpHtrII-2	159	LQAEAERFGEVMDRCADGDFTORLDAETDNEAMOSIEGSFNEIMMDGI204	
Af1503	281	ITRPIIELSNTADKIAEGNLEAEVPHQNRADIEGILAKSIELRRSL326	
Ec-Tsr	218	LVAPMNRLLDSIRHLAGGDLVKPIEV-DGSNEMGOLAESLRHMOGEL263	
Ec-Tar	216	LLTPLAKIIAHIREIAGGNLANTLTI-DGRSEMGDLAQSVSHMQRSL261	
repeat		defgabcdeffgabcd	fgabcdeffgabcdeffa

Abb. 1.10 Sequenzvergleich der zwei HAMP Domänen der archaebakteriellen Transducerproteine *N. pharaonis* mit Af1503 aus *Archaeoglobus fulgidus* sowie der MCP's Tsr, Tar aus *E. coli*. Die Farbkodierung richtet sich nach den Eigenschaften der Aminosäure-Seitenketten: hydrophob (A,I,L,M,P,V), sauer (D,E), basisch (H,K,R), polar, ungeladen (C,G,N,Q,S,T) und aromatisch (F,W,Y). Unter „repeat“ sind Aminosäurepositionen der „coiled coil“-Abschnitte beschrieben. Die wichtige Positionen der hydrophoben Packung a und d sind mit grau markiert.

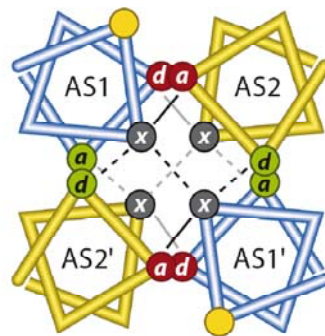


Abb. 1.11 Schematische Darstellung der coiled-coil Packung. Ansicht von oben. Grau unterlegte Kreise: x-Positionen, deren Seitenketten ins Innere des Bündels zeigen, rote und grün unterlegte Kreise: da-Positionen, deren Seitenketten zur Nachbarhelix zeigen. Durchgezogene Linien zeigen innerhalb der Untereinheiten Wechselwirkungen; gestrichelte Linien zeigen Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten. Zwei Packungsschichten sind gezeigt: obere (schwarz) und untere (grau)(Parkinson 2010).

Ein Durchbruch in dem strukturellen Bild der HAMP Domäne war die Lösung der NMR-Struktur der HAMP Domäne von Af1503 aus *Archaeoglobus fulgidus*. Es zeigt, dass die HAMP Domäne aus zwei parallelen α -Helizes besteht, die durch einen Linker verbunden sind. Zwei HAMP Domänen bilden wiederum ein paralleles Homodimer, sodass ein Bündel aus vier parallelen Helizes entsteht, die leicht gegen die Symmetrieachse geneigt sind (Abb.1.12) (Hulko, 2006).

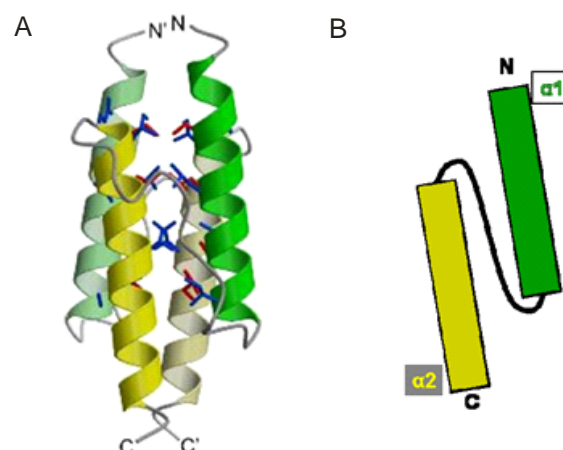


Abb. 1.12 Struktur der HAMP Domäne von Af1503 aus *A. fulgidus* (Hulko,2006). **A:** Seitenansicht als paralleles Dimer. **B:** schematische Darstellung eines Monomers.

Kürzlich wurde die Kristallstruktur des Aer2 Proteins aus *Pseudomonas aeruginosa*, welches drei aufeinander folgende HAMP Domänen enthält, bestimmt. Die HAMP Domänen 1 und 3 haben eine ähnliche Bündelstruktur zur der Af1503-HAMP. Die HAMP-2 Domäne zeigt eine deutlich unterschiedliche Struktur (Airola et. al 2010). In der HAMP-2 Struktur haben die vier Helizes eine parallele Orientierung, sind weniger dicht gepackt und liegen voneinander abgespreizt vor: AS1 und AS1' liegen nah zueinander an der Spitze des Bündels; und AS2 und AS2' liegen nah zueinander an der Unterseite des Bündels (Abb. 1.12).

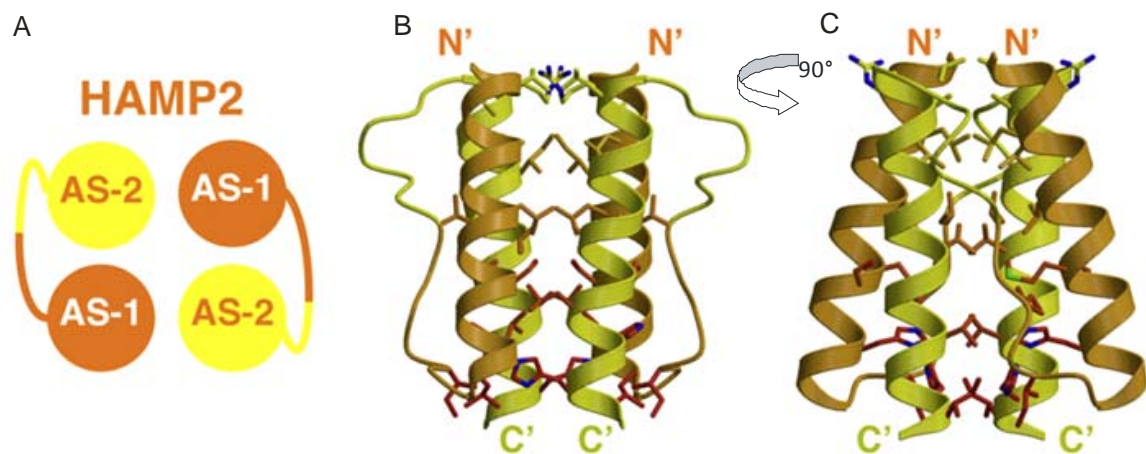


Abb. 1. 13 Struktur der HAMP2 Domäne aus *Pa-Aer2*: A) schematische Darstellung eines Dimers. B) und C) Seidenansicht der Struktur mit 90° Rotation. (Airola et. al 2010)

Mit den Strukturen der HAMP Domäne aus *Af1503* und *Pa-Aer2* war es möglich, den Signaltransduktionsmechanismus von HAMP Domänen zu untersuchen und im Sinne eines Homologiemodells auf andere HAMP Domänen zu übertragen.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es die Eigenschaften der HAMP Domänen näher zu charakterisieren. Zunächst sollen die HAMP Domänen für weitergehende Untersuchungen durch heterologe Expression in *E. coli* zugänglich gemacht werden. Zur Charakterisierung der HAMP Domänen sollen sowohl Gelfiltrationsanalysen als auch CD-Spektroskopie und ANS-Fluoreszenz-Emissions-spektroskopie angewendet werden. Zusätzlich werden NMR und ESR Messungen durchgeführt, um die Struktur der HAMP Domäne aufzuklären und Information über die Weiterleitung des Lichtsignals über den transmembranen Teil des HtrII zur zytoplasmatischen Signal-Domäne des Transducer zu erlangen.

Für die bakteriellen Chemorezeptoren sind "Trimere von Dimeren" als eine funktionelle Einheit für die Signaltransduktion vorgeschlagen worden (Kim et al., 2002). Da das HtrII ein Strukturhomologon der Chemorezeptoren ist, soll die Gültigkeit dieses Konzepts auch für den Transducer geprüft werden. Mit Gelfiltrationsanalysen kann die Bindung des Transducer an das *NpSRII* beobachtet werden. Durch die Einlagerung in Nanodisks erhält man lösliche Membranproteine in einer Phospholipid-Doppelschicht, die durch einen Proteinhülle von definierter Größe und Form umrandet wird. Darüberhinaus soll die Komplexbildung zwischen Transducer und Rezeptor sowie die Bildung von höheren Oligomeren näher untersucht werden. Das Bild des in Nanodisks eingelagerten *NpSRII/NpHtrII* Komplexes wird mit Elektronenmikroskopaufnahmen geklärt (Zusammenarbeit mit Dr. Elmar Behrmann und Dr. Stefan Raunser).

Die lichtinduzierte Signalübertragung von Rezeptor zum Transducer ist der initiierte Schritt der Signaltransduktionskaskade. Um diese vollständig aufzuklären, fehlt bislang das detaillierte Verständnis über den Aktivierungsmechanismus des Rezeptors und die damit einhergehenden Konformationsänderungen. Die Aktivierung des Retinal-Proteins in der Membran mittels Festkörper-NMR wurden in vorherigen Arbeiten untersucht ([Ader et al., 2009], [Ader et al., 2008], [Ahuja et al., 2009], [Etzkorn et al., 2008] und [Mak-Jurkaskas et al., 2008]). Es wurde gezeigt, dass es mittels Festkörper-NMR möglich ist, um die molekulare Struktur und Dynamik von *NpSRII* in Lipid-Doppelschichten zu studieren (Etzkorn et al., 2007). In dieser Arbeit wird eine 2D-NMR Technik in Kombination mit reverser Isotopenmarkierung benutzt, um die strukturelle Änderung im Protein zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind von p.A.-Qualität und stammen, wenn nicht gesondert erwähnt, von den Firmen Aldrich (Heidenheim), Baker (Groß-Gerau), Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm), Gibco-BRL (Neu Isenburg), Merck (Darmstadt), Riedel de Häen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim).

Restriktionsenzyme werden von den Firmen Boehringer (Mannheim), New England Biolabs (NEB, Schwalbach) und Pharmacia (Freiburg) bezogen. Die Polymerase-Kettenreaktionen werden ausschließlich mit dem Pfu PCR-System von Promega (Mannheim) durchgeführt. DNA-Ligationen erfolgen mit der T4 DNA Ligase von Gibco BRL (Neu Isenburg). RNaseA wird von Boehringer (Mannheim) bezogen.

Der DNA-Marker stammt von Gibco BRL (Neu Isenburg).

Zur Isolierung von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten finden Kits der Firma Qiagen (Hilden) Verwendung.

Die für die Zellanzucht verwendeten Antibiotika stammen von der Firma Sigma.

Nährmedien (Pepton 140 und Hefeextrakt) für die Zellanzucht werden von der Firma Gibco BRL bezogen.

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

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

Der verwendete Protein-Molekulargewichtsmarker stammt von der Firma Pharmacia (Buckinghamshire UK) und setzen sich aus den Proteinen Lactalbumin (14,4 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Albumin (66 kDa) und Phosphorylase b (97 kDa) zusammen.

Die Spinlabel (1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat (MTS) und (1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-yl) carbamidoethyl-methanthiosulfonat (MTS- 4-oxy) werden von der Firma Toronto Research Chemicals TRC (Toronto) bezogen.

2.2 Instrumentation

Die Fermentation der *E. coli* Bakterien erfolgt in temperierbaren Schüttlern der Firma New Brunswick (Jersey, USA) unter aeroben Bedingungen. Die Zellen werden an einem Ultraschallgerät der Firma Branson Ultrasonics (Danbury, USA) oder in einem Mikrofluidizer M-110S der Firma Microfluidics aufgeschlossen.

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen wird durch Elektroporation mittels eines GenePulsers der Firma BioRad (München) in Elektroporationsküvetten der Firma Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt.

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

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

DNA-Sequenzierungen werden mit dem Sequenzierungsgerät 373 von Applied Biosystems oder von den Firmen Seqlab (Göttingen) beziehungsweise AGOWA (Berlin) durchgeführt.

UV/VIS-Spektren werden mit den Spektrometern Lambda 9 von Perkin-Elmer (Fremont, USA) sowie DU-650 von Beckmann (Hamburg) aufgenommen.

Polyacrylamid-Elektrophoresen erfolgen mit dem Mini-PROTEAN II-System der Firma BioRad (München).

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

2.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue F' Tn 10 *proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1 and A1 gyrA96(Nal^r) Thi hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1 lac*

E. coli BL21(DE3) F- *ompT [lon] hsdS_B (r_B⁻ m_B⁺) λ(DE3)*

Vektoren

pET27bmod*Np*SRII-His: Zur Verfügung gestellt von A.Göppner.

pET27bmod (Klostermeier *et al.*, 1998)

pET27bmod-*Np*HtrII₁₋₂₃₀-His

pET27bmod-*Np*HtrII₁₋₁₅₇-His

pET27bmod-*Np*HtrII₈₄₋₂₃₀-His

pET27bmod-*Np*HtrII₈₄₋₁₃₆-His

pET27bmod-*Np*HtrII₁₃₇₋₂₃₀-His

pET27bmod-*Np*HtrI₁₋₂₃₀-V78C-His

pET27bmod-*Np*HtrI₁₋₂₃₀-A94C-His

Oligonukleotide

Alle im folgenden aufgeführten Oligonukleotide werden von der Firma MWG (Göttingen) bezogen.

T7prom long Primer 5' TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG GAA 3'

T7term long Primer 5' CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG C 3'

Die Schmelztemperaturen der nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide ohne Berücksichtigung der Fehlpaarungen (T_m) bzw. mit Berücksichtigung der Fehlpaarungen (T_{mRed}) berechnen sich nach folgenden Formeln:

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

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

Zur Einführung von Mutationen in *NpHtrII*-His werden folgende Oligonukleotide verwendet. Diese Oligonukleotide werden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Die Codons der neu eingeführten Aminosäure sind unterstrichen:

<u>Mutation</u>	<u>Oligo</u>	<u>5' Sequenz</u>	<u>3'</u>	<u>$T_m/T_{m\text{Red}}$</u>	<u>[°C]</u>
NcoIHtrII1	for	GAT	ATA CCA TGG CGC TGA AC		60/60
HtrII230EcoRI	rev	CTC	CAT <u>GGA</u> <u>ATT</u> <u>CTC</u> GGC GTT CGC AC		82/59
HtrII230BamHI	rev	CTG	<u>GGA</u> TCC ATG <u>ACT</u> <u>TAT</u> <u>TAG</u> GCG TTC		80/61
NcoIHtrII84	for	CGC	TGG CCA TGG ACA CCG CCG C		78/60
SapIHtrII84	for	TTG	CTG CCA <u>GCT</u> <u>CTT</u> <u>CCA</u> <u>TGG</u> ACACCGCC		94/60
SapIHtrII01	for	AAG	AAG GAG <u>CTC</u> <u>TTC</u> CAT GTC GCT		72/60

Cystein-Mutationen in *NpHtrII*₂₃₀-His wurden mit Hilfe folgender Primer eingeführt:

<u>Mutation</u>	<u>Oligo</u>	<u>5' Sequenz</u>	<u>3'</u>	<u>$T_m/T_{m\text{Red}}$</u>	<u>[°C]</u>
A94C	for	CTT	TCA ACG CTG <u>TGC</u> GCG AAG GCC T		80/72
	rev	AGG	CCT TCG <u>CGC</u> <u>ACA</u> GCG TTG AAA G		80/72
V78C	for	TCG	GAC TCT <u>GTG</u> <u>CTG</u> CCA CGC		65/60
	rev	GCG	TGG CAG <u>CAC</u> AGA GTC CGA		65/60

2.4 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders erwähnt, werden molekulargenetische Methoden 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 Birnboim und Doly 1979. Die genomische DNA wird durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mit zwei Volumenäquivalenten Phenol/Chloroform (1:1 v/v) und im Anschluß daran mit einem Volumenäquivalent Chloroform extrahiert. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgt durch Zugabe von 2,5 Volumenäquivalenten Ethanol. Zur Fällung 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 anschließend in 20-50 µL TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, 20 µg/mL RNase A) aufgenommen.

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt unter Verwendung von Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) (Qia-Tip-20 und Qia-Tip-100). Abweichend vom Protokoll des Herstellers wird vor dem Auftrag des Lysates auf die Säulen ein RNase A-Verdau (20 µg/mL, 1 h bei 37°C) mit anschließender Zentrifugation (20 min, 10.000 × g) durchgeführt.

2.4.2 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. Dazu werden die entsprechenden Proben in Probenpuffer (TBE-Puffer, 10 % Ficoll, 0,025 % Bromphenolblau und 0,025 % Xylencyanol) aufgenommen und auf 0,7 – 2 %ige Agarosegele in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,9 mM EDTA, pH 8,9) aufgetragen. Die Anfärbung der Banden erfolgt durch Zugabe von 0,6 mg/l Ethidiumbromid. Als Elektrophorese-Puffer dient ebenfalls TBE. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt bei einer Spannung von 3–4,5 V/cm. 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 extrahiert.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgt mittels PCR (Mullis & Faloona, *et al.*, 1987). Dazu werden in der Regel 50 µl-Ansätze folgender Zusammensetzung verwendet:

- 5-20 ng DNA Matrize
- 25 pmol der entsprechenden Primer
- je 10 nmol der vier dNTP's
- 1 Unit (0,5 µL) Pfu-Polymerase
- 5 µl 10 x Polymerase-Puffer

Die Zugabe der Polymerase erfolgt nach einem fünf-minütigen Denaturierungsschritt bei 96°C und Abkühlen der Ansätze auf Eis. Die DNA-Amplifikation erfolgt jeweils nach folgendem Standard-Protokoll:

- | | |
|-----------------|---------------|
| Denaturierung: | 15 s bei 96°C |
| Hybridisierung: | 30 s bei 58°C |
| Elongation: | 75 s bei 72°C |

In der Regel werden 15-25 dieser Zyklen durchlaufen. Abschließend erfolgt ein weiterer Schritt von 2 min bei 72°C um die Elongation aller amplifizierten DNA-Fragmente sicherzustellen. Die Aufreinigung der PCR-Amplifikate erfolgt durch elektrophoretische Auftrennung (s.o.).

Ortsspezifische Mutationen werden mittels der „Overlap Extension“-Methode (Ho *et al.* 1989) eingeführt (Abb. 2.1).

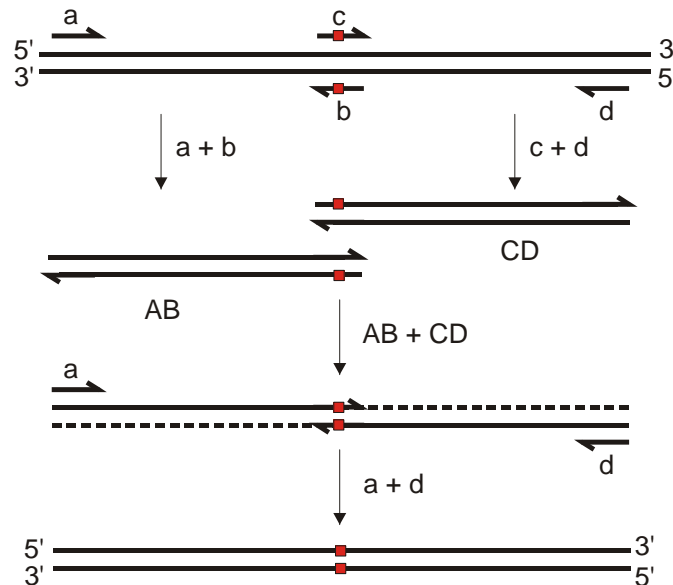


Abb. 2. 1 Schema der „Overlap Extension“-Methode zur Einföhrung ortspezifischer Mutationen. Die rote Box kennzeichnet die Stelle der Mutation.

Es werden zwei PCRs durchgeföhrt. Dabei werden in der ersten PCR durch Kombination der flankierenden Primer (a,d) und der Mutagenese-Primer (b,c) zwei DNA-Fragmente synthetisiert. In der zweiten PCR werden die isolierten DNA-Fragmente vereinigt und dienen als Matrize für die Amplifikation des vollständigen, mutierten Gens mit den flankierenden Primern a und d.

2.4.4 Restriktionanalyse von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgt durch Inkubation für 1–3 h bei 37°C mit dem entsprechenden Restriktionsenzym. Die Menge des eingesetzten Enzyms sowie die Wahl des Puffers erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA erfolgt durch Inkubation von 50 ng des zweifach geschnittenen Vektors mit einem zweifachen molaren Überschuß des DNA-Fragmentes und 1 U T4-DNA-Ligase in 20 µl Ligase-Puffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5 % (w/v) PEG 8000, pH 7,6) 5-10 Stunden bei RT. Anschließend wird die Ligase durch 15-minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert.

2.4.6 Transformation in *E. coli*

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen erfolgt mittels Elektroporation mit Plasmid-DNA nach der Methode von Dower et al. 1988. Dazu werden 10 ng Plasmid-DNA beziehungsweise 10 µL eines Ligationsansatzes (s. Kapitel 2.4.5) mit 10 µL H₂O verdünnt, mit 70 µL einer 10 %igen Glycerinsuspension kompetenter Zellen (OD₅₇₈ ≈ 100) vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die Transformation erfolgt mittels eines Gene-Pulsers von BioRad (München) durch einen Puls von 1,5 kV, 800Ω, 25 µF und einer Zeitkonstanten von 10 ± 2 s. Die Zellen werden in 1 mL 2TY-Medium aufgenommen, 1 h bei 37°C und 200 Upm geschüttelt und anschließend auf antibiotikahaltigen 2TY- oder LB-Agar-Platten ausplattiert.

2.4.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgen durch Cycle-Sequencing mit fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden (Sanger *et al.*, 1977). Hierzu werden in 20 µL Reaktionsvolumen 200-1000 ng Plasmid-DNA, 6 µL Big-Dye-Terminator-Mix (Applied Biosystems, ABI), 10 pmol Primer-Oligonukleotid und 2 µL DMSO gemischt. Folgender PCR-Zyklus wird 25-mal durchlaufen:

96°C (10 s) → 55°C (5 s) → 60°C (4 min)

Anschließend werden die Reaktionsprodukte mit Ethanol gefällt und das Pellet nach einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol an der Luft getrocknet.

Die elektrophoretische Analyse der Reaktionsprodukte erfolgt an einem DNA-Sequencer Model 373 (ABI).

2.4.8 Zellanzucht

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt in LB-Medium (10 g Trypton(140)-Hydrolysat, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl ad 1000 mL, pH 7,2) oder 2TY-Medium (16 g Trypton (140)-Hydrolysat, 10 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl ad 1000 mL, pH 7,2) in 5 mL Reagenzgläsern oder 25-5000 mL Erlenmeyer-Kolben mit Schikane (Volumenverhältnis Kultur: Kolben = 1:3 – 1:4) bei 37°C und 200 Upm. Zur Selektion wird, soweit nicht anders angegeben, das Antibiotikum Kanamycin mit einer Konzentration von 50 µg/mL verwendet. Die Zellvermehrung wird durch Trübungsmessung bei 578 nm (1 OD₅₇₈ ≈ 2 × 10⁸ Zellen/mL) verfolgt.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Proteinexpression und Aufreinigung

Die Expressionskultur wird aus einer Vorkultur ($OD_{578} \sim 4-6$) auf eine $OD_{578} \sim 0,06$ angeimpft und bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{578} \sim 1,0$) unter Schütteln wachsen gelassen (160 rpm, 37°C). Die heterologe Expression des jeweiligen Proteins erfolgte durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Die Expressionskultur wird nach Induktion 2,5-4 Stunden geschüttelt (160 rpm, 37°C). Die Zellernte erfolgt durch Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C 15 min. Das Zellpellet wird mit Zellwaschpuffer (150 mM NaCl, 25 mM Na_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8; 2mM EDTA) gewaschen und kann anschließend bei -20°C gelagert werden oder nach Resuspension in ZWP weiterverarbeitet werden.

2.5.1.1 Aufreinigung des zytoplasmatischen Proteins

Für die Aufreinigung des zytoplasmatischen Proteins *NpHtrII84-230-His*, *NpHtrII84-136* und *NpHtrII137-230-His* werden folgende Puffer verwendet:

B_{zyto} : 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH=8

C_{zyto} : 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8,0
+ 30 mM Imidazol

D_{zyto} : 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8,0
+ 200 mM Imidazol

E_{zyto} : 10 mM Tris/HCl, pH = 8

F_{zyto} : 80 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl, pH = 8

G_{zyto} : 500 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH = 8

Der Aufschluss der Zellen erfolgt mittels Ultraschall-Behandlung oder im Mikrofluidizer. Die Membran werde bei 45.000 rpm, 1,5 h, 4°C zentrifugiert. Unlösliche Bestandteile werden mittels Ultrazentrifugation abgetrennt. Die Reinigung von Protein erfolgt über Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden). Die Säule wird mit B_{zyto} equilibriert. Nach Auftragen der Proteinlösung wird mit 10 Säulenvolumina C_{zyto} gewaschen und anschließend mit D_{zyto} eluiert. Das überschüssige Imidazol wird daraufhin mittels DEAE Anionenaustauscherchromatographie entfernt. Dazu wird das Eluat auf 30 mM NaCl mit E_{zyto}

verdünnt und auf das mit F_{zyto} equilibrierte Säulenmaterial aufgetragen. Es wird mit 5 Säulenvolumina F_{zyto} gewaschen und das Protein mit G_{zyto} eluiert.

2.5.1.2 Aufreinigung des Membranproteins

Für die Aufreinigung der Membranproteine *NpHtrIIhis*, *NpSRII-His*, *NpHtrII1-230* und *NpHtrII1-157his* werden folgende Puffer verwendet:

A	300 mM NaCl, 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 8,0, 2 % DDM (w/v)
B_{mem}	300 mM NaCl, 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 8,0, 0,05 % DDM (w/v)
C_{mem}	300 mM NaCl, 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 8,0, 0,05 % DDM (w/v) + 30 mM Imidazol
D_{mem}	300 mM NaCl, 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 8,0, 0,05 % DDM (w/v) + 200 mM Imidazol
E_{mem}	10 mM Tris, pH 8,0, 0,05 % DDM (w/v)
F_{mem}	80 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0, 0,1 % DDM (w/v)
G_{mem}	500 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0, 0,1 % DDM (w/v)

Dem Puffer ist DDM zur Solubilisierung des *NpHtrII1-230* zugesetzt. DDM ist ein mildes Detergenz, das Membranproteine in Lösung stabilisiert. (Struktur sieht Abbildung 2.2.)

Der Zellaufschluss der Membranproteine erfolgt in gleicher Weise wie beim zytoplasmischen Protein. Durch die Zentrifugation der aufgeschlossenen Zellen wird die Zellmembran sedimentiert, diese in 3-4 mL Puffer A pro Gramm Zellpellet homogenisiert und zur Solubilisierung mit Puffer A über Nacht bei 4°C gerührt. Nach erneuter Zentrifugation (90 min, 45.000 rpm, 4°C) werden die solubilisierten Proteine über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Die Säule wird vorher mit B_{mem} equilibriert.

Nach dem Auftragen des Solubilisats wird mit 10 Säulenvolumina C_{mem} gewaschen und mit D_{mem} eluiert. Das überschüssige Imidazol wird mittels DEAE Anionenaustauscherchromatographie entfernt. Dazu wird das Eluat auf 30 mM NaCl mit E_{mem} verdünnt und auf das mit F_{mem} equilibrierte Säulenmaterial aufgetragen. Es werde mit 5 Säulenvolumina F_{mem} gewaschen und das Protein mit G_{mem} eluiert.

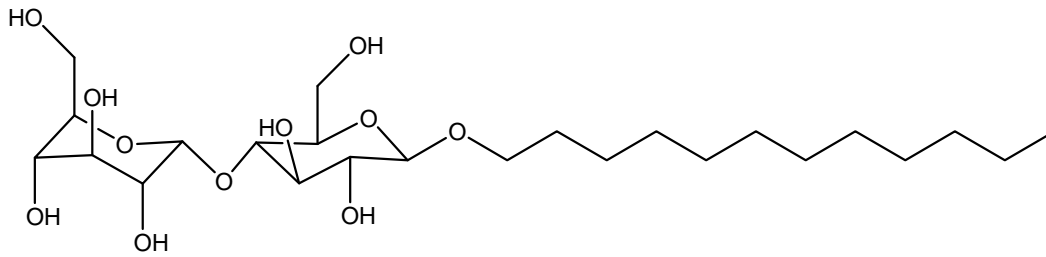


Abb. 2.2 Struktur des Detergenz Dodecyl-maltosid (DDM)

2.5.1.3 ^{15}N , ^{13}C -Isotopenmarkierung des Proteins

Für die Expression der isotopenmarkierten Proteine wird Minimal-Medium (7,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g KH_2PO_4 , 0,5 g NaCl , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,014 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g NH_4Cl pH 7,1 auf 1 L) verwendet.

In 1 L Medium wird 10 mL Spurenelementlösung hinzugefügt, die folgende Zusammensetzung hat:

Spurenelementslsg (SL):	9 mL 10 × SL4, 10 mL SL6, 81 mL H_2O , steril filtrieren
10 × SL4 Stammlösung:	500 mg EDTA, 200 mg $\text{Fe}(\text{II})\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ad H_2O bis 90 mL
SL6 Stammlösung:	100 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 47 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 300 mg H_3BO_3 , 200 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 18 mg $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 30 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ad H_2O bis 1000 ml

Die 2 mL-Vorkultur wird aus einer Einzelkolonie aus BL21(DE3) pET-*NpHtr84-230-His* in 2 mL Minimal Medium (+ SL), (20 μL 100 g/l NH_4Cl , 10 μL 40% D-Glucose, 2 μL 50 g/l Kanamycin) geimpft und 7 Stunden bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

Diese 2 mL-Vorkultur wird in 100 mL Vorkultur (100 mL MM, 1 mL 100 g/l NH_4Cl , 0,5 mL 40% D-Glucose, 100 μL 50 g/L Kanamycin) angeimpft, über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert ($\text{OD}_{578} \sim 4-6$).

Die 2 Liter Expressionskultur (2 L MM, 4g ^{13}C D-Glucose, 2 g ^{15}N NH_4Cl , 2 mL 50 mg/ml Kanamycin) in einem 5 L Kolben wird aus der 100 mL Vorkultur auf eine $\text{OD}_{578} \sim 0.06$ angeimpft und bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($\text{OD}_{578} \sim 1.0$) unter Schütteln wachsen gelassen (160 rpm, 37°C). Die heterologe Expression des Proteins erfolgt durch Zugabe von 0.5 mM IPTG. Die Expressionskultur wird nach der Induktion 4 Stunden

geschüttelt (160 rpm, 37°C). Die Zellernte erfolgt durch Zentrifugation bei 5000 rpm bei 4°C für 15 min. Das Zellpellet wird mit Zellwaschpuffer (ZWP) gewaschen und kann anschließend bei -20°C gelagert werden oder nach Resuspension in ZWP weiterverarbeitet werden.

Die Aufreinigung der isotope-markierter Proteine erfolgt wie in Kapitel 2.5.1.1 beschrieben.

2.5.1.4 Reverse-Markierung

Um spektrale Überlappungen bei der NMR-Spektroskopie zu reduzieren, werden einige Aminosäuren in Protein umgekehrt markiert. Dieses erfolgt durch Zugabe von 1g ausgewählter unmarkierter Aminosäure in 1,5L ¹⁵N,¹³C-Minimal-Medium bei der Protein Expression.

2.5.2 Spinmarkierung

Um die Cysteinmutanten mit Spinlabel zu markieren, erfolgt zwischen den beiden oben beschriebenen Säulenaufreinigungen ein zusätzlicher Reduktionsschritt. Das Eluat der Ni-NTA-Säule wird zur Reduktion der Cysteinseitenketten mit DTT (Dithiothreitol) auf eine Endkonzentration von 10 mM bzw. mit TCEP (Tris-(carboxyethyl)-phosphin) auf eine Endkonzentration von 5 mM eingestellt und mindestens 2 h bei 4 °C inkubiert. Im Falle der Reduktion mit DTT erfolgt anschließend eine DEAE-Säulenchromatographie, wobei sowohl das Imidazol als auch das Reduktionsmittel abgetrennt werden. Um die Reoxidierung der Cysteinseitenketten zu vermeiden, muss dieser Reinigungsschritt unter Schutzgas (Argon) erfolgen. Bei Verwendung von TCEP entfällt dieser Reinigungsschritt, da es in seiner Struktur keine Thiole enthält und daher für die nachfolgende Reaktion nicht abgetrennt werden muss.

Dem DEAE-Eluat wird aus einer 100 mM Stammlösung der Spinprobe MTSSL (in DMSO) 1/100 Volumenäquivalent zugegeben und der Reaktionsansatz über Nacht bei 4°C unter Lichtausschluss leicht geschwenkt. Überschüssiger Spin-Label wird durch DEAE-Chromatographie abgetrennt.

2.5.3 Rekonstitution der Membranproteine in PM-Lipide

Für die Rekonstitution der Proteine wird ein Komplex in einem 1:1 (w/w) Verhältnis mit polaren Lipiden gebildet. Dabei sollte der DDM-Gehalt etwa 0,05%-0,1% betragen und der pH-Wert zwischen 7-8 liegen. Zu der Lösung gibt man eine Spatelspitze NaCl und inkubiert diese 10 min bei 4°C. Anschließend werden Detergenz-Absorber-Beads zugegeben und ü.N.

bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Biobeads werden über Glaswolle abgetrennt und mit M-Puffer (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 M-Puffer gewaschen und anschließend in 100 µl M-Puffer aufgenommen.

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

2.5.4 Komplexbildung

NpSRII und der Transducer *NpHtrII* werden in molarer Stöchiometrie von 1:1 in Puffer Gmem gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wird am nächsten Tag mit Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200 prep grade, GE Healthcare) aufgearbeitet. Der isolierte Rezeptor-Transducer Komplex ist für mehrere Tage bei 4°C homogen und stabil in Konzentrationen von 2-3 mg/ml.

2.5.5 Nanodiskformation

Für die Formation der Nanodisks werden aufgereinigtes MSPD1E3, SRII oder Photorezeptor Komplex und Lipide gemischt und inkubiert. Um die Autoformation der Nanodisks einzuleiten werden 2/3 Volumen Bio-Beads SM2 (BioRad, Hercules, USA) hinzugefügt und die Probe leicht geschüttelt. Dabei werden verschiedene Ansätze zur Optimierung angesetzt. Es können die molaren Verhältnisse, die Lipide sowie die Inkubationszeit und Formationszeit mit Biobeads variiert werden. Anschließend wird die Probe durch einen 22 µm Filter filtriert und sofort mittels Gelfiltration (Superdex 200 oder Superose 6, GE Healthcare) aufgearbeitet. Für die Nanodisk Ansätze und die Gelfiltration wird Puffer (20 mM Tris, 100mM NaCl, pH=7,4) verwendet.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt

werden. Die Durchführung erfolgt nach der Methode von Schägger und Jagow 1991. Durch Inkubation der Proteine mit SDS werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine. Die stark negative Ladung von SDS nivelliert alle Ladungen der Proteine, so dass in der Regel alle Proteine negativ geladen sind und sich nur nach ihrer Größe unterscheiden. Mit dieser Methode erhält man Informationen über das Molekulargewicht von Proteinmonomeren und kann gleichzeitig die Effizienz der einzelnen Reinigungsschritte nachprüfen.

Es wird in der Regel ein 12% Trenngel und 4% Sammelgel verwendet (s.u.). Die angelegte Spannung liegt zwischen 80-120 V. Danach werden die Proteinbanden zunächst 10 min mit Coomassie-Blue-Färbelösung gefärbt und anschließend ü.N. entfärbt. Die verwendeten Puffer haben folgende Zusammensetzung:

Acrylamid-Stammlösung	30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris/HCl, 0,8% SDS, pH 8,8
Sammelgel-Puffer	0,25 M Tris/HCl, 0,4% SDS, pH 6,8
10 % SDS	10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in H ₂ O
TEMED	= N,N,N',N' Tetramethylethyldiamin
10 % APS	10 % (w/v) Ammoniumperoxidisulfat in H ₂ O
2 x Probenpuffer	0,2 M Tris/HCl, pH 6,8, 6 % SDS, 30 % Glycerin, 0,3 M Dithiothreitol, 0,05 % Bromphenolblau
Kathodenpuffer	150 mM Tris/HCl, 1,5 M ε-Aminocapronsäure, pH 7,0
Anodenpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,0
Färbelösung	2,5 g Coomassie Blue R-250, 500 mL Methanol, 70 mL Essigsäure, H ₂ O ad 1000 mL
Entfärbelösung	500 mL Methanol, 70 mL Essigsäure, H ₂ O ad. 1000 mL

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgt nach der Methode Ehresmann *et al.*, 1973 über die Absorption bei 228,5 nm und 234,5 nm nach folgender Formel:

$$c_{Np_{Hrill}} = \frac{(A_{228,5} - A_{234,5})}{3,14} [mg / ml]$$

2.6.3 Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Durch Massenspektrometrie (MS) wird das Masse-Ladungs-Verhältnis eines Teilchens gemessen. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Als Analysator werden Quadrupel oder Ionenfallen eingesetzt. Als Detektor dient ein Photomultiplier. Bei der ESI wird die zu analysierende Lösung durch eine Metallkapillare geleitet. In einem elektrischen Feld werden die Ionen elektrophoretisch getrennt. An der Spitze der Kapillare bildet sich dabei ein Kationen Überschuss, welche über einen Taylor-Konus aus der Kapillare austreten. Aufgrund der Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert sich die Tropfengröße, während die Dichte des elektrischen Feldes auf der Tropfen-Oberfläche zunimmt. Wenn der Radius der Tropfen kleiner als das sog. Rayleigh Limit wird kommt es zu sog. Coulomb Explosionen, wobei kleinere Tröpfchen entstehen. Dieser Vorgang wiederholt sich solange bis letztlich winzige Tropfen von ca. 1 nm Durchmesser übrigbleiben, die nur ein ionisiertes Analytmolekül enthalten. Diese werden zum Analysator gelenkt und gemessen. Bei der ESI entstehen auch mehrfach geladene Moleküle.

2.6.4 Gelchromatographie

Gelfiltrationsmaterialien sind Substanzen mit einer definierte Porengröße. Partikel, die in diese Poren eindringen können, steht ein größeres Aufenthaltsvolumen zur Verfügung. Kleine Partikel wandern also langsamer durch eine Gelfiltrationssäule als große Substanzen.

Das Transducer Protein wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule von Amersham (Buckinghamshire UK) analysiert. Der Laufpuffer, der für die Dialysemethode verwendet wird, enthält 20mM NaCl, 25 mM NaPi, 5 µM TCEP pH 6. Es wird dieselbe Knauer FPLC-Anlage wie für die Proteinreinigung verwendet. Die Flußraten betragen 0,5 mL/min. Am Ende der Aufreinigung wurde die Säule zuerst mit H₂O und anschließend mit 20% Ethanol gewaschen.

Als Protein-Molekulargewichtstandard dient eine Mischung aus Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Ribonuclease (13,7 kDa). Der typische Trennverlauf ist für die Proteinmischung des Gelfiltrations-Standard bei 0,5 ml/min in Abbildung 2.3 dargestellt. Die Retentionszeit der Makromoleküle ist umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht, so daß sich in der halblogarithmischen Darstellung eine Eichgrade konstruieren läßt.

Damit bekommt man eine entsprechende Formel für das Protein-Molekulargewicht:

$$\text{Molekulargewicht} = 10^{7,7 + (-0,098 * t[\text{min}])}$$

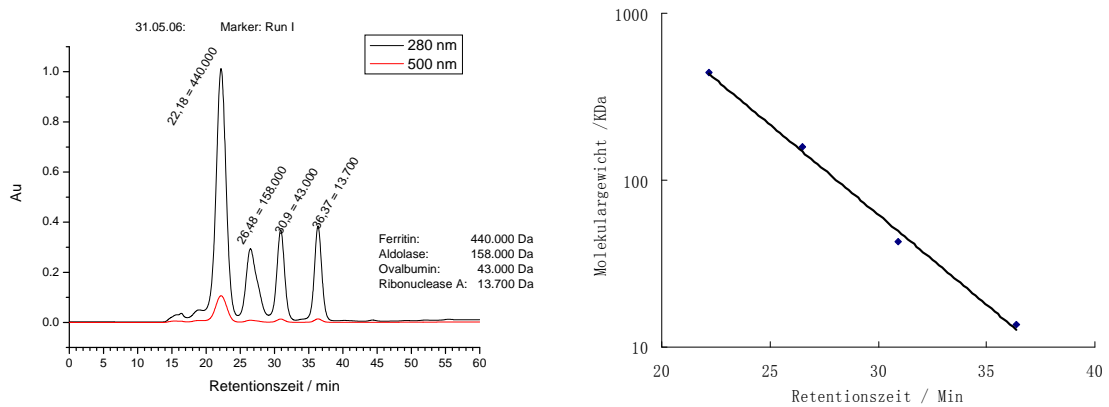


Abb. 2.3 Chromatogramme der FPLC-Gelfiltrationen. Links ist die Trennung des Proteinsstandard dargestellt, aus dem die Eichkurve (rechts) abgeleitet wird.

2.7 Biophysikalische Methoden und Strukturaufklärung

2.7.1 CD-Spektroskopie

Bei der CD-Spektroskopie (CD, nach englisch „circular dichroism“) nutzt man die Tatsache, daß optisch aktive Substanzen nicht nur mit linear, sondern auch mit zirkular polarisiertem Licht wechselwirken können. Die Extinktionskoeffizienten ϵ_L und ϵ_R für links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterscheiden sich. Die eigentliche Meßgröße ist die Differenz der Extinktionskoeffizienten. Praktisch gibt man die sogenannte Elliptizität Θ_λ an, die wie folgt definiert ist:

$$\tan \Theta_\lambda = \frac{I_R - I_L}{I_R + I_L}$$

Hierbei sind I_R und I_L die Intensitäten des rechts und links zirkular polarisierten Lichts nach der Absorption durch die Probe. Die Elliptizität ist wellenlängenabhängig (daher der Index λ) und erlaubt somit das Aufnehmen von Spektren. Unter Berücksichtigung von Schichtdicke und Probenkonzentration kann man auch eine molare Elliptizität Θ_M , in Abhängigkeit von der Wellenlänge, angeben.

CD-aktive Substanzen zeichnen sich durch große, übergeordnete Strukturen aus. Insbesondere bei Proteinen kann die CD-Spektroskopie wertvolle Informationen über den Sekundärstrukturgehalt liefern. Während ein denaturiertes, ungeordnetes Protein nur wenig Auslenkung des CD-Signals zeigt, haben α -Helizes und β -Faltblätter deutlich voneinander unterscheidbare Maxima und Minima im CD-Spektrum. Der Meßbereich liegt hierbei etwa zwischen 250 und 190 nm. Die Untergrenze des Meßbereichs wird hierbei durch Geräteparameter festgelegt. Wird die UV-Absorption der Probe zu hoch, verschlechtert sich das Signal-Rausch-Verhältnis. Proben, die unter 200 nm gemessen werden sollen, dürfen keine im UV-Bereich absorbierenden Substanzen (außer dem Protein) enthalten und sollten möglichst verdünnt und in geringen Schichtdicken verwendet werden. Problematisch ist ebenfalls die UV-Absorption durch Luftsauerstoff in diesem Wellenlängenbereich, weshalb die Apparatur ständig mit Stickstoff gespült wird.

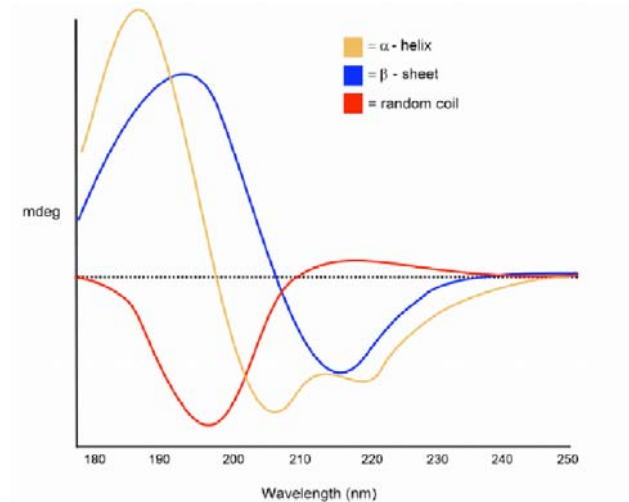


Abb. 2.4 Idealisierte Spektren unterschiedlicher Sekundärstrukturelemente

Die Circular dichroismus-Spektren von Proteinen können u.a. verwendet werden, um den Anteil der Sekundärstrukturelemente im Protein zu bestimmen. Abb. 2.4 zeigt ein idealisiertes CD-Spektrum unterschiedlicher Sekundärstrukturelemente. α -helikale Bereiche geben beispielsweise ein sehr viel stärkeres Signal im kurzwelligen UV-Bereich als β -Faltblattbereiche.

Alle CD-Spektren wurden mit einem CD-Spektropolarimeter Jasco J-715 (Easton, USA) bei Raumtemperatur aufgenommen. Die verwendeten Küvetten hatten eine Schichtdicke von 0,1 mm. Die Probenkammer wurde ständig mit Stickstoff gespült, um Absorptionseffekte durch Sauerstoff zu vermeiden. Die Spektren wurden mit einer Auflösung von 1 nm und einem Aufnahmebereich zwischen 260 nm und 190 nm innerhalb von 50 nm/min aufgenommen. Es wurden jeweils zehn Spektren gemittelt. Die Proteinkonzentrationen lagen je nach Messung zwischen 0,05 und 0,1 mg/ml. Nach Qualität des Signals werden 10 - 20 Spektren aufaddiert.

Die Ergebnisse werden von der gemessenen Absorption in molare Elliptizität ($[\theta]_{\text{mrw}}/103\text{deg}\cdot\text{cm}^3/\text{dmol}$) konvertiert. Beides wird mit Hilfe des Programms „Spectra Manager“ Version 1.53 (Jasco) durchgeführt. Die Sekundärstruktur Voraussagen erfolgen mittels den Algorithmen CCA (Toniolo & Bonora, 1975), ContinII und CDSSTR aus dem Programm Packet CDPro (Sreerama & Woody, 2000) mit einer Referenz von 56 Proteinen, die 13 Membranproteine einschließt (SMP56, Referenz kann auf der CDPro Webseite gefunden werden: <http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>).

2.7.2 Laserblitz-Absorptions-Spektroskopie

Für die transienten Absorptionsmessungen wird eine rechnergestützte Messvorrichtung nach Chizhov et al. verwendet. Abbildung 2.5 zeigt den schematischen Aufbau dieser Apparatur (Chizhov et al., 1996). Die photochemische Anregung der Probe erfolgt mit einem Laserpuls. Das ungefilterte Licht einer Halogenlampe durchtritt die Probenküvette (Quarzglas, Schichtdicke 3 mm) im rechten Winkel zum Laserpuls und wird nach Wellenlängen-Selektion durch einen Monochromator von einem Photomultiplier detektiert. Mittels zwei digitalen Oszilloskopen werden die vom Detektor kommenden Signale in zwei linearen, einander überlappenden Zeitfenstern gespeichert. Die Datenverarbeitung geschieht über den angeschlossenen Computer. Es werden für Photozyklus-Messungen pro Wellenlänge 9 Messwerte gemittelt. Die beiden überlappenden Zeitfenster beinhalten die Absorptions-Signale, welche die Kinetik des Photozyklus nach der Probenanregung durch den Laserpuls bis zur vollständigen Rückbildung des Grundzustandes erfassen. Die Messdaten werden auf eine logarithmische Zeitskala (250 Datenpunkte) nach der Methode von Müller und Plesser reduziert (1991). Anhand des Fehlers des Grundsignals wird die Standardabweichung abgeschätzt. Eine Auswertung der Daten erfolgt durch das Programm MEXFIT.

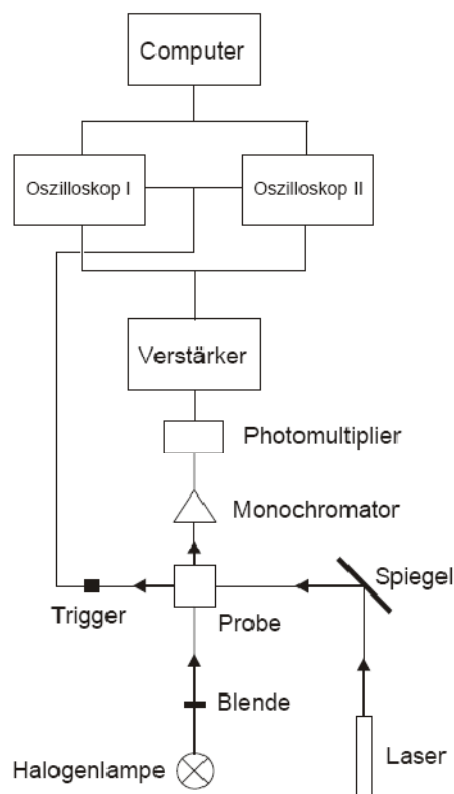


Abb. 2.5 Schematischer Aufbau der Apparatur zur kinetischen Messung des Photozyklus des sensorischen Rhodopsins (aus Dissertation J. P. Klare)

2.7.3 ANS-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie

Die Fluoreszenz-Messungen wurden auf einem Spex Fluoromax-3 Spektrofluorometer (Jobin Yvon, Edison, NJ, USA) mit einem Temperaturegler durchgeführt. Allen Proben wurden in 25 mM NaPi Puffer mit 2 μ M ANS und 2 μ M HtrII84-230-His in 1 ml Quarzküvetten (1cm Länge Zelle) gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug bei 380 nm eingestellt und die Emissionsspektren wurden im Bereich von 400 nm-600 nm aufgenommen.

2.7.4 ESR-Spektroskopie

Elektronen-Spin-Resonanz (ESR), oder auch Elektronen-Paramagnetische-Resonanz (EPR) genannt, ist eine spektroskopische Methode, mit der Informationen über die Zugänglichkeit, Dynamik, Wechselwirkung und Kinetik spinmarkierter Proteinseitenketten erhalten werden können. Das EPR-Experiment ist ein magnetisches Resonanzexperiment, das heißt die zuvor entarteten Energieniveaus der Elektronenspins werden in einem außen angelegten Magnetfeld aufgespalten und Übergänge zwischen diesen Niveaus mithilfe elektromagnetischer Strahlung induziert. Diamagnetische System, also Moleküle in denen alle Elektronen gepaart sind, können für die EPR-Spektroskopie zugänglich gemacht werden, indem gezielt so genannte Spinlabel, insbesondere Nitroxide, kovalent an das Biomoleküle gebunden werden. Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten MTS-Spin-Labels ((1 - Oxyl - 2,2,5,5 -tetramethylpyrrolin-3-methyl) methan-thiosulfonat) erfolgt diese kovalente Bindung an ein, über ortsspezifische Mutagenese des Proteins eingeführtes, Cystein in Form einer Disulfid-Brücke an die reaktive SH-Gruppe. Abbildung 2.6 zeigt schematisch die Kopplungsreaktion dieses Verfahrens, welches als „site directed spin labelling“ (SDSL) bezeichnet wird (Hubbell & Altenbach, *et al.*, 1994).

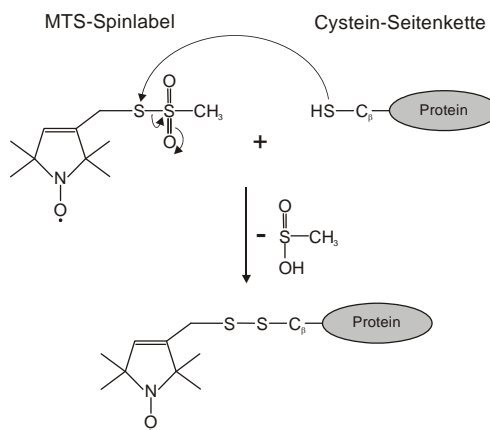


Abb. 2.6 Kopplungsreaktion des MTS-Spin-Labels an die Cysteinseitenkette eines Proteins in schematischer Darstellung

Mobilität

Nitroxidspinlabel werden auch häufig benutzt, um Informationen über die Mobilität von Biomolekülen zu erhalten. Dabei wird ausgenutzt, dass sich das Nitroxidspektrum in Abhängigkeit von der Rotationsfreiheit des Nitroxids ändert. Ist es frei in seiner Rotationsbewegung erhält man im X-Band ein isotropes Dreilinienspektrum mit kleiner Linienbreite wie in Abbildung 2.7 oberes Spektrum gezeigt. Wenn dagegen die Bewegung des Spinlabels durch starke Wechselwirkungen mit benachbarten Seitenketten oder Atomen des Proteinerückgrates eingeschränkt wird, beobachtet man ein anisotropes Spektrum mit größeren Linienbreite wie in Abbildung 2.7 unter. Je nach Grad der Einschränkung der Rotationsfreiheit ändert sich das Linienbreite graduell von klein nach groß. Diese immobilen Spektren können im Allgemeinen nicht durch ein einfaches isotropes Bewegungsmodell simuliert werden, da die Wechselwirkung der Spinlabelseitenketten mit benachbarten Atomen anisotrop ist.

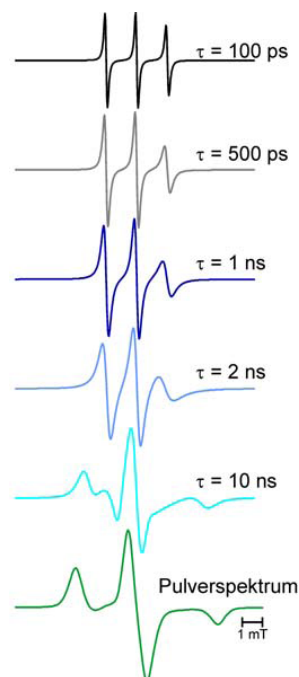


Abb. 2.7 Einfluss der Rotationskorrelationszeit auf das cw-X-Band-EPR-Spektrum des Nitroxids Tempol. Bei freier Rotation sind die drei Hyperfeinlinien des Nitroxids durch $A_{\text{iso}} = 1,7\text{mT}$ aufgespalten. Ist die Rotation völlig eingefroren, wird das Nitroxidspektrum von der anisotropen A_z -Hyperfein-kopplungskonstante von $3,7\text{mT}$ dominiert (Bildung aus Holterhues Dissertation 2009).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der HAMP Domänen des *NpHtrII*

Bisher liegen nur wenige strukturelle Informationen zu HAMP Domänen vor. Die Untersuchungen der Primärstruktur des Transducers *NpHtrII* zeigen eine Homologie zu den bakteriellen Chemorezeptoren. Fast alle MCPs enthalten eine Linkerregion, welche ca. 60 Aminosäuren umfasst. Die Linkerregion in *NpHtrII* ist jedoch wesentlich länger als bei anderen MCPs, und es können zwei HAMP Domänen Einheiten mit Coiled-coil Struktur in *NpHtrII* vorausgesagt werden. Die genaue Bedeutung dieser HAMP-Domänen ist noch nicht geklärt.

3.1.1 Klonierung und Präparation der HAMP Domäne

In Folgenden werden zunächst alle Klonierungsstrategien und anschließenden Aufreinigungs-Protokolle der in dieser Arbeit verwendeten Proteine beschrieben. Für NMR- und Kristallisationsversuche zur Aufklärung der Struktur der Linker-Region sollen verschiedene *NpHtrII*-Konstrukte hergestellt werden: 1. *NpHtrII*1-230, 2. *NpHtrII*84-136, 3. *NpHtrII*137-230 und 4. *NpHtrII*84-230.

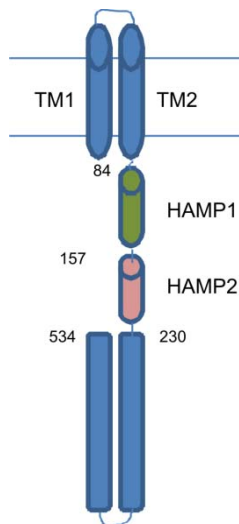


Table 3.1: *NpHtrII* Konstrukte

Abkürzung	Detail	Beschreibung
<i>NpHtrII</i>₂₃₀	<i>NpHtrII</i> 1-230-His	C-Terminal verkürztes <i>NpHtrII</i> 1-230 (TM1+TM2+HAMP1+HAMP2)+ His Tag
<i>NpHtrII</i>₁₅₇	<i>NpHtrII</i> 1-157-His	C-Terminal verkürztes <i>NpHtrII</i> 1-157 (TM1+TM2+HAMP1)+ His Tag
<i>NpHtrII</i>	<i>NpHtrII</i> 1-534-His	Vollängen Transducer + His Tag
HAMP1	<i>NpHtrII</i> G84M-136-His	<i>NpHtrII</i> Aminosäuren 84-136 (HAMP1)+ His Tag
HAMP2	<i>NpHtrII</i> 137M-230-His	<i>NpHtrII</i> Aminosäuren 137-230 (HAMP2)+ His Tag
HAMP1+2	<i>NpHtrII</i> G84M-230-His	<i>NpHtrII</i> Aminosäuren 84-230 (HAMP1+HAMP2)+ His Tag

Abb. 3.1 Schematisches Modell des *NpHtrII*-Transducers. Markiert sind die Aminosäureposition am Anfang der ersten HAMP Domäne (84), zwischen HAMP1 und HAMP2 (157), zwischen HAMP 2 und Signal-Domäne und die Endposition 534 zur Einordnung der verschiedenen Transducer-Kürzungen.

Zur Expression der im oben beschriebenen Proteine wurde das von Studier und Moffatt (1986) entwickelte pET-System genutzt (siehe Abb. 3.2). Der Expressionsvektor besitzt die üblichen Vektorelemente. *ori* als Replikationsursprung, eine Ribosomen-Bindestelle und eine Antibiotikaresistenz, in diesem Fall gegen Kanamycin. Zusätzlich enthält er noch ein *lacI*-Gen, sowie einen T7-Promotor unter der Kontrolle des *lac*-Operators. Daran schließt sich ein kurzes offenes Leseraster mit einer multiplen Klonierungsstelle für den Einbau der interessierenden DNA in das richtige Leseraster an. In der vorliegenden Arbeit wurden die DNA-Sequenzen mit *NcoI* und *HindIII* oder *NcoI* und *EcoRI*-Schnittstellen versehen und *NcoI/HindIII* oder *NcoI/EcoRI* geschnitten in den entsprechend gleich geschnittenen pET27b-mod-Vektor kloniert. In Bakterien ist dieser Expressionsvektor inaktiv, solange der *lac*-Repressor die Transkription der eingebauten DNA verhindert. Damit eine Transkription erreicht wird, müssen spezielle *E.coli* Stämme verwendet werden, da der T7-Promotor nur durch die T7-RNA-Polymerase, nicht aber durch die *E.coli*-Polymerasen erkannt wird.

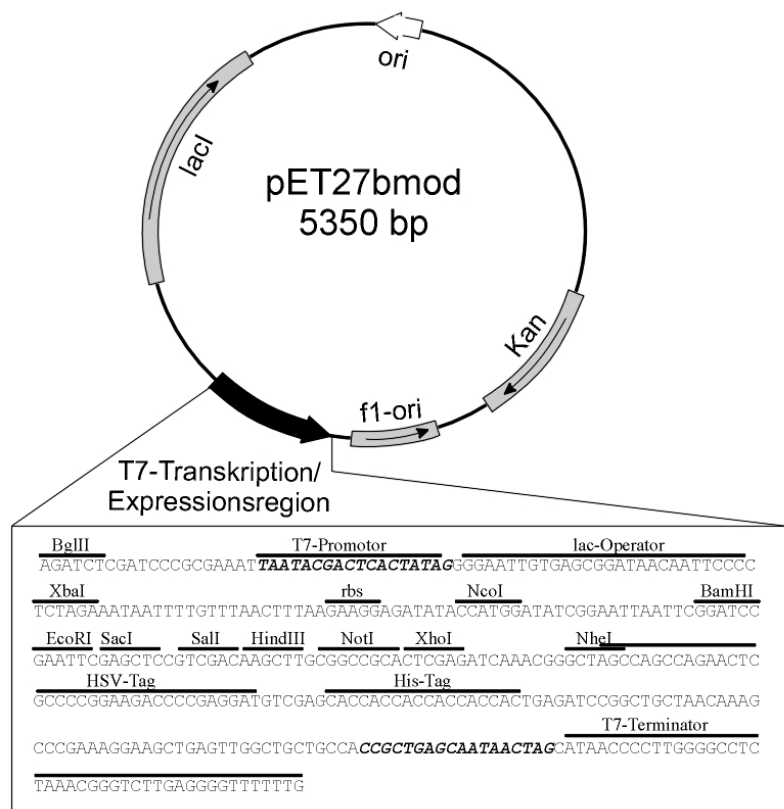


Abb. 3.2 Physikalische Karte des Vektors pET27-bmod (Klostermeier et al., 1998). Die Komponenten der Transkriptions/Expressionsregion sind in der Sequenz durch Überstrich gekennzeichnet. An den fett hervorgehobenen Sequenzbereichen können die T₇-Promotor bzw. T₇-Terminator Primer hybridisieren.

Der in dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stamm BL21(DE3) trägt eine chromosomale Kopie des T_7 -RNA-Polymerase-Gens aus dem Bakteriophagen λ DE3 unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors, der ebenfalls durch den lac-Operator reguliert wird. Durch Zusatz des Induktors IPTG, der den lac-Repressor vom Operator titriert, kann die Transkription auf einfache Weise freigegeben werden.

Durch den Einbau von terminalen Fusionspeptiden, sogenannten „tags“, kann eine nach der Expression anschließende Proteinaufreinigung vereinfacht werden. In dieser Arbeit wurde den Proteinen C-terminal ein Oligopeptid aus sieben Histidin-Resten (His-Tags) angehängt. Proteine mit His-Tags binden Nickel-Salze und können durch Affinitätsäulen mit nickelspezifischen Chelatbildnern, wie z.B. Nitrilotriessigsäure (NTA), von den restlichen Proteinen des Bakterienextraktes getrennt werden. Die Bindung von Proteinen mit His-Tags an die Ni-NTA-Matrix ist mit einem K_D -Wert von ca. 10^{-14} sehr stark. Neben den Histidin-verknüpften Proteinen binden unspezifisch auch andere Proteine, beispielsweise solche die eine Folge von Histidinen in ihrer Primärsequenz tragen. Diese können jedoch durch geringere Imidazolkonzentrationen von 30-40 mM verdrängt werden. Eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf etwa 200 mM führt schließlich zur Ablösung der Proteine mit His-Tag. Eine Lagerung der Proteine in Imidazolpuffer führte nach kurzer Zeit zur Proteinaggregation. Daher wurde nach der Affinitätschromatographie eine Ionenaustausch-Chromatographie mit DEAE Sepharose angeschlossen. In einem ersten Schritt bindet das Molekül an die fixierten Ladungen der stationären Phase (Diethylaminoethyl-Reste), und im zweiten Schritt erfolgt die Verdrängung und Elution des Proteins durch eine steigende Salzkonzentration (NaCl) in dem Elutionspuffer. Das Protein-Eluat konnte nun bei -80°C gelagert werden.

3.1.1.1 Expressionseffizienz und Aufreinigung des *NpHtrII84-230*-His

Die Expression des Transducers *NpHtrII* wurde, wie in Kapitel 2.5.1.1 beschrieben, in *E. coli* BL21(DE3) ausgeführt. Die Kontrolle der Effizienz der Expression erfolgt mittels SDS-Gelelektrophorese. An dieser Stelle werden die Expressionseffizienz in Abhängigkeit der Zeit und die jeweiligen Aufreinigungsschritte beispielhaft für *NpHtrII84-230* gezeigt (Abbildung 3.3).

Auf Bahn **1** wurde eine Probe vor Induktion durch IPTG aufgetragen. Bahn **2** enthält eine Probe nach 30 min der Induktion. Auf den Bahnen **3, 4, 5, 6** wurden Proben nach 60, 90, 120 und 150 Minuten der Induktion aufgetragen. Es wurden jeweils 100 μL Kulturproben abgenommen und bei $10.000 \times g$, 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 15 μL 2x SDS-

Probenpuffer aufgenommen, mittels Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Durch den Vergleich von Bahn 1 und Bahn 2 kann man erkennen, dass sich eine neue Bande bei 23 kDa bildet. 90 min nach Induktion ist ersichtlich, dass sich die neu entstandene Bande nicht weiter verstärkt und somit nicht mehr Protein durch die Bakterien exprimiert wurde. Auch ein angefertigter Western Blot gegen den C-terminalen Histidin Tag zeigte, dass es sich bei der neu entstandenen Bande um das erwartete *NpHtrII84-230*-His handelt. Auf Bahn 7 wurde das Pellet der Zelltrümmer und auf Bahn 8 die Zytoplasmafraktion aufgetragen. Wie erwartet, zeigte sich, dass das Protein *HtrII84-230* in der Zytoplasmafraktion enthalten ist und dieses im Pellet nicht nachweisbar war.

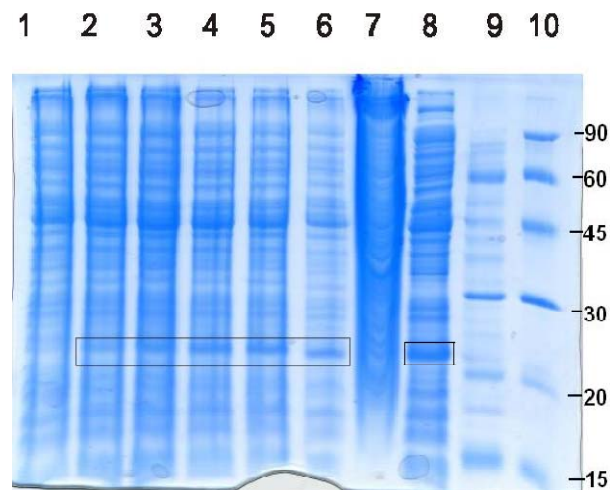


Abb. 3.3 12% SDS Polyacrylamid Gel der Expressionseffizienz in Abhängigkeit von der Zeit für *HtrII84-230*. Bahn 1): Kultur vor Induktion. 2) Kultur nach Induktion von 30 Min. 3) Kultur nach Induktion von 60 Min. 4) Kultur nach Induktion von 90 Min. 5) Kultur nach Induktion von 120 Min. 6) Kultur nach Induktion von 150 Min. 7) Pellet. 8) Zytoplasma. 9) und 10): Marker.

Da das Transducerprotein *NpHtrII84-230*-His mit einem C-terminalen Histidin-Tag kloniert wurde, konnte die Reinigung mittels Ni-NTA-Säulen erfolgen. Nach dem Aufschluss der Zellen und Zentrifugation, wurde die Zytoplasmafraktion auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen, wobei der Protein *HtrII84-230*-His an das Ni-NTA Material gebunden wurde. Die restlichen *E. coli* Proteine wurden nicht gebunden und eluierten direkt von der Säule. Etwaige unspezifisch gebundene Reste wurden mit 10 SV Puffer C_{zyto} von der Säule gewaschen. Das an Ni-NTA gebundene Protein wurde mit 3,5 SV Puffer D_{zyto} eluiert. Die ersten 0,5 SV wurden als Eluat 1 und die folgenden 3 SV als Eluat 2, 3, 4 gesammelt. Alle Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.4).

Als Kontrolle wurde in Bahn **1** des SDS-Gels das Pellet der Zelltrümmer, auf Bahn **2** die Durchflussfraktion, auf Bahn **3** die Waschfraktion, und auf den Bahnen **4**, **5**, **6**, und **7** die jeweiligen Eluate aufgetragen. Auf Bahn **8** befindet sich der Proteinmarker. Wie erwartet, wurde im Pellet, in der Durchflussfraktion und der Waschfraktionen das gewünschte Protein nicht detektiert.

Die Bahnen **5,6** und **7** weisen eine Bande mit einem molekularen Gewicht von 22 kDa auf. Außerdem kann man in Bahn **5** noch zwei schwache Banden, mit einem molekularen Gewicht von ca. 60 kDa und 70 kDa erkennen. Diese könnten höhere Oligomere des *NpHtrII84-230-His* sein, die sich bei höherer Konzentration ausbilden.

Das berechnete Molekulargewicht von *NpHtrII84-230-His* beträgt 17,5 kDa, während das Gel, wie oben beschrieben, eine Bande bei 22 kDa aufweist. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der großen Anzahl saurer Aminosäuren (*NpHtrII84-230-His*: pI = 4,3), die eine quantitative Bindung des negativ geladenen SDS durch elektrostatische Abstoßung stark behindern. Deshalb könnte das Protein im Gel langsamer wandern.

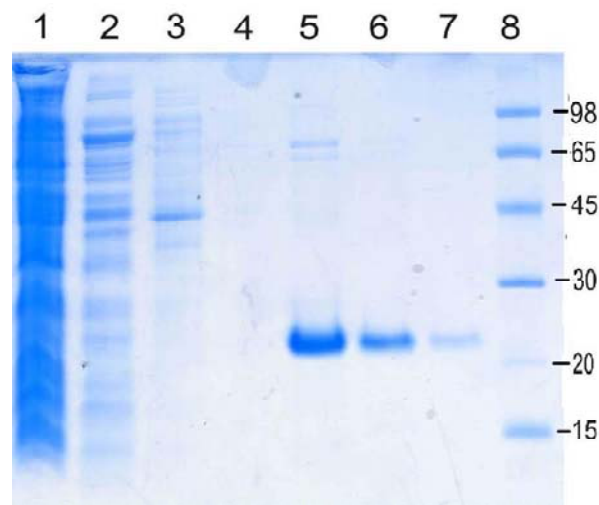


Abb. 3.4 12% SDS Polyacrylamid Gel zur Charakterisierung der Aufreinigung von *NpHtrII84-230-His*. Bahn **1**): Zelltrümmerpellet. **2**) Ni-NTA Durchfluss. **3**) Ni-NTA-Waschfraktion. **4**) Ni-NTA-Elution 1. **5**) Ni-NTA-Elution 2. **6**) Ni-NTA-Elution 3. **7**) Ni-NTA-Elution 4. **8**) Marker.

Zur Identifikation des Proteins wurden eine ESI-MS Analyse durchgeführt. Das ESI-MS-Spektrum zeigt Ladungsmuster des Proteins von +4 bis +20 (Abb. 3.5 A). Die aus der Ladungsverteilung berechnete Masse von 17526,9 Da ist im dekonvolvierten Spektrum (Abb. 3.5 B) dargestellt. Die theoretische Masse beträgt $17525,8 + 1(H^+)$. Dieser Wert stimmt im Rahmen der Messgenauigkeit mit der berechneten Masse überein.

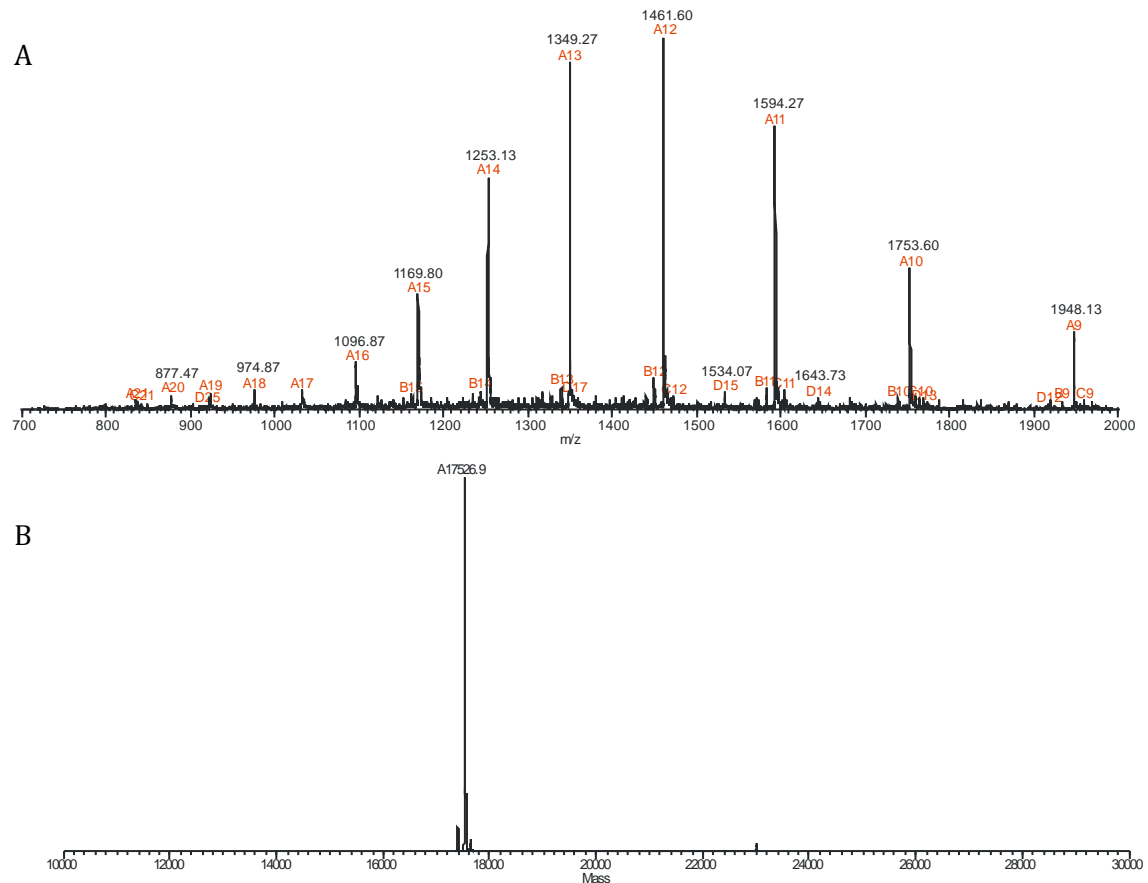


Abb. 3.5 A: ESI-MS-Spektrum des *NpHtrII84-230-His*. B: Das dekonvolutierte Spektrum. Die theoretische Masse beträgt 17525,8 Da.

3.1.1.2 Konzentrationsbestimmung und Ausbeute

Um die Konzentration der Proben zu bestimmen, wurde ein UV/Vis Spektrum aufgenommen. In Abbildung 3.6 ist ein Absorptionsspektrum von *HtrII84-230* dargestellt. Das Spektrum enthält eine starke Absorption bei 211 nm und ein breites Maximum zwischen 258 nm bis 280. Das breite Maximum bei etwa 260-280 nm entspricht der Absorption von aromatischen Aminosäuren entspricht von fünf Phenylalanine (3,2%) und ein Tyrosin (0,6%) für *NpHtrII84-230-His*.

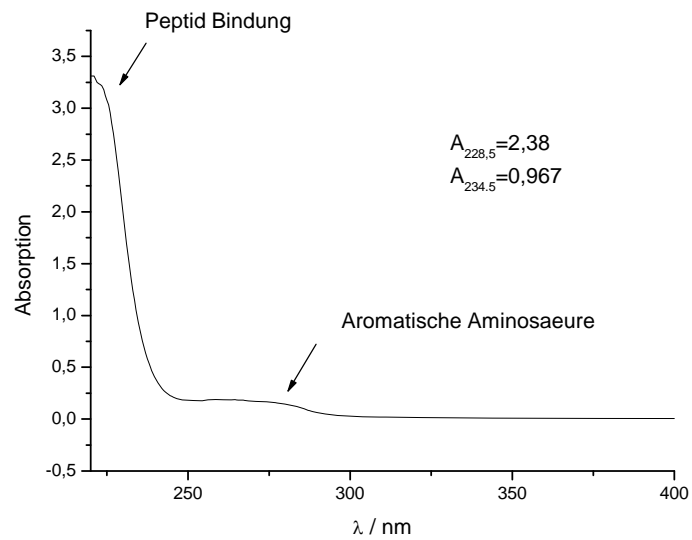


Abb. 3.6 UV-Vis Absorptionsspektrum der HtrII-Konstrukte am Beispiel des *NpHtrII84-230-His*.

Die Konzentration von HtrII wurde nach folgender Formel berechnet (Ehresmann *et al.*, 1973).

$$c_{NpHtrII} = \frac{(E_{228,5} - E_{234,5}) \times 10}{3,14} [\text{mg} / \text{ml}]$$

Die Ausbeute des aufgereinigten Proteins *NpHtrII84-230-His*, *NpHtrII84-136-His* und *NpHtrII137-230-His* betrug jeweils durchschnittlich 6 mg/L, 3,5 mg/L und 4 mg/L Zellkultur.

Table 3.2: Ausbaute der *NpHtrII* Konstrukte

Konstrukte	<i>NpHtrII84-230-His</i>	<i>NpHtrII84-136-His</i>	<i>NpHtrII137-230-His</i>
Ausbeute	6 mg/L	3,5 mg/L	4 mg/L

3.1.2 Gelfiltrationsanalysen der HAMP Domänen

Um die oligomeren Formen des Proteins abzutrennen, sowie das Protein aufzureinigen, wurde eine Größenausschluss-Chromatographie mit einer Superdex 75 10/300 GL Säule, wie in Abschnitt 2.6.4 beschrieben, durchgeführt. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min. In der Abbildung 3.7 ist das Chromatogramm der präoperativen Gelfiltration (HiLoad 16/600 Superdex 75 pg) dargestellt. Der rote Graph repräsentiert die Absorption bei 210 nm und der blaue bei 280 nm. Es sind deutlich zwei Peaks bei Betrachtung des roten Chromatogramms zu erkennen, es kann jedoch keine Absorption bei 280nm beobachtet werden, da das Protein *NpHtrII137-230-His* keine Phenylalanine und Tyrosin enthält, die eine Absorption bei 280 nm zeigen. Die zwei Peaks wurden separat (Fraktionen 23-25 und Fraktionen 33-39) gesammelt und einer analytische Gelfiltration unterzogen. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abbildung 3.8A und B dargestellt.

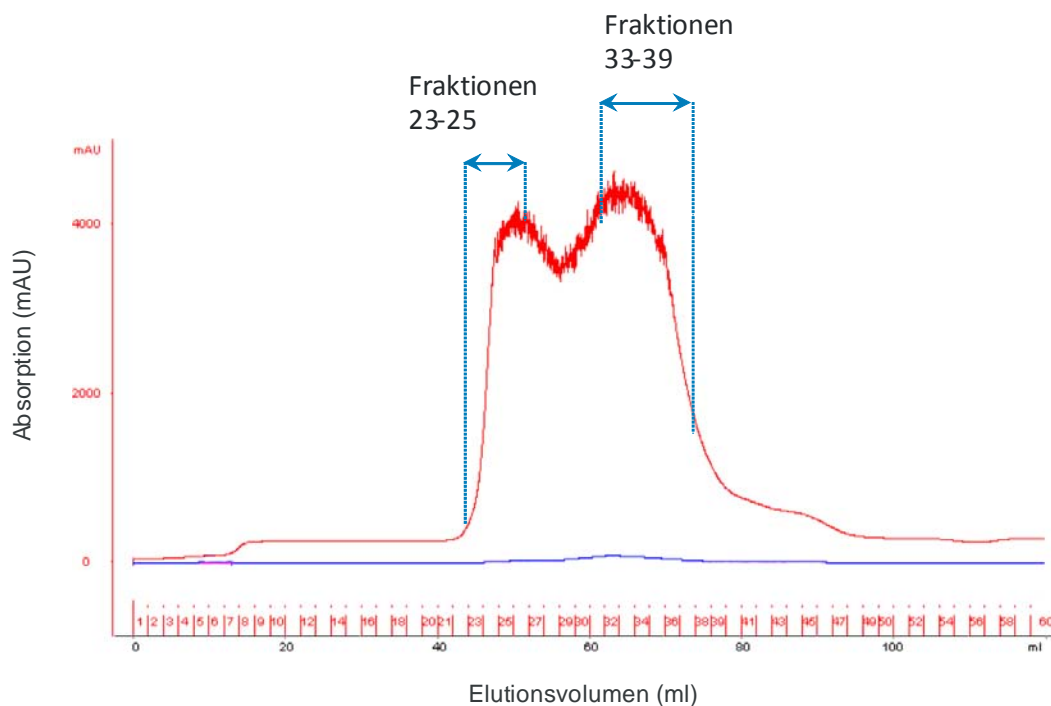


Abb. 3.7 Chromatogramm der *NpHtrII136-230-His* Aufreinigung über eine präoperative Gelfiltrationssäule. Der rote Graph repräsentiert die Absorption bei 210 nm und der blaue bei 280 nm. Die gesammelten Fraktionen sind durch eine Nummerierung der senkrechten Striche angedeutet.

Die Chromatogramme der beiden gesammelten Proben (Abb. 3.8A und B) zeigen deutlich zwei Peaks mit Retentionszeiten von 17,5 min und 22,4 min. Mit Hilfe der durch den Proteinstandard erhaltenen Eichgerade lässt sich die Größe des Proteins bei 17,5 min mit 34

kDa und bei 22,4 min mit 17 kDa berechnen. Das theoretische Molgewicht des Konstrukts beträgt 11,8 kDa.

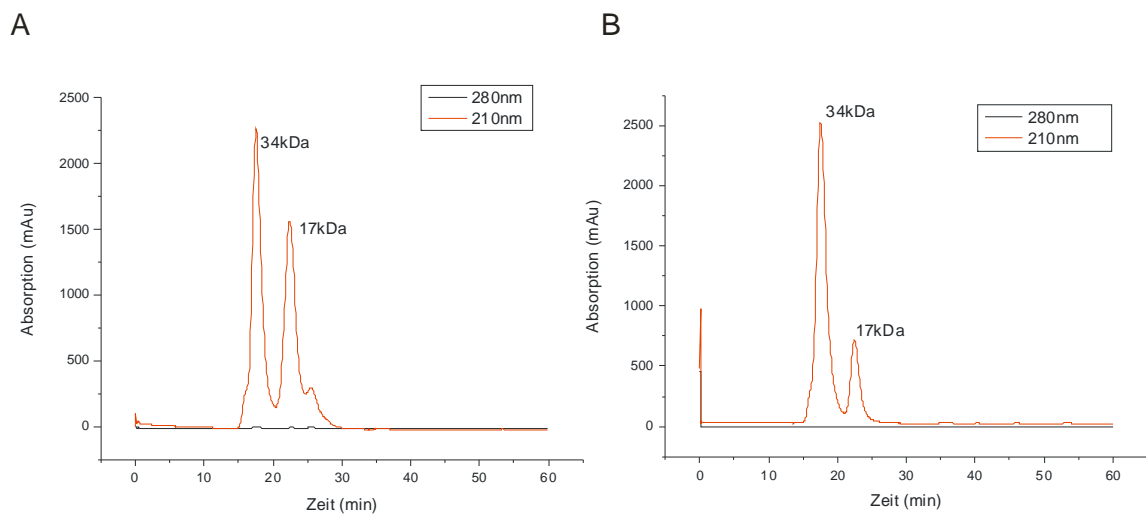


Abb. 3.8 A. Chromatogramm der analytischen Gelfiltration der gesammelten Fraktionen 33-39 von HtrII136-230-His. B. Chromatogramm der analytischen Gelfiltration der gesammelten Fraktionen 23-25 von HtrII136-230-His.

Um die Form der Proteine zu berücksichtigen kann bei Gelfiltrationsanalysen der Stokes Radius (Hydrodynamischer Radius) anstelle des Molekulargewichtes als beschreibende Größe verwendet werden. Dieser beschreibt den Radius einer festen Kugel, die dieselben Diffusionseigenschaften besitzt wie das dazugehörige Molekül. Meistens ist der Stokes Radius geringer als der effektive Radius des Moleküls, da diese überwiegend keine perfekten Kugeln bilden. Im Falle des *Np*HtrII Moleküls und möglicher Multimere, sind stäbchenförmige Strukturen durch die hohe Homologie zu den Chemorezeptoren zu erwarten, so dass die aus den Retentionszeiten gewonnenen Molekulargewichte nicht notwendigerweise mit den wirklichen Massen (MW [*Np*HtrII136-230-His-Monomer]: 11,8 kDa) korreliert werden können (Brownleader et al., 1996; Marshall et al., 2005). Außerdem ist ein ausgedehntes Volumen eine typische Eigenschaft teilgefaltete Intermediate (Molten Globule) eines Proteins zu charakterisieren (Fink, 2001). Die Fraktion bei einem Molekulargewicht von 17 kDa könnte dem HAMP2 Monomer und bei 34 kDa dem Dimer zugeordnet werden. Es muss ein Gleichgewicht zwischen Dimer und Monomer bestehen, wurde in weiteren Experimenten die Zeitabhängigkeit der Dimerisierung untersucht.

Abbildung 3.9 zeigen die Gelfiltrationschromatogramm der gesammelten Fraktionen 33-39 nach Inkubation bei 4°C zwei Stunden (rote Linien), 24 Stunden (schwarze Linien) und 48 Stunden (grüne Linien). Mit der Zeit nimmt der Dimer Peak zu und der Monomer Peak ab.

Nach 48 Stunden konnte ein Anstieg des Dimeranteils beobachtet werden. Die Tendenz der Dimerisierung der HtrII HAMP Domäne ist deutlich (Abbildung 3.9B).

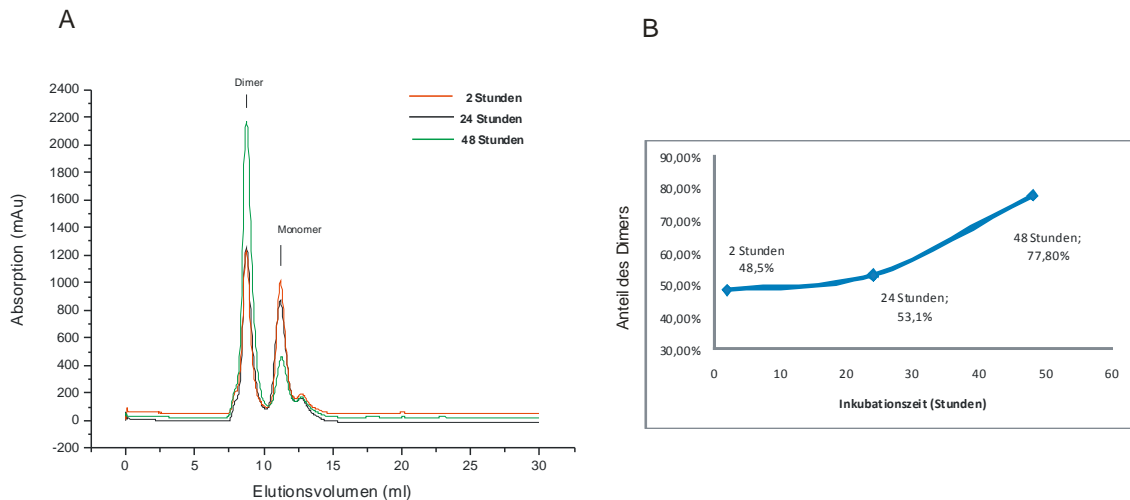


Abb. 3.9 Zeit-Abhängigkeit der Dimerisierung des Proteins *NpHtrII136-230-His*.

- A. Chromatogramme der analytischen Gelfiltration der gesammelten Fraktionen 33-39 von *NpHtrII 136-230-His* bei 4°C nach Inkubationszeit 2 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden.
- B. Anteil des Dimers nach Zeit.

3.1.3 Untersuchungen zur Struktur mittels CD-Spektroskopie

Um Informationen über die Sekundärstruktur und die Sekundärstrukturänderung der HAMP Domäne zu erhalten, wurden in dieser Arbeit verschiedene CD-Messungen an den Transducern *NpHtrII84-136-His*, *NpHtrII137-230-His* und *NpHtrII84-230-His* durchgeführt. Die Konzentration der Transducer betrug bei allen Messungen 0,1 mg/ml. Die Spektren wurden im Wellenlängen-Bereich von 250 nm bis 195 nm, in Abhängigkeit von Salzkonzentration, pH-Wert, Temperatur, Detergenzkonzentration und TFE Konzentration aufgenommen.

3.1.3.1 Strukturelle Charakterisierung von HAMP1 (*NpHtrII84-136-His*) durch CD-Spektroskopie

Einfluss der Salzkonzentration auf HAMP1

Die CD-Messungen in Abhängigkeit der Salzkonzentration auf HAMP 1 wurden bei 20°C, pH 8 durchgeführt. Zur Einstellung der Ionenstärke wurde das Salz NaF statt NaCl verwendet, da NaCl eine Absorption im UV-Bereich aufweist. Die CD-Spektren von HtrII84-136-His bei 0,0 M, 0,1 M, 0,5 M, 1 M, 2 M NaF Konzentration sind in Abbildung 3.10 gezeigt. Unabhängig von der Salzkonzentration zeigen die CD-Spektren der HAMP1 Domäne ein deutliches Minimum bei etwa 200nm sowie ein Plateau um 220 nm. Dieser Verlauf ist nicht typisch für klassische Peptid-Konformationen wie α -Helix und β -Faltblatt. Er entspricht dem eines Zufallsknäuels mit wenigen α -helikalen Anteilen. Zur Berechnung der Sekundärstruktur liegen 27% - 30% α -helikaler Strukturanteil und 70%-73% Random-coil Strukturanteil bei allen Salzkonzentrationen vor.

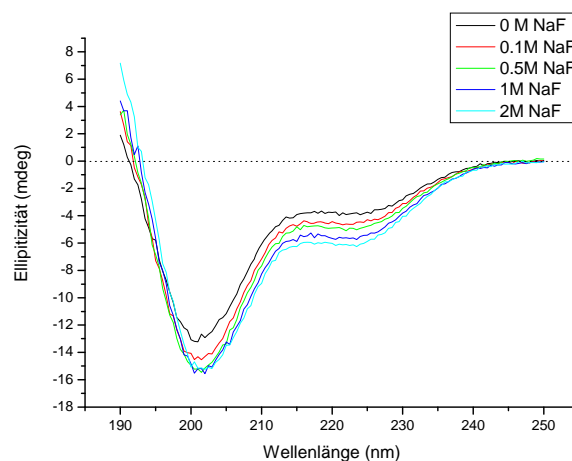


Abb. 3.10 CD-Spektren von 0,1 mg/ml *Np*HtrII84-136-His bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen. Als Puffersystem wurde 25 mM NaPi, pH 8 mit unterschiedlichen NaF Konzentrationen (NaF: 0M, 0,1M, 0,5M, 1M und 2M) verwendet.

Strukturelle pH-Abhängigkeit von HAMP 1

Zur Abdeckung des pH-Bereiches von 3 bis 8 wurden zwei Puffersubstanzen genutzt. Von pH 3 bis pH 5 wurde die Puffersubstanz MES ausgewählt, von pH 6 bis pH 8 NaPi. Die Messungen in Abhängigkeit von pH-Wert wurden bei 20°C durchgeführt. Abbildung 3.11 sind die gemessenen CD-Spektren bei pH 3 bis pH 8 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass ein etwas höherer α -helikaler Strukturanteil bei pH 3 und pH 4 vorliegt, je nach Algorithmus liegt dieser zwischen 55% und 50%. Die Auffaltung der α -Helix des Proteins zu einer zufällig geknäulten Konformation wird bei steigendem pH-Wert beobachtet. Der α -helikale Strukturanteil fällt bei pH 5 auf 30%, bei pH 6 auf 27%, bei pH 7 auf 28% und bei pH 8 nur noch 25%.

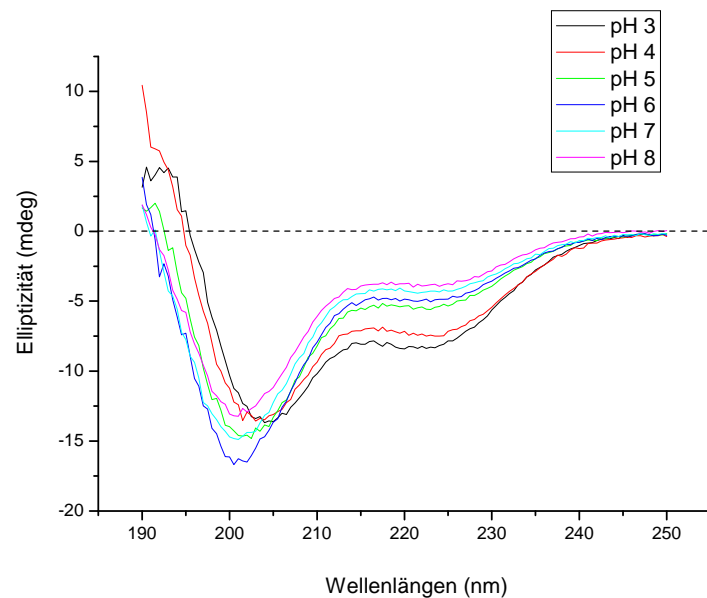


Abb. 3.11 CD-Spektren von 0,1 mg/ml *NpHtrII84-136-His* bei unterschiedlichen pH-Werten. Als Puffersystem wurde eine 25 mM NaP_i (pH 6-8) oder 50 mM MES (pH 3-5) verwendet.

Strukturelle Temperaturabhängigkeit von HAMP 1

Die CD-Spektren des Proteins *NpHtrII84-136 His* wurden bei 4°C, 10°C, 20°C und 30°C in 25 mM NaP_i Puffer bei pH 6 durchgeführt. Die Spektren bei allen Temperaturen zeigen einen Verlauf, der typisch für ein Zufallsknäuel ist. Die Sekundärstruktur der HAMP 1 ist unabhängig von der Temperatur. Zur Berechnung der Sekundärstruktur liegt 29% - 33% α -helikaler Strukturanteil bei allen Temperaturen vor.

Einfluss von Detergenz auf die Struktur von HAMP 1

Die CD-Spektren (Abbildung 3.12) beschreiben die Sekundärstruktur von *NpHtrII84-136-His* in Abhängigkeit der Detergenzkonzentration. Die Messung wurde in NaP_i Puffer 25mM, pH8 durchgeführt. Die beide Spektren (Protein in Detergenzfreien Puffer und in 1% DDM haltigen Puffer) weisen einen typischen Zufällsknäuelverlauf auf. Zur Berechnung der Sekundärstruktur liegen 28% α -helikaler Strukturanteil bei ohne DDM und 32% bei 1% DDM haltigen Puffer vor.

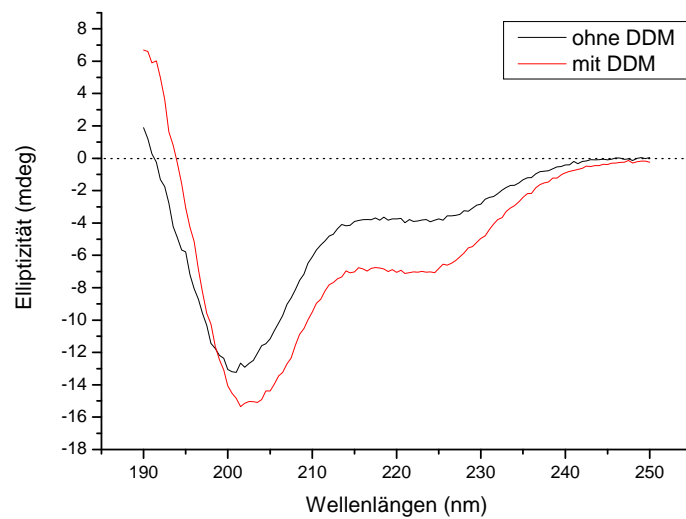


Abb. 3. 12 CD-Spektren von 0,1 mg/ml NpHtrII84-136-His sowohl in Detergenzfreien Puffer als auch in 1% DDM haltigen Puffer.

Einfluss von TFE auf die Struktur von HAMP 1

Zugabe von TFE kann die Bildung von α -Helikaler Konformationen in Peptiden induzieren (Sönnichsen et. al., 1992). Abbildung 3.13 zeigt die CD-Spektren für das Peptid HAMP1 bei verschiedenen TFE Konzentrationen. Die Spektren werden deutlich durch die Veränderung der TFE Konzentration beeinflusst. Die Spektrum bei 0% TFE haltigen Puffer zeigt einen Verlauf, der typisch für Zufallsknäuel ist: ein deutliches Minimum bei etwa 200nm sowie ein Plateau um 220nm. Die Form der Kurven bei steigender TFE Konzentration wird immer charakteristischer für eine α -helikale Sekundärstruktur: der minimale Absorptionspeak verschiebt sich von 197 zu 204 nm und die negative Elliptizität bei 220 nm steigt mit steigender TFE-Konzentration. Zur Berechnung liegen 38% α -helikaler Strukturanteil bei 0% TFE, 60%-94% α -helikaler Strukturanteil bei 10%-40% TFE haltigen Puffer vor. Das Ergebnis der CD-Messungen zeigt, dass durch TFE die Faltung zur α -Helix in HAMP 1 induziert werden kann. Mögliche Gründe für die beobachtete Stabilisierung der Sekundärstruktur ist die angenäherte Dielektrizitätskonstante des TFE zur Dielektrizitätskonstante des Innenraums von Proteinen. Unterschiede in der Acidität und Basizität im Lösungsmittel TFE und Wasser können auch die relative Stabilität der Wasserstoffbrücken ändern (Sönnichsen et al., 1992).

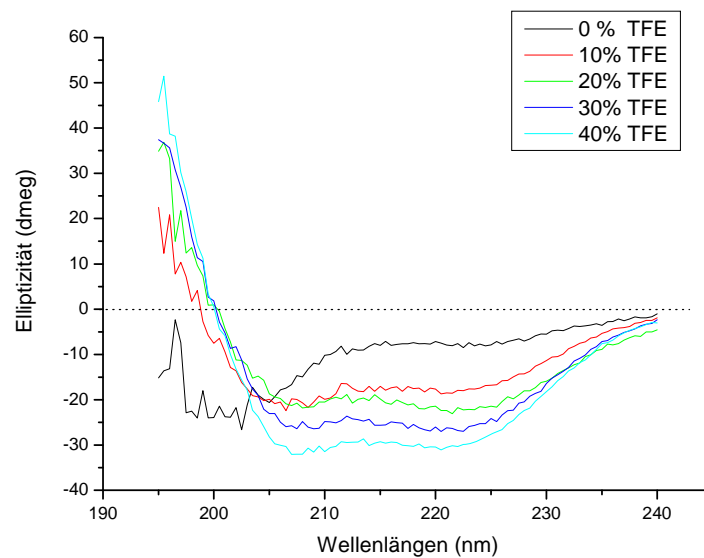


Abb. 3.13 CD-Spektren von 0,1 mg/ml *NpHtrII84-136-His* bei 4°C mit unterschiedlichen TFE-Konzentrationen. Als Puffersystem wurde 20 mM MES, pH 6 und 500 mM NaF mit unterschiedlichen TFE Konzentrationen (0%, 10%, 20%, 30% und 40%) verwendet.

3.1.3.2 Strukturelle Charakterisierung von HAMP2 (*NpHtrII137-230-His*) durch CD-Spektroskopie

Abbildung 3.14-3.15 präsentieren die CD-Spektren des Transdures *NpHtrII137-230-His* in Abhängigkeit von Salzkonzentration und von pH-Wert.

Einfluss der Salzkonzentration auf HAMP2

Abbildung 3.14 zeigt das CD-Spektrum der 2. HAMP Domäne *NpHtrII137-230* sowohl in salzfreien Puffer als auch in Anwesenheit von 0,5 M NaF. Es kann ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Salzkonzentration und der Sekundärstruktur festgestellt werden. In Abwesenheit von Salz zeigt das CD-Spektrum einen Verlauf, der typisch für ein Zufallsknäuel ist. Bei Zugabe von Salz nimmt der α -helikale Gehalt zu.

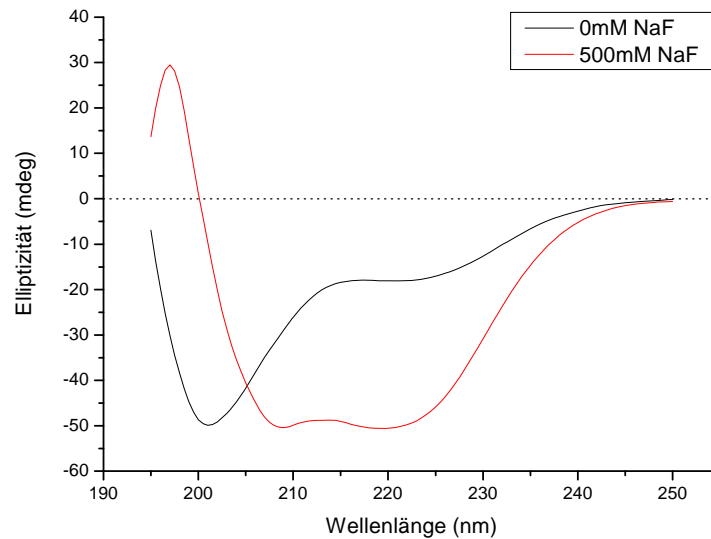


Abb. 3. 14 CD-Spektren von 0,1 mg/ml *NpHtrII137-230-His* bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen. Als Puffersystem wurde 20 mM NaP_i , pH 8 mit NaF Konzentrationen von 0 M und 0,5 M verwendet.

Strukturelle pH-Abhängigkeit von HAMP 2

In Abbildung 3.15 sind die gemessenen CD-Spektren bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Zur Abdeckung des pH-Bereiches von 3 bis 8 wurden zwei Puffersubstanzen genutzt. Von pH 3 bis pH 5 war die Puffersubstanz MES, von pH 6 bis pH 8 NaP_i . Im Bereich von 222 nm bis 208 nm sind deutlich zwei Minima zu erkennen. Danach steigt die Elliptizität in den positiven Bereich bis zu einem Maximum bei ca. 195 nm. Dieser Kurvenverlauf ist charakteristisch für α -Helizes. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein hoher α -helikaler Strukturanteil vorliegt. Je nach Algorithmus liegt diese zwischen 60% und 78%. Mit steigendem pH-Wert (> 5) steigt der Anteil an ungefalteter Struktur. Dieser liegt zwischen 15% (pH 3) und 20% (pH 8). Vermutliche Gründe dafür sind die Abstoßungskräfte zwischen den negativ geladenen Carboxylatgruppen von Glu und Asp, welche das Protein HoHtrII137-230 enthält.

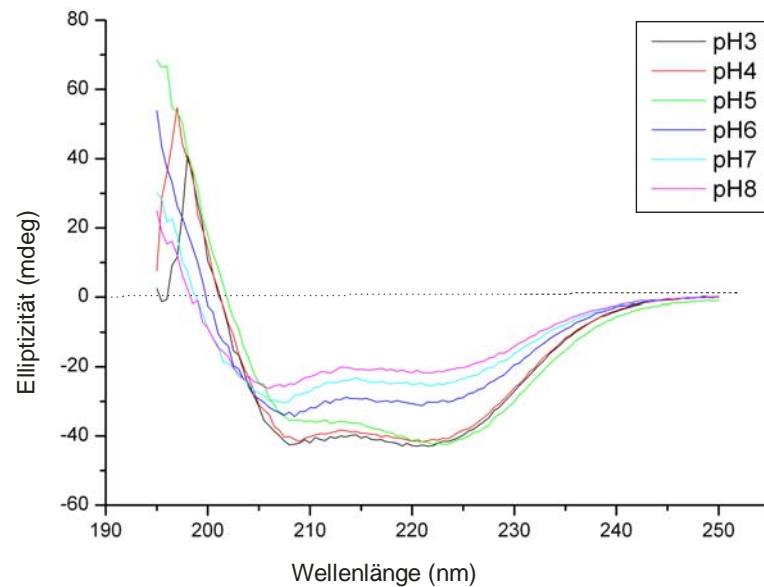


Abb. 3.15 CD-Spektren von 0,1 mg/ml *NpHtrII137-230-His* bei unterschiedlichen pH-Werten. Als Puffersystem wurde 25 mM NaP_i (pH 6-8) oder 50 mM MES (pH 3-5) verwendet.

3.1.3.3 Strukturelle Charakterisierung von HAMP1+2 (*NpHtrII84-230-His*) durch CD-Spektroskopie

In weiter Versuche wurde die Abhängigkeit der Struktur der beide HAMP-Domänen (HAMP1 und HAMP2) von äußer Bedingungen untersucht. Abbildung 3.16-3.20 präsentieren die CD-Spektren des Transdures *NpHtrII84-230-His* in Abhängigkeit von Salzkonzentration, pH-Wert, Temperatur und Detergenz.

Einfluss der Salzkonzentration auf HAMP1+2

Die CD-Spektren in Abhängigkeit der Salzkonzentration wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Messungen von HAMP1 (bei 20°C, pH 8) aufgenommen.

Die CD-Spektren von *HtrII84-230-His* bei Konzentration von 0 M, 0,1 M, 0,5 M, 1 M, 2 M NaF sind in Abbildung 3.16 gezeigt. In Gegenwart von Salz (0,1 M NaF bis 2 M NaF) zeigen die CD-Spektren ein Maximum bei kleiner Wellenlänge (192nm) und zwei Minima (207 nm und 222 nm) bei längeren Wellenlängen. Das Spektrum in Abwesenheit von Salz zeigt dagegen ein deutliches Minimum bei etwa 200 nm sowie ein Plateau um 220 nm. Dieser Verlauf ist nicht typisch für klassische Peptid-Konformationen wie α -Helix oder β -Faltblatt. Er entspricht eher

einem Zufallsknäuel (random coil) mit wenigen α -helikalen Anteilen. Die Sekundärstrukturvorhersagen aus den CD-Daten mittels dreier verschiedener Algorithmen (s. 2.7.1) zeigen einen α -Helikalen Gehalt von 38% bei 0 M NaF. Bei höherer Ionenstärke (0,1 M NaF bis 2 M NaF) nimmt der Anteil α -helikaler Strukturen des Proteins zu und es wird ein Gehalt von 79-97% kalkuliert. Dieses Ergebnis bedeutet, dass die Salzkonzentration eine α -helikale Struktur induzieren kann. Wird die Ionenstärke erhöht, so verstärken sich die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren und erhöhen zur Sekundärstrukturbildung.

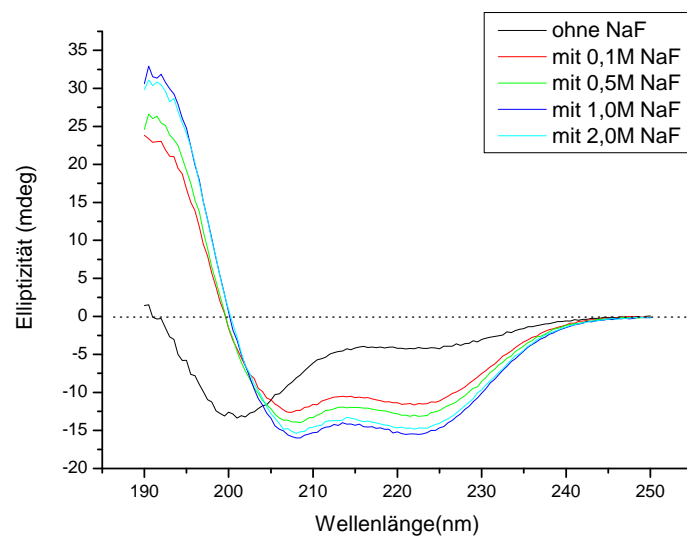


Abb. 3. 16 CD-Spektren von 0,1 mg/ml *NpHtrII84-230-His* bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen. Als Puffersystem wurde 25 mM NaPi, pH 8 mit unterschiedlichen NaF Konzentrationen (NaF: 0,1M, 0,5M, 1M und 2M) verwendet.

pH-Abhängigkeit der Struktur von HAMP 1+2

Die Messungen in Abhängigkeit vom pH-Wert wurden bei 20°C durchgeführt. In Abbildung 3.17 sind die gemessenen CD-Spektren bei pH 3 bis pH 8 dargestellt. Zur Abdeckung des pH-Bereiches von 3 bis 8 wurden zwei Puffersubstanzen genutzt. Von pH 3 bis pH 5 wurde die Puffersubstanz MES ausgewählt, von pH 6 bis pH 8 NaPi. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein hoher α -helikaler Strukturanteil bei pH 3 und pH 4 vorliegt, je nach Algorithmus liegt dieser zwischen 90% und 95%. Die Auffaltung der α -Helix des Proteins zu einer zufällig geknäulten Konformation wird bei steigendem pH-Wert beobachtet. Berechnet werden 80% α -helikaler Strukturanteil bei pH 5, 60% bei pH 6, 30% bei pH 7 und 27% bei pH 8.

Der berechnete pI-Wert von *NpHtrII84-230-His* liegt bei 4,4. Für spätere ssNMR Untersuchungen wurde das beim pI-Wert ausgefallene Protein verwendet. Das Ergebnis der

CD-Messungen zeigt, dass das Protein bei pH-Werten um den pI eine stabile α -helikale Sekundärstruktur aufweist.

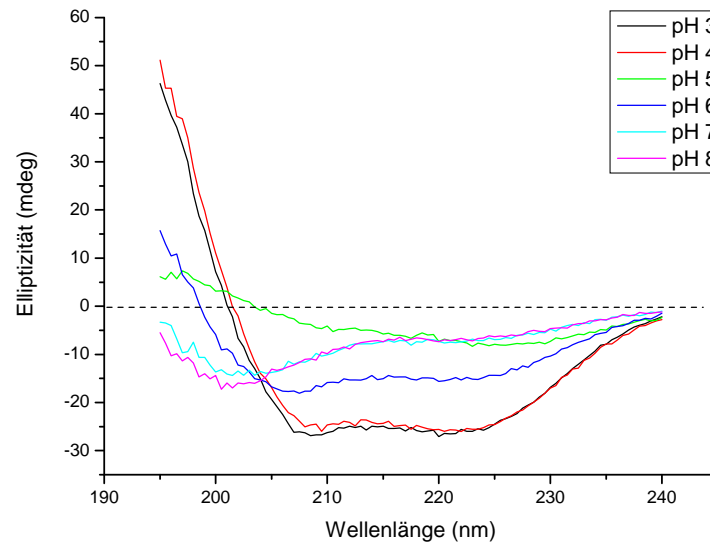


Abb. 3.17 CD-Spektren von 0,1 mg/ml *NpHtrII84-230-His* bei unterschiedlichen pH-Werten. Als Puffersystem wurde 25 mM NaP_i (pH 6-8) oder 50 mM MES (pH 3-5) verwendet.

Strukturelle Temperaturabhängigkeit von HAMP 1+2

Die CD-Spektrum in Abhängigkeit der Temperatur wurde bei pH-Werten von pH 3 bis pH 8 gemessen. Das Konstrukt weist eine deutliche Temperaturabhängigkeit bei pH 6 und pH 7 auf. Bei anderen pH-Werten zeigen die CD-Messungen zur Temperaturabhängigkeit der Sekundärstruktur des Konstrukts keine signifikanten Effekte (Abbildung nicht gezeigt). Die Abbildung 3.18 zeigt CD-Spektren des Protein *NpHtrII84-230-His* bei 4°C, 10°C, 20°C und 30°C in 25 mM NaP_i Puffer bei pH 6. Die Spektren zeigen, dass das Protein bei niedrigen Temperaturen einen höheren α -helikalen Strukturanteil enthält.

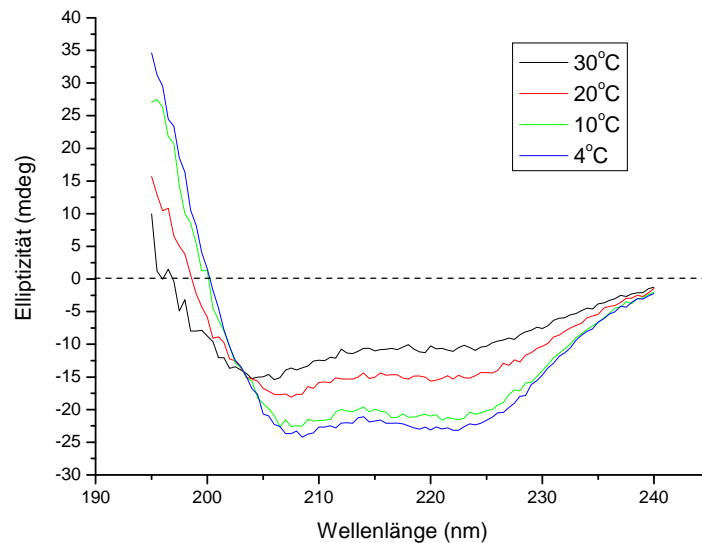


Abb. 3.18 CD-Spektren von 0,1 mg/ml *NpHtrII84-230-His* bei unterschiedlichen Temperaturen. Als Puffersystem wurde 25 mM NaPi, pH 6 verwendet.

In Abbildung 3.19 ist die thermische Denaturierung von 0,1 mg/ml *NpHtrII84-230-His* bei dem pH-Wert 6, 25mM NaPi und 0,0M NaCl dargestellt. Gemessen wurde die Elliptizitäten bei 222 nm, da α -helikale Strukturen bei dieser Wellenlänge ein Minimum aufweisen. Anhand des Kurvenverlaufes kann die Veränderung der Sekundärstruktur in Abhängigkeit der Temperatur verfolgt werden. Bei niedriger Temperatur werden geringe Elliptizitäten gemessen. Mit steigender Temperatur steigt auch die Elliptizität. Der Kurvenanstieg kann mit einem Verlust der helikalen Strukturanteile erklärt werden. Ab ca. 47°C ist kein weiterer Anstieg der Elliptizität zu beobachten und die helikalen Strukturen sind weitestgehend denaturiert.

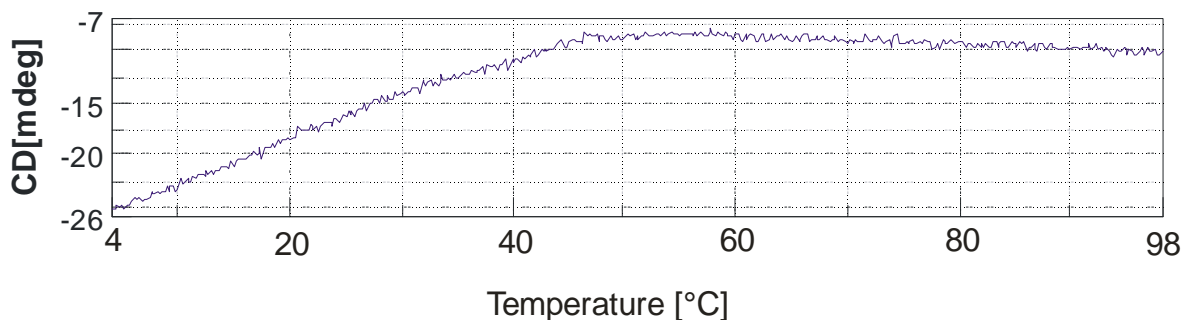


Abb. 3.19 Thermische Denaturierung von 0,1 mg/ml *NpHtrII84-230-His* bei 222nm. Als Puffersystem wurde 25 mM NaPi, pH 6 verwendet.

Einfluss von Detergenz auf die Struktur von HAMP 1+2

Die CD-Spektren (Abbildung 3.20) beschreiben die Sekundärstruktur von *NpHtrII84-230-His* in Abhängigkeit von der Detergenzkonzentration. Die Messung wurde in NaP_i Puffer 25mM, pH8 durchgeführt. Das schwarze Spektrum (Protein in Detergenz-freien Puffer) weist hauptsächlich eine typische zufällig geknäulte Struktur auf, welche durch ein Minimum bei 195 nm charakterisiert ist. Das rote Spektrum (Protein in 1% DDM Puffer) weist typische Merkmale für eine α -helikale Struktur auf. Zur Berechnung der α -helikale Strukturanteil des Protein *NpHtrII84-230-His* liegen bei 79% in 1% DDM haltigen Puffer und bei 38% in Detergenz-freien Puffer vor. Das Ergebnis zeigt, dass die Anwesenheit von Detergenz die Ausbildung von α -helikalen Strukturen fördern kann.

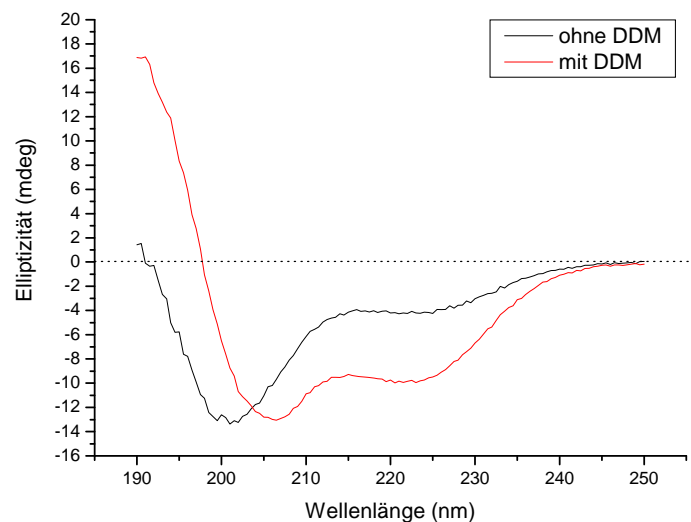


Abb. 3.20 CD-Spektren von 0,1 mg/ml *NpHtrII84-230-His* sowohl in Detergenzfreien Puffer als auch in 1% DDM haltigen Puffer.

3.1.3.4 Vergleich der verschiedenen *NpHtrII*-HAMP Domänen

Abbildung 3.21 zeigt die CD-Spektren für die verschiedene *NpHtrII*-HAMP Domäne *NpHtrII84-136-His* (HAMP1), *NpHtrII137-230-His* (HAMP2) und *NpHtrII84-230-His* (HAMP1+2) bei pH 8. Als Puffersystem wurde 25 mM NaP_i mit 0,5 M NaF verwendet. Unter diese Bedingungen zeigt das CD-Spektrum der HAMP1 ein deutliches Minimum bei etwa 200 nm sowie ein Plateau um 220 nm. Dieser Verlauf entspricht dem eines Zufallsknäuels mit weniger α -helikale Strukturanteilen (27%). Die Spektren von HAMP2 und HAMP1+2 ähnelt dem typischen Spektrum von einer α -Helix mit einem Maximum im kurzwelligen UV-Bereich bei 192 nm und zwei Minima im langwelligen UV-Bereich bei 207 nm bzw bei 222 nm. Je nach Berechnung liegen 78% und 80% α -helikaler Strukturanteil vor.

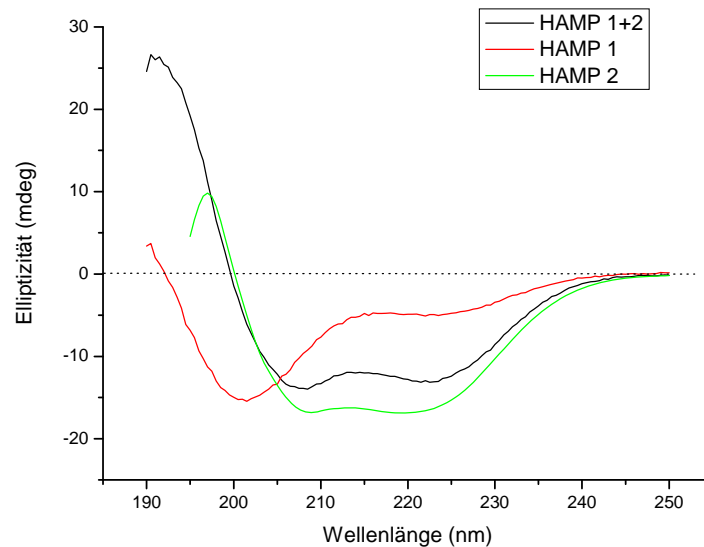


Abb. 3.21 CD-Spektren von 0,1 mg/ml *NpHtrII84-230*-His, *NpHtrII84-136*-His und *NpHtrII137-230*-His bei pH 8. Als Puffersystem wurde 25 mM NaP_i mit 0,5 M NaF verwendet.

Domänen	HAMP1	HAMP2	HAMP 1+2
α -helikaler Strukturanteil	27%	78%	80%

Table 3.3: Vergleich des α -helikaler Strukturanteils der verschiedenen HAMP Domänen bei RT, pH8 und 0,5M NaF.

3.1.4 ANS-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie

8-Anilino-1-naphthalenesulfonsäure (ANS) ist ein amphiphiler, fluoreszierender Farbstoff und kann als Indikator mit hydrophobe Bereiche von Protein wechselwirkt. Eine häufige Anwendung von ANS Fluorezenzmessungen ist es, partiell gefaltete Internmediate („Molten-Globule“) nachzuweisen. Das Molten-Globule-Intermediat ist ein hoch dynamischer Zustand mit ähnlicher Sekundärstruktur wie nativen Zustand. Im Vergleich zum nativen Zustand (gefaltet) fehlt Molten-Globule-Intermediat dicht-Packung und hat es ein exponierte hydrophobe Oberflächen, was zu der Fähigkeit hydrophobe Farbstoff wie ANS zu binden, führt. Das Emissions-Spektrum des ANS in Wasser zeigt ein begrenztes Fluoreszenz-Emissionsspektrum mit Maximum bei 533 nm (Abbildung 3.22 ANS). Wenn das ANS an hydrophobe Oberflächen bindet, kann ein Anstieg der Fluoreszenz und eine Blauverschiebung der maximalen Emission des Emissions-Spektrum des ANS beobachtet werden.

Abbildung 3.22 zeigt die Fluoreszenz-Emissionsspektren für den ANS-*NpHtrII*84-230-Komplex bei niedrigem pH-Wert (pH 3), hoher Salzkonzentration (2 M Salz, pH 8) und in Gegenwart von 8 M Harnstoff (Harnstoff). Der deutliche Anstieg der Fluoreszenz-Intensität und eine Blauverschiebung der maximalen Emission werden bei niedrigem pH-Wert und hoher Salzkonzentration deutlich. Es kann so gezeigt werden, dass die HAMP Domänen von *NpHtrII* bei niedrigen pH-Wert und hohen Salzkonzentrationen eine Molten-Globule Konformation aufweist.

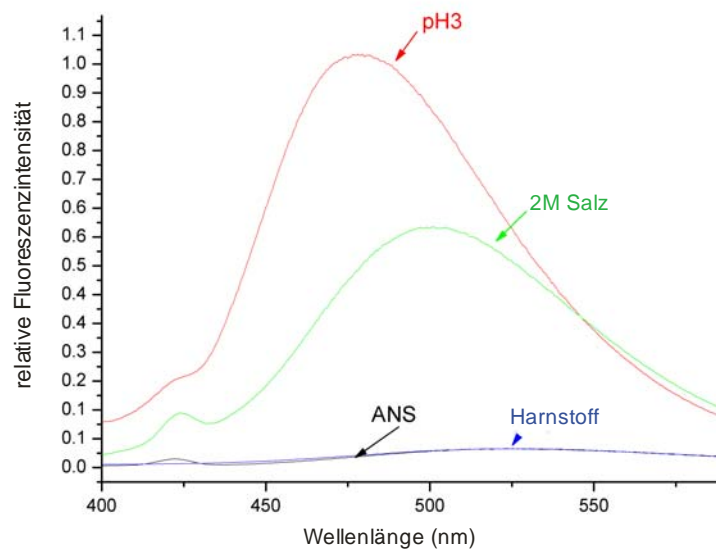


Abb. 3.22 Fluoreszenzemissionsspektren der 2 μ M ANS Lösung in 25 mM NaPi bei pH 8 (ANS), ANS-*NpHtrII*84-230-Komplex bei niedrigem pH-Wert (pH 3), hohe Salzkonzentration (2M Salz, pH 8) und in Gegenwart von 8 M Harnstoff (Harnstoff).

3.1.5 NMR Spektroskopie der HAMP Domänen

Zum Verständnis der Mechanismen der phototaktischen Signaltransduktion sind strukturelle Daten über den Rezeptor/Transducer Komplex notwendig. Röntgenkristallographie hat strukturelle Einblick in den *NpSRII/NpHtrII* Komplex 1-114 (Gordeliy et al., 2002) und *NpSRII/NpHtrII*1-157 (Moukhametzianov et al., 2006) ermöglicht. Allerdings sind alle verfügbaren Röntgen-Strukturen über HtrII auf die Membran-Helizes beschränkt, da die Elektronendichte nur bis Aminosäure 82 in *NpHtrII* beobachtet werden konnten. In diese Arbeit wurde 2D ssNMR in Kombination mit „Reverse Labelling“ (Kapitel 2.5.1.4) genutzt, um die Veränderungen in der Proteinstruktur und Proteindynamik zu verfolgen.

Die ssNMR Spektroskopieuntersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Marc Baldus (MPI für biophysikalische Chemie Göttingen, jetzt Universität Utrecht) durchgeführt.

3.1.5.1 NpHtrII84-136 (HAMP 1)

Hochauflösende, strukturelle Informationen der HAMP Domäne sind nur begrenzt verfügbar, zB. die von *Af1503* aus einem thermophilen Archaeobakterium (Hulko et al., 2006). Wenn man die Reste 84-210 in *NpHtrII* mit der HAMP Domäne von *Af1503* vergleicht, dann weisen die konservierten Aminosäuren (rot) und die konservierten hydrophoben Segmente (grau unterlegt) auf eine strukturelle Homologie zwischen den drei HAMP Domänen hin (Abb. 3.23).

		-----AS1-----	-----AS 2-----
NpHtrII-1	86	TAASLSTLAAKASRMGDDLDVLET-RREDEIGDLYAAFDEMROSV131	
NpHtrII-2	159	LQAEAERFGEVMDRCADGDFTRQLDAETDNEAMQSI EGSFNEMMDGI204	
Af1503	281	ITRPI I ELSNTADKI AEGNLEAEVPHQNRADDEIGI LAKS I ERLRRSL218	
repeat		defgabcdefgabcd	fgabcdefgabcdefga

Abb. 3.23 Sequenzalignment der HAMP Domänen aus *Natronomnas pharaonis* (Np) und *Archaeoglobus fulgidus* (Af) (ClustalW2, Larkin et al., 2007), Rot: identische AS. Grau unterlegt: konservierte hydrophobe AS.

Um die strukturelle Rolle der HAMP Domäne für die Komplexbildung zu untersuchen, wurde die HAMP Domäne Isotopen-markiert exprimiert (Kapitel 2.5.1.3). Das entsprechende HSQC-Spektrum wurde bei pH 6 aufgenommen, als Puffer wurden 500 mM NaCl, 20 mM MES verwendet (Abb. 3.24). Im Unterschied zu dem Protein *Af1503* zeigt das Spektrum der HAMP Domäne 1 von *Natronomnas pharaonis* hauptsächlich die Struktur eines Zufallsknäuels mit limitierter spektraler Dispersion. Das Ergebnis ist in Einklang mit den Aussagen der CD-Untersuchung.

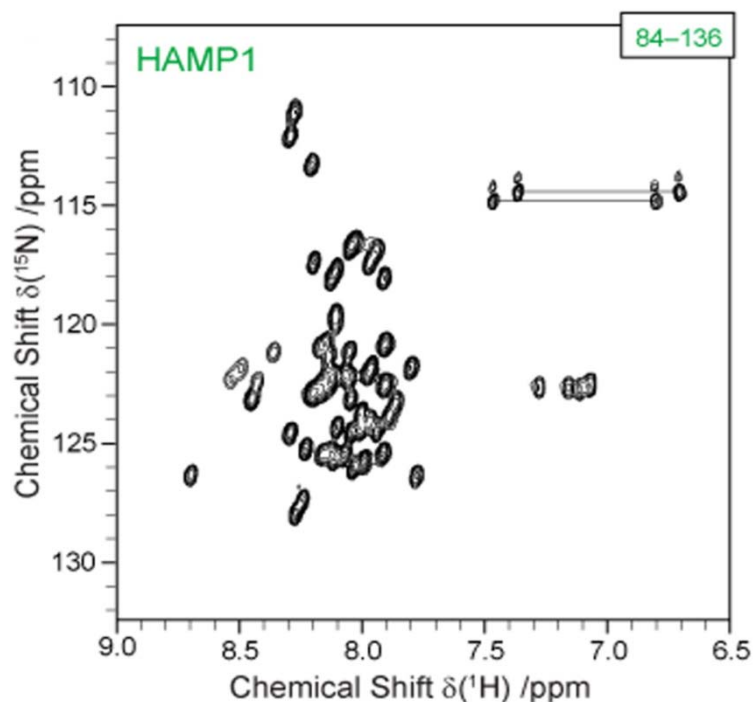


Abb. 3.24 $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -2D-HSQC-Spektrum von *NpHtrII84-136*-His (HAMP1) bei pH 6, RT.

Das Protein *NpHtrII84-136-His* fällt bei Zugabe der Präzipitatslösung (NaAcetate 0.1M pH:4.6, 2-Methyl-2, 4 Pentanediol 15%, CaCl₂ 0,02M) aus. Die ssNMR Spektrum-Korrelation des gefällten Proteins wird in Abbildung 3.25 A (graue Muster) gezeigt. Die grünen Punkte sind die vorhergesagte Korrelation mittels SHIFTX aus dem Strukturmodell in Abbildung 3.25B. Dieser Annahme liegt die 3D-Struktur der HAMP Domäne von *Af1503* zugrunde, die eine Homologie zu HAMP1 aufweist. Tatsächlich sind viele Messkorrelationen konsistent mit der vorhergesagten Ein-Band Korrelation. Aber die zusätzlichen Korrelationen geben Hinweise auf die Existenz von nicht-helikalen Ala Positionen, die nicht im *Af1503*-Homologie-Modell erwartet wurden, während die erwartenden Korrelationen für Ile117 fehlen. Beide Befunde könnten durch eine erhöhte Störung des N-Terminus in beiden Helizes um Ala87, Ala88, Ile117 und anderen terminalen Resten erklärt werden.

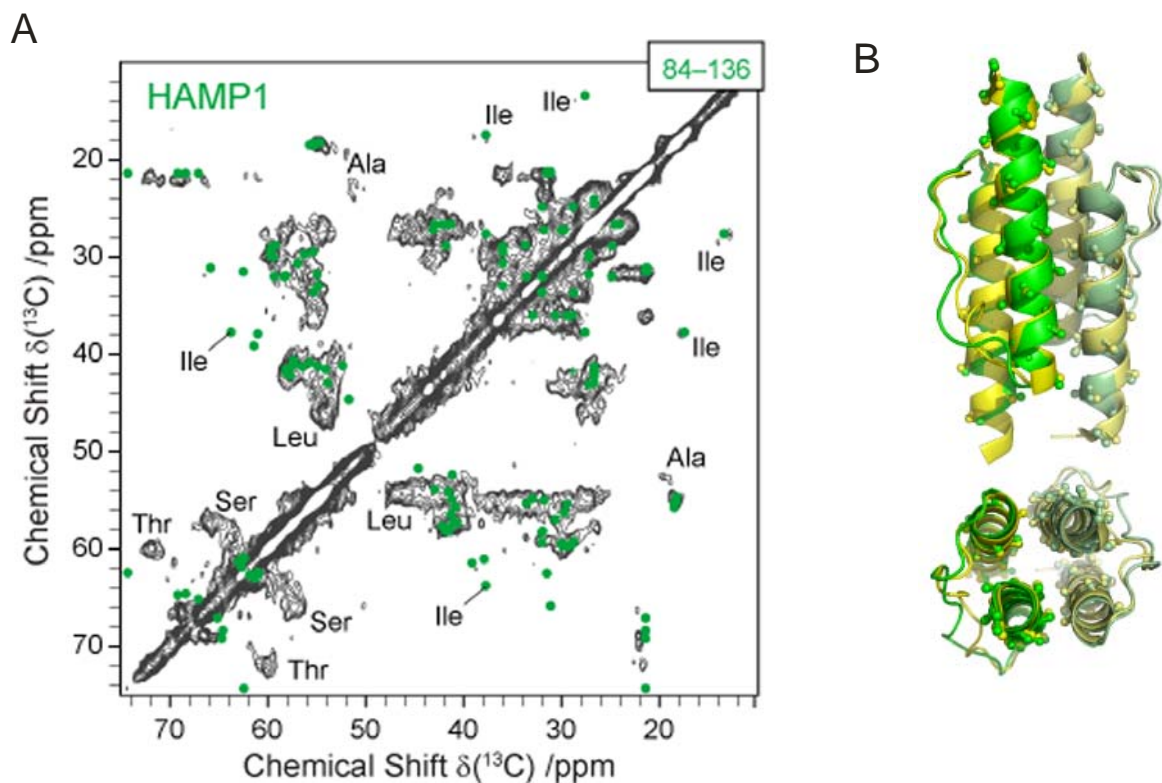


Abb. 3.25 **A:** Vergleich von vorhergesagten Korrelation (mittel SHIFTX, Neal et al. 2003) aus dem Homologie-HAMP1-Modell (grün) zur ssNMR Spektren-Korrelation, die von der ausgefallenen HAMP1 Proben erhalten wurden. **B:** Seitenansicht und Draufsicht auf das Strukturmodell für HAMP1 (grün) basierend auf der Homologie mit *Af1503* (gelb, PDB Eintrag 2ASW).

3.1.5.2 *NpHtrII84-230-His* (HAMP1+2)

Die Sequenzalignments und bioinformatischen Vorhersagen weisen darauf hin, dass die zwei HAMP Domänen eine sekundäre Struktur mit einer vorwiegend helikale Struktur zeigen, die

durch Loops verbunden sind. Basierend auf der Homologie zu Af1503 wurden vier unterschiedliche Modelle der HAMP1+2 von Karsten Seidel (AG Baldus, Göttingen) berechnet (Anhang 7.2). Nach der Methode, die in Kapitel 2.5.6 beschrieben wurde, konnte *NpHtrII84-230-His* gefällt werden. Die (^{13}C , ^{13}C)-ssNMR Messdaten des gefällten Proteins werden in Abbildung 3.27A gezeigt. Die schwarzen Kreuze in Abbildung 3.26A sind die vorhergesagten Korrelationen aus dem Modell in Abbildung 3.26B. Das ssNMR Korrelation Spektrum zeigt deutliche α -helikale Resonanzmuster und gute Übereinstimmungen zu den vorhergesagten Korrelationen des Modells. Die nicht übereinstimmenden Korrelationen weisen auf die Existenz von nicht-helikalen Lysin Positionen hin. Wegen eines schlechten Signal zu Rausch Verhältnisses waren weitergehende Analysen nicht möglich.

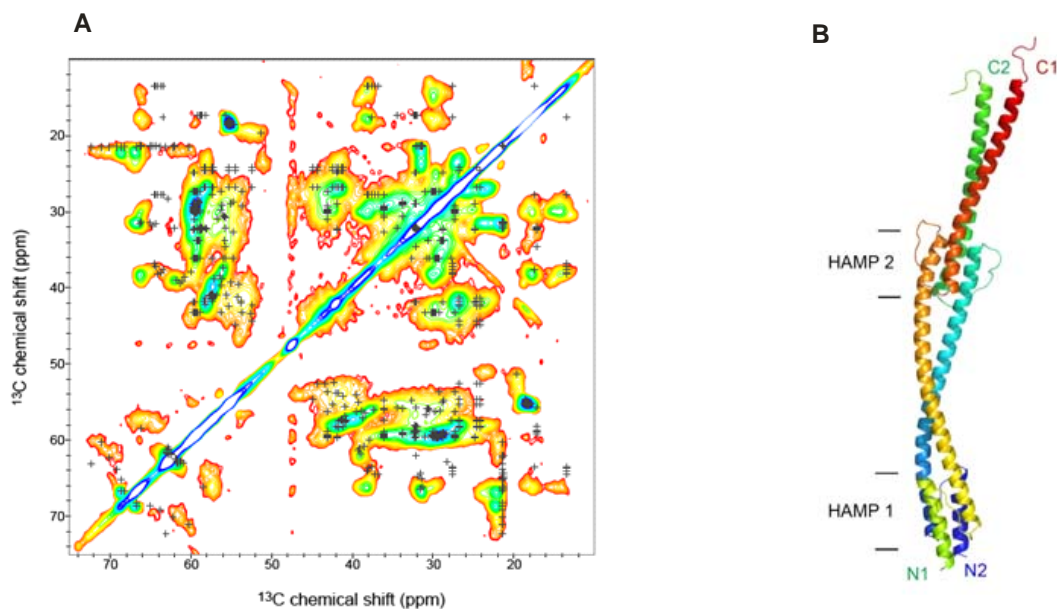


Abb. 3.26 A) Vergleich des ^{13}C - ^{13}C ssNMR-Korrelationspektrum des *NpHtrII84-230-His* mit dem vorhergesagten Ein-Band Korrelationsspektrum (schwarzen Kreuze) des Modells. B) Seitenansicht auf das Strukturmodell für HAMP1+2, welches die Helixstruktur mit Ausnahmen von HAMP-Loops und C-Terminalen Aminosäuren zeigt (von Karsten Seidel).

3.1.5.3 *NpHtrII1-157-His*

Die ssNMR Ergebnisse von HAMP Domäne und SRII/HtrII Komplex (Etzkorn et al. 2010) deuteten eine signifikante Erweiterung der Bindungsfläche von SRII mit dem Transducer HtrII an. Dieses Ergebnis weist auf eine strukturelle Homologie der HAMP1 mit der HAMP Domäne von Af1503. Auf Grund dieser Vergleichbarkeit wurde ein Modell des *NpSRII/NpHtrII157* Komplexes konstruiert, welches auf der Kristallstruktur in Kombination mit der modellierten HAMP Domäne in Homologie zu Af1503 basiert (Abbildung 3.27B). Die

Verbindung des transmembranen Teils und der HAMP Domäne in HtrII, so wie die Linkerregion C-Terminal der HAMP 1 wurden als α -Helikale Konformationen modelliert.

Für die ssNMR Experimente wurden ein in die Membran eingelagerter Komplex U-[^{13}C , ^{15}N \{I, L, V, R, F\}] *Np*HtrII1-157-His/*Np*SRII-His verwendet. Der Transducer *Np*HtrII1-157-His ist einheitlich ^{13}C , ^{15}N markiert mit der Ausnahme von I, L, V, R und F, die mit der natürliche Isotopenhäufigkeiten dem Expressionsmedium zugegeben wurden und der Rezeptor ist unmarkiert. Abbildung 3.27A zeigt den Vergleich der vorhergesagten Korrelationen aus dem Modell in Abbildung 3.27B mit dem (^{13}C , ^{13}C)-ssNMR Korrelationsspektrum des U-[^{13}C , ^{15}N \{I, L, V, R, F\}] *Np*HtrII1-157-His/*Np*SRII-His Komplexes. Die vorhergesagten Korrelationen am N-terminalen Ende zwischen Met3-Met22 von HtrII (Leere beige Kreise) werden mobil erwartet und zeigen daher keine Korrelationen im ssNMR Spektrum. Die Röntgenkristallographiedaten, die für G23-Leu82 gemessen wurden, stimmen gut mit den NMR Daten überein (blaue Punkte). Die vorhergesagten Korrelationen der Aminosäuren Gly84-Glu136 liegen in Übereinstimmung mit dem ssNMR Spektrum (grüne Punkte). Die einzigen Ausnahmen (Glu108 und Glu110 von HtrII) sind beide in der Loop Region lokalisiert und können flexibel oder ungeordnet vorliegen. Der Rest des Spektrums stimmt gut mit einer helikalen Faltung der Aminosäuren Asp137-Ser160 überein (graue Punkte). Die Analyse der chemischen Verschiebung untersucht hauptsächlich die Sekundärstruktur des Proteins. Aber die gute Übereinstimmung zwischen vorhergesagten und experimentellen Spektren von *Np*HtrII1-157 im Komplex zeigt, dass die Annahme einer strukturellen Homologie zu der HAMP Domäne aus *Af*1503 stichhaltig ist.

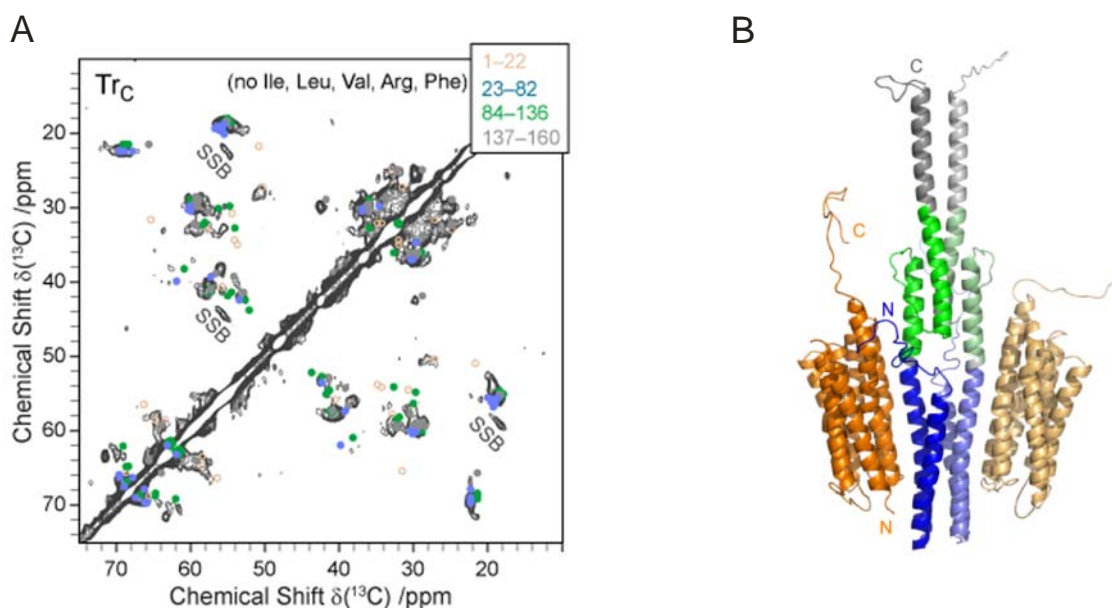


Abb. 3.27 A: Vergleich des ^{13}C - ^{13}C ssNMR-Korrelationsspektrum des U-[^{13}C , ^{15}N \{I, L, V, R, F\}] *Np*HtrII1-157-His/*Np*SRII-His Komplex in PML mit dem vorhergesagten Korrelationsspektrum welches auf dem Modell von *Np*HtrII1-157/*Np*SRII basiert. B: Modell von *Np*HtrII/*Np*SRII.

Orange: *NpSRII*; blau: *NpHtrII* 1-82; grün: HAMP 1 (*NpHtrII*84-136); grau: *NpHtrII*137-157 (von Manuel Etzkorn).

3.1.6 ESR-Untersuchungen zur Abhängigkeit der HAMP Domäne von der Salzkonzentration

Aus den Ergebnissen der CD-Untersuchungen (Kap. 3.1.3) wird eine Abhängigkeit der Struktur der HAMP Domäne von der Salzkonzentration gezeigt. Für die ESR-Untersuchung von salzinduzierten Konformationsänderungen an dem HtrII wurden folgende Cysteinmutanten hergestellt und mit dem MTS-Spinlabel (R1) markiert und die Raumtemperatur ESR-Untersuchung durchgeführt:

*NpHtrII*₁₋₁₅₇-A94R1 (nur eine HAMP Domäne enthaltend)

*NpHtrII*₂₃₀-C173S-A94R1 (zwei HAMP- Domänen enthaltend)

*NpHtrII*₅₃₄-C173S-A94R1 (Volllängen-Konstrukt)

Sollte ein Spinlabel an einer bestimmten Position zu starke Mobilität aufweisen, so kann eine Reorientierung des Spinlabels bei salzinduzierten Konformationsänderungen nicht ausgeschlossen werden. Diese Spinlabelseitenkette A94R1 in der AS 1 zeigt einen breiteren mittleren Abstand (Holterhues, 2009) und wurde deswegen in diese Arbeit mit aufgenommen.

Die Raumtemperatur (cw)-ESR-Spektren für die Konstrukte *NpHtrII* wurden bei 150mM KCl und 3,5 M KCl aufgenommen (Abb.3.28). Die Graphen sind Spin-normiert. Bei der Normierung der ESR-Spektren auf die Spinzahl werden die Proben denaturiert. Danach werden Wechselwirkungen, je höher die Amplitudenstärke desto kleiner sind die Austauschwechselwirkungen.

Wie in Kapitel 2.7.4 geschrieben, die cw-Spektren die Information über die Mobilität des Spinlabels geben können. Charakteristisch für die mobilen Seitenketten sind die Spektren mit schmalen Linienbreiten und einer kleinen Hyperfeinaufspaltung. Bei niedriger Salzkonzentration (150 mM KCl, schwarzes Spektrum) zeigen alle Konstrukte diesen Charakter. Zwei deutliche Komponenten wurden beobachtet: eine immobile (Pfeil 1) und eine mobile Komponente (Pfeil 2). Die mobile Komponente ist stärker vertreten als die immobile Komponente. Die Erhöhung der Salzkonzentration auf 3,5 M KCl führte zu einer fast vollständigen Unterdrückung der mobilen Komponente und die Spektren zeigen typisch Charaktere von immobilen Seitketten (grünes Spektrum). D. h. Bei niedriger

Salzkonzentration weist das Protein mehr dynamischere Struktur auf als bei Hochsalzkonzentration.

Zur Überprüfung des Einflusses einer Verkürzung der HAMP Struktur wurden die Spektren von drei *NpHtrII* Konstrukten verglichen. Alle Konstrukte zeigen einen ähnlichen Salzeffekt, was darauf hindeutet, dass der Salzeffekt spezifisch für die HAMP Domäne ist und der Einfluss der C-terminalen Regionen zu vernachlässigen ist.

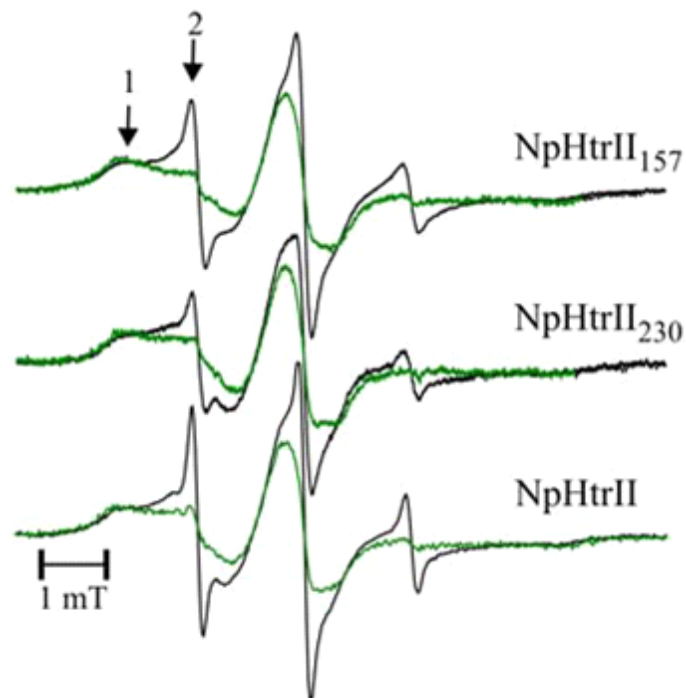


Abb. 3. 28 Spin-normierte Raumtemperatur cw X-band ESR-Spektren der *NpHtrII*-A94R1 Konstrukte im Komplex mit *NpSRII* in rekonstituiertem Zustand in PML. *NpHtrII* Konstrukte verkürzt an den Positionen 157 (*NpHtrII*₁₅₇), 230 (*NpHtrII*_{1-230-C173S}), sowie die Vollängen Variante (*NpHtrII*-C173S) wurden bei 150 mM KCl (schwarz Linie) und 3,5 M KCl (grüne Linien) gemessen. Die unmobile Komponente ist durch Pfeil 1 und die mobile Komponente durch Pfeil 2 markiert.

3.2 Untersuchungen zur *NpHtrII* Struktur und Rezeptor-Transducer Komplexbildung

In diesem Kapitel sollen Struktur und Eigenschaften des *NpSRII*-His/*NpHtrII*1-523-His Komplexes beschrieben werden. Im ersten Abschnitt werden die Bildung des Komplexes und die Optimierung der Komplexbildung mittels Gelfiltration untersucht. Im zweiten Abschnitt wird die Einlagerung von aufgereinigtem Proteinkomplex in Membran-Nanodisks untersucht und mittels Elektronenmikroskopie und Laser Flash Absorption charakterisiert.

3.2.1 Untersuchungen zur Bildung des *NpSRII/NpHtrII* Komplexes mittels Gelfiltration

3.2.1.1 Gelfiltration des *NpHtrII*

Die Expression und die Aufreinigung der Proteine *NpSRII* und *NpHtrII* in *E.coli* BL21 DE3 wurden, wie in Abschnitt 2.5.1.2 beschrieben, durchgeführt. Das Gelfiltrationschromatogramm für den solubilisierten Transducer ist in Abbildung 3.29 dargestellt. Das Chromatogramm des *NpHtrII*-His unmittelbar nach Ni-NTA (Abb. 3.29 A) zeigt die Anwesenheit von mehreren verschiedenen Peaks, die mehrere oligomere Formen des Transducer repräsentieren. In absteigender Reihenfolge werden Peaks bei den Retentionsvolumen von 8,1, 10,2, 12,0 und 13,1 ml beobachtet, die einem Molekulargewicht von jeweils ca. >1300 kDa (Aggregate), 600 kDa (Multimer), 180 kDa (Dimer), und 60 kDa (Monomer) entsprechen.

Das Gelfiltrationschromatogramm des *HtrII* nach 2 Tage Inkubation bei 4°C (Abb.3.29 B) zeigt einen Peak bei einem Retentionsvolumen von 8.2 ml. Dieser Peak kann Aggregaten zugeordnet werden. Dieses deutet auf die Zeitabhängigkeit des Systems hin, bei der die Ausbildung von Cluster bzw. höherer Aggregate ein langsamer Prozess ist.

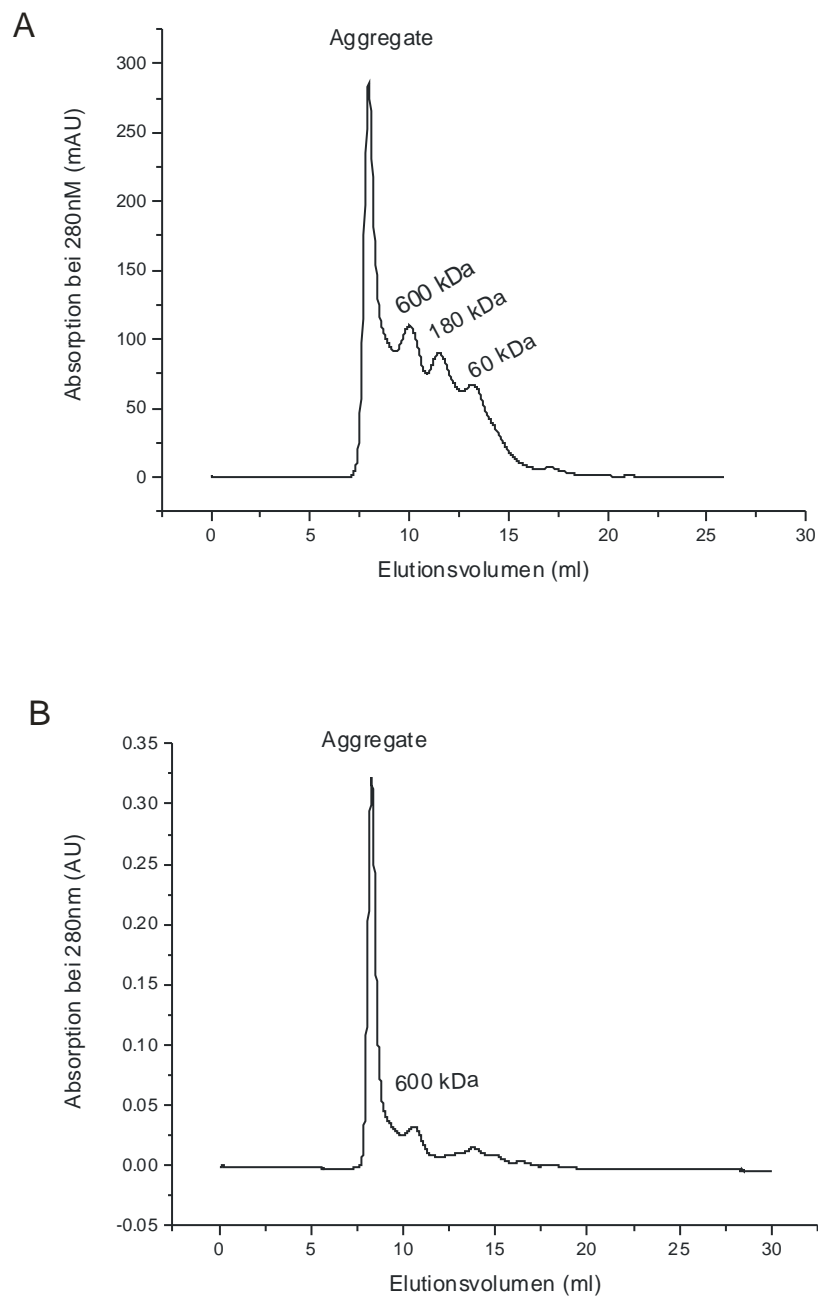


Abb. 3.29 Gel-filtrationschromatogramme des *NpHtrII*. Molekulargrößen sind in kDa angegeben.

A: direkt nach Ni-NTA Aufreinigung

B: Aggregationsbildung nach Zweitägiger Inkubation bei 4°C.

3.2.1.2 Gelfiltration des *NpSRII*

Zur Charakterisierung möglicher oligomerer Formen des *NpSRII* Proteins, wurde ebenfalls eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule durchgeführt. Das Chromatogramm für solubilisiertes *NpSRII* ist in Abbildung 3.30 gezeigt.

Laufmittel ist Puffer G_{mem} (500 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 0,05% DDM). Das Chromatogramm zeigt nur ein Peak mit 110 kDa, wobei es sich um das Protein Dimer handeln könnte (MW *Np*SRII-monomer: 26,6 kDa; DDM bildet eine Mizelle mit einer ungefähren Größe von ca. 50 kDa).

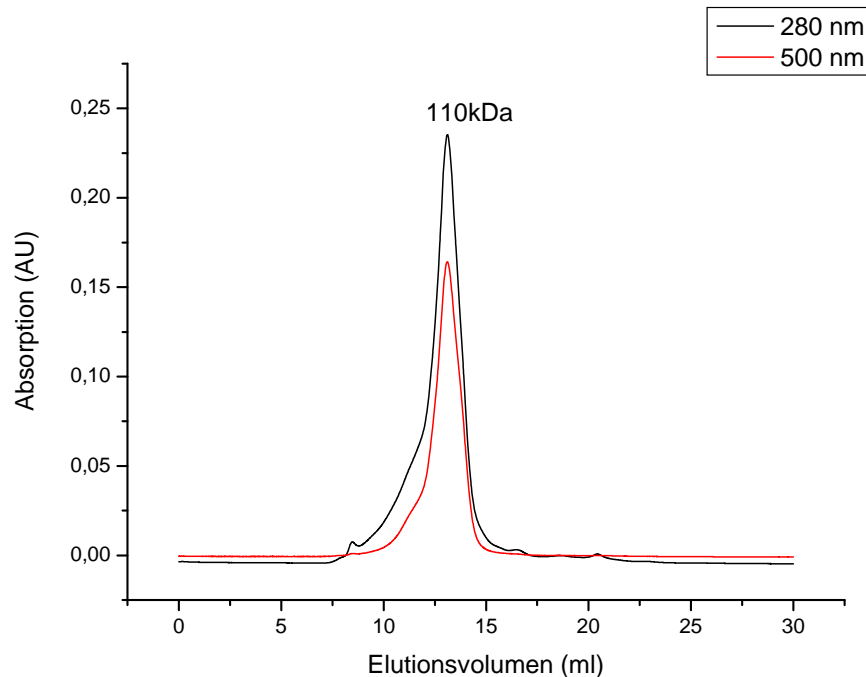


Abb. 3. 30 Gelfiltrationschromatogramm des *Np*SRII gemessen bei den Wellenlängen 280 nm und 500 nm.

3.2.1.3 Gelfiltration des *Np*HtrII/*Np*SRII Komplexes

Für die Komplexbildung wurden *Np*SRII und der Transducer *Np*HtrII in molarer Stöchiometrie von 1:1 in Puffer G_{mem} gemischt und 1 Stunde bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde unmittelbar darauf mittels analytischer Gelfiltration (Superdex 200) analysiert. Die Eluate wurden zu je 0,5 ml Fraktionen gesammelt.

Das Gelfiltrationschromatogramm wurden bei den Wellenlängen 280 nm und 500 nm aufgenommen (Abb. 3.31). Drei Peaks sind bei 280 nm zu beobachten und mit Hilfe der durch den Proteinstandard erhaltenen Eichgerade lässt sich die Größe des Peaks berechnen: der erste Peak eluiert im Ausschlussvolumen, der zweite Peak kann einer Masse von 620 kDa zugeordnet werden und der dritte Peak einer Masse von 110 Da. Der erste Peak zeigt eine Absorption von ca. 320 mAU bei 280 nm, bei 500 nm ist fast keine Absorption zu beobachten. Die anderen zwei Peaks zeigen sowohl bei 280 nm als auch bei 500 nm Absorption. Die

Verhältnisse der Absorption bei 500/280 nm der drei Peaks sind jeweils 0,0; 2,2; 1,2. Daraus lässt sich schließen, dass die drei Peaks jeweils von links nach rechts dem HtrII, dem SRII/HtrII Komplex und dem SRII zugeordnet werden können.

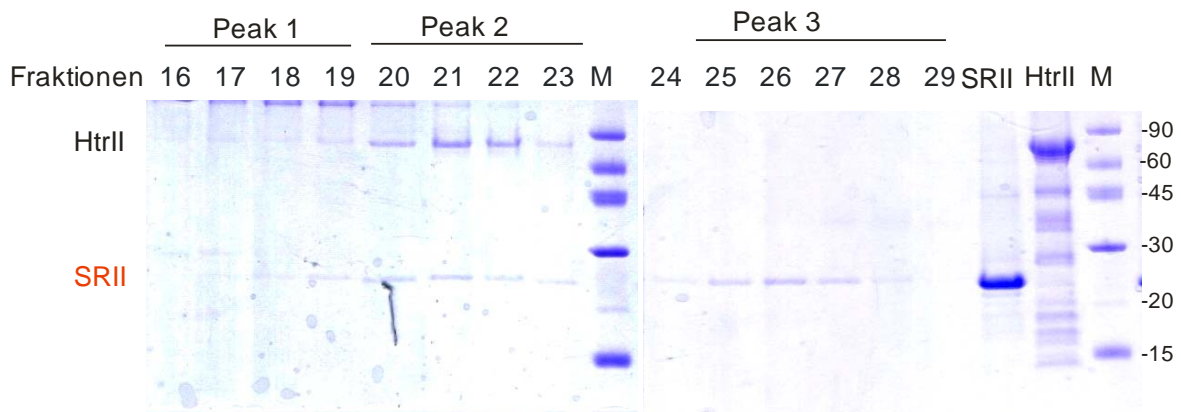
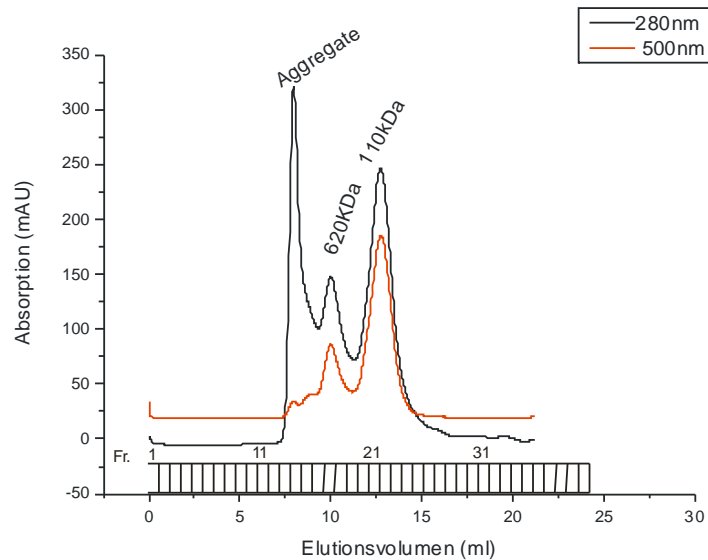


Abb. 3.31 A: Chromatogramm der Komplexaufreinigung über eine Superdex 200 Säule. Es sind deutlich 3 Peaks getrennt worden. Über das SDS-PAGE Gel (B) wird der erste Peak den Transducer Aggregaten, der zweite Peak dem Komplex und der dritte Peak dem freien SRII zugeordnet.

Um diese Vermutungen zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE der Fraktionen 16-29 der analytischen Gelfiltration angefertigt (Abb. 3.31B). Als Referenz wurden *Np*SRII und *Np*HtrII jeweils daneben aufgetragen. In den Bahnen 16-19 (entsprechen der Fraktion im Ausschlussvolumen von 7,5 ml bis 9,5 ml) handelt es sich um Aggregate des HtrII Proteins. In den Bahnen 20-22 (entsprechen dem Peak im Retentionsvolumen von 10 ml bis 11 ml) treten zwei Banden auf, deren apparentes Molekulargewicht ca. 26 kDa und 70 kDa beträgt. Die Banden können jeweils *Np*SRII und *Np*HtrII zugeordnet werden. In den Bahnen 23-29

(entsprechen dem Peak im Retentionsvolumen von 11,5 ml bis 14 ml) tritt nur eine Bande mit apparentem Molekulargewicht von ca. 26 kDa auf, daher kann gefolgert werden, dass es sich hierbei um *Np*SRII handelt.

Das Gelfiltrationsexperiment zeigt, dass nur ca. 25% des HtrIIs an der Komplexbildung beteiligt waren. Weil SRII deutlich stabiler als HtrII (3.2.1.2) ist und größere Expressionsausbeuten liefert, wurde in folgender Optimierungsuntersuchung eine 1,5:1 Stöchiometrie SRII zu HtrII gewählt.

3.2.1.4 Optimierung der Inkubationszeit

Als Erstes soll der Einfluss der Inkubationszeit ermittelt werden. Zwei SRII/HtrII Ansätze mit Stöchiometrien 3:2 wurden bei 4°C jeweils 1 Stunde (A) und über Nacht (B) inkubiert. Die Abbildungen 3.32 A und B zeigen die Chromatogramme der Gelfiltration über eine Superdex 200 Säule. Das Gelfiltrationschromatogramm wurden bei den Wellenlängen 280 nm und 500 nm aufgenommen. Drei Peaks sind zu beobachten und von links nach rechts können diese den Aggregaten, dem SRII/HtrII Komplex und SRII zugeordnet werden (3.2.1.3). Der Komplex-Peak in Abbildung B ist deutlich stärker ausgeprägt als in A. Es ist davon auszugehen, dass sich die höhere Inkubationszeit positiv auf die Komplexbildung auswirkt und die Ausbeute gesteigert werden kann.

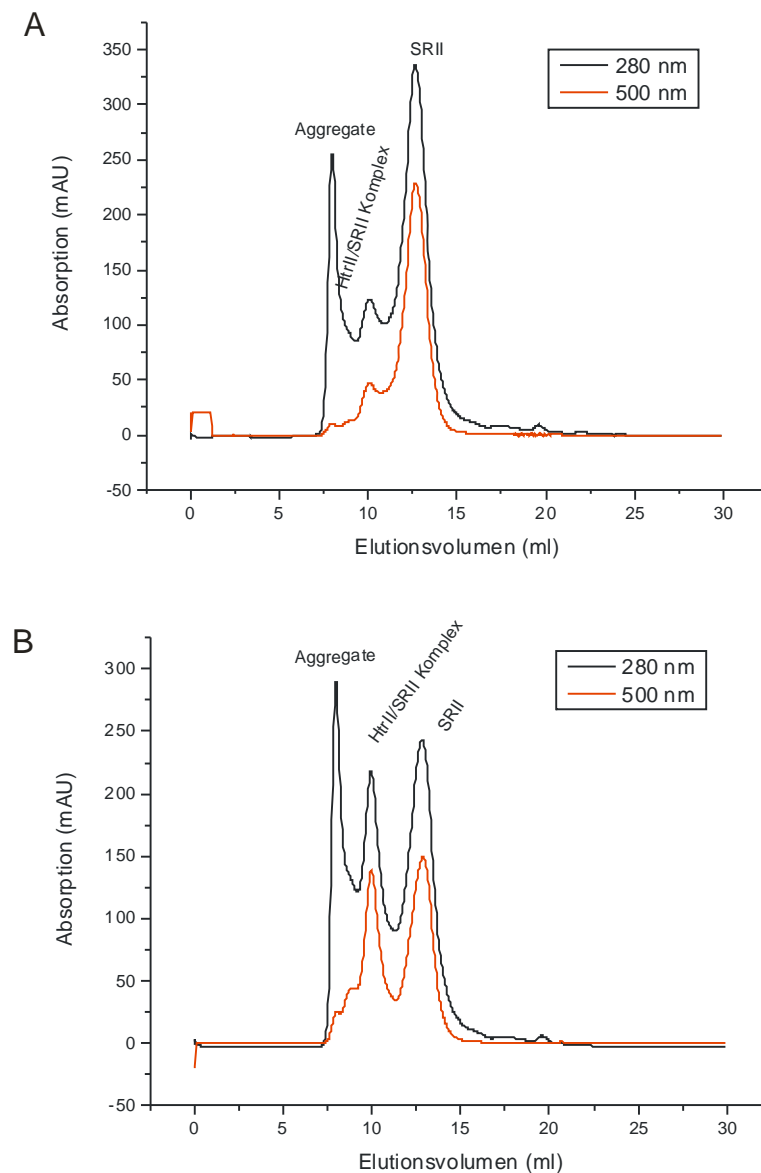


Abb. 3.32 Gelfiltrationschromatogramme des SRII/HtrII Komplexes mit Stöchiometrien 3:2 nach Inkubation bei (A) 4°C für eine Stunde, (B) 4°C über Nacht.

3.2.1.5 Optimierung der Temperatur

Die Temperatur spielt eine sehr wichtige Rolle für die Stabilität des HtrII Proteins. Drei SRII/HtrII Ansätze mit Stöchiometrien 3:2 wurden jeweils 1 Stunde bei 4°C (A), 20°C (B) und 37°C (C) inkubiert. Die Abbildungen 3.33 A, B und C zeigen die Chromatogramme der Gelfiltration über eine Superdex 200 Säule. Das Gelfiltrationschromatogramm wurden bei den Wellenlängen 280 nm und 500 nm aufgenommen. Drei Peaks sind zu beobachten und können von links nach rechts den Aggregaten, dem SRII/HtrII Komplex und dem SRII zugeordnet werden (3.2.1.3). Der Vergleich der Gelfiltrationschromatogramme der

Komplexformationsprodukte bei 4°C, 20°C und 37°C zeigt, dass die Formationsreaktion bei 4°C deutlich langsamer als bei 20°C stattfand. Bei 37°C aggregierten HtrII und SR11, so dass die Ausbeute des Komplexprodukts niedriger als bei Inkubation bei 20°C ist.

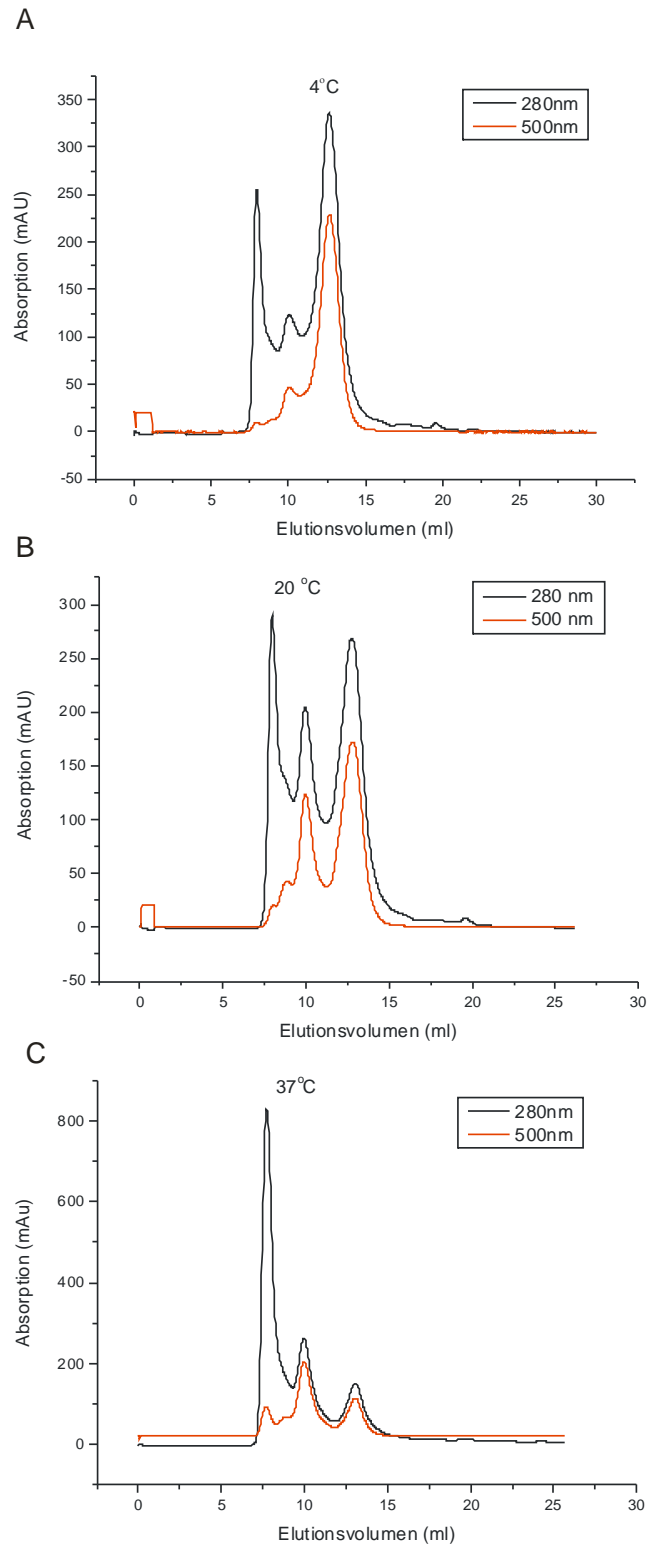


Abb. 3.33 Gelfiltrationschromatogramme des SR11/HtrII Komplexes mit Stöchiometrien 3:2 nach Inkubation bei (A) 4°C, (B) 20°C, (C) 37°C für eine Stunde.

3.2.1.6 Stabilität des *Np*SRII/*Np*HtrII Komplexes

Zur Herstellung des SRII/HtrII Komplexes wurden *Np*SRII und der Transducer *Np*HtrII in molarer Stöchiometrie von 1:1 in Puffer G_{mem} gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wurde am nächsten Tag mittels Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200) aufgereinigt (Abbildung 3.34).

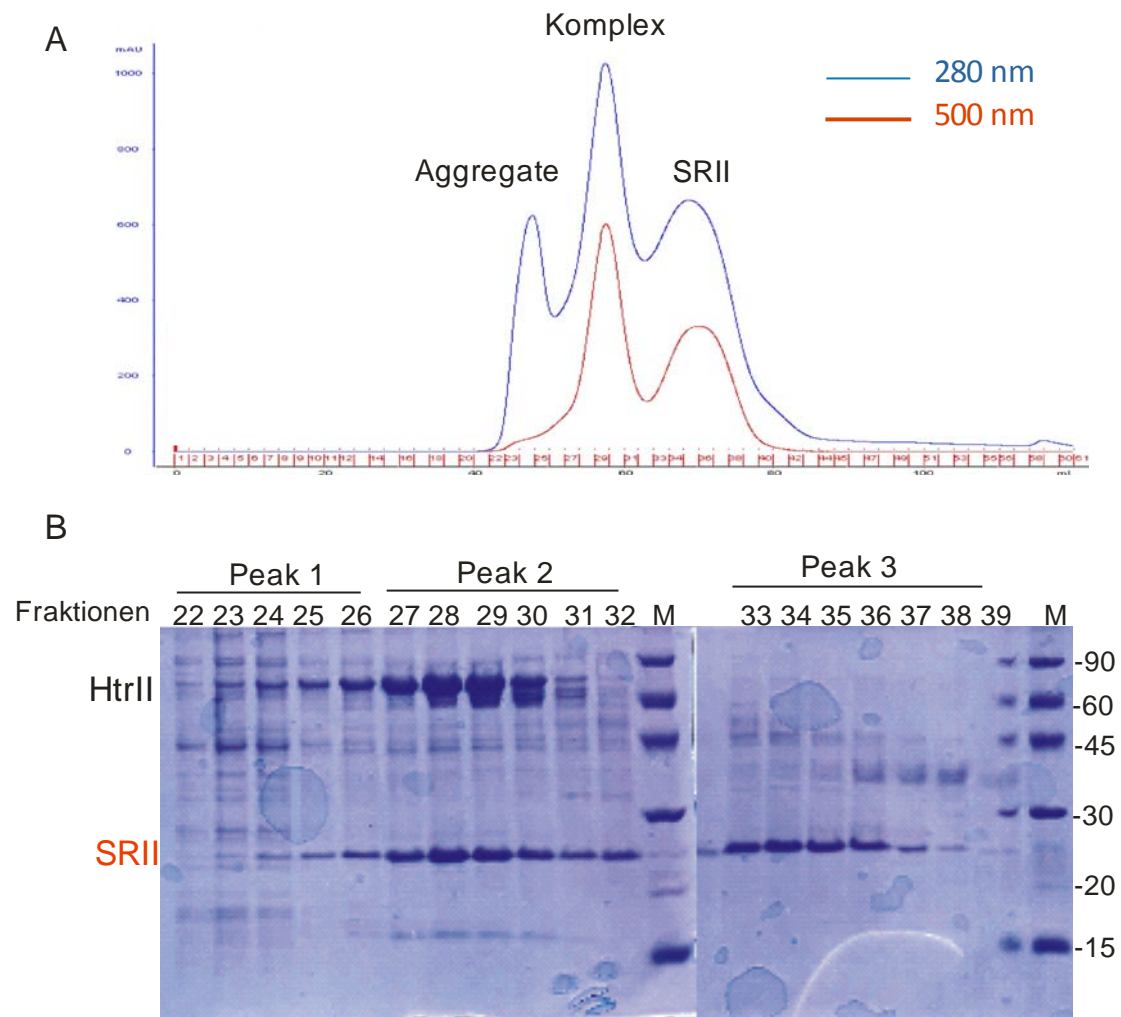


Abb. 3.34 A: Chromatogramm der Komplexaufreinigung über eine Superdex 200 Säule. Es sind deutlich 3 Peaks getrennt worden. Über das SDS-PAGE Gel (B) wird der erste Peak Transducer Aggregaten, der zweite Peak dem Komplex und der dritte Peak freiem SRII zugeordnet.

Die Fraktionen 27-31 wurden isoliert. Zur Charakterisierung der Stabilität wurde eine Gelfiltrationsanalyse des aufgereinigten Komplexes nach Inkubation für 1 Tag bei RT durchgeführt. Das Chromatogramm der Gelfiltration ist in Abbildung 3.35 dargestellt. Der

isolierte Rezeptor-Transducer Komplex bleibt homogen in Konzentrationen von 2-3 mg/ml bei 4°C für mehrere Tage.

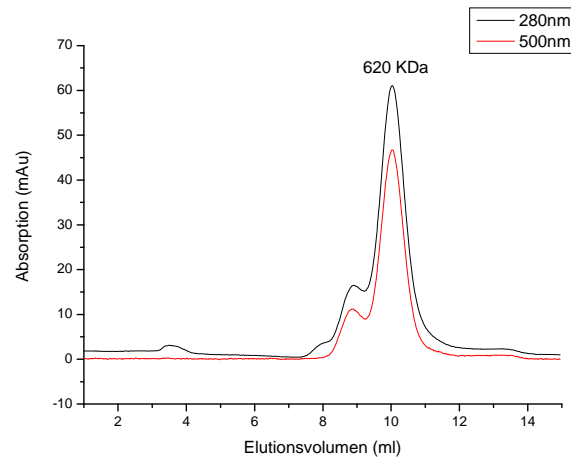


Abb. 3.35 Gelfiltrationschromatogramme des isolierten Rezeptor-Transducer Komplexes nach einem Tag Inkubation bei Raumtemperatur.

3.2.2 Einbau und Untersuchung des *NpSRII/NpHtrII* Komplex in Membran Nanodisks

Phospholipiddoppelschicht-Nanodisks bilden eine vielversprechende Modellmembran für die Studie von Membranproteinen unter nativen Bedingungen. Nanodisks bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, welche von einem Proteinmantel von definierter Größe umgeben ist (Bayburt et al., 2002). Ein Nanodisksmodell ist in Abbildung 3.36 abgebildet.

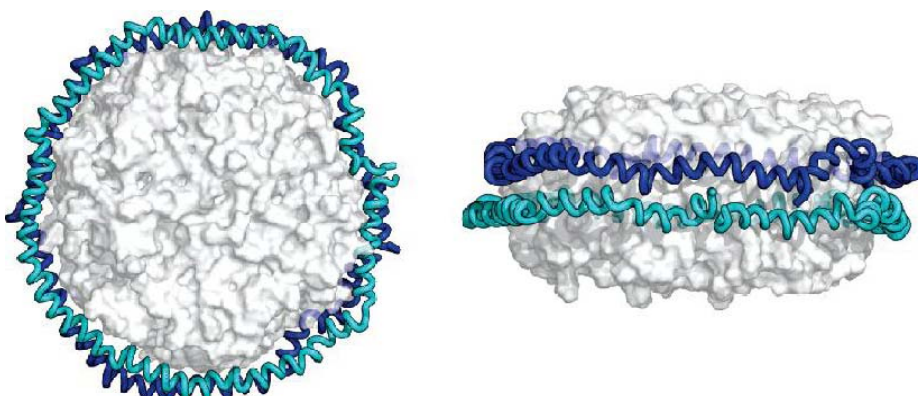


Abb. 3.36 Phospholipidnanodisks, Ansicht von oben und parallel zur Lipidschicht. Zwei Proteinmonomere bilden einen Mantel, der eine definierte Größe einhält (Nath et al., 2007).

Verschiedene Membranproteine konnten schon in Nanodisks eingelagert werden und weiterhin für funktionelle und strukturelle Untersuchungen verwendet werden. Darunter auch die 7-transmembranen Proteine Rhodopsin (Rind), und Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* und die *E.coli* Chemotaxisproteine Tar und Tsr. Für die bakteriellen Chemorezeptoren ist bekannt, dass die Signaltransduktion nur durch Trimere von Dimeren möglich ist (Boldog et al. 2006). Da das HtrII eine Strukturhomologie zu den Chemorezeptoren aufweist, sollten die Gültigkeit dieser Theorie überprüft werden, ob es auch für den Transducer passen werden. Außerdem soll die Modellmembran für die aktuellen Forschungsschwerpunkte am Photorezeptorkomplex verfügbar gemacht werden.

In diesem Abschnitt der Arbeit ist es das Ziel, den gesamten Photorezeptorkomplex aus *Natronomonas pharaonis* in Nanodisks einzubauen. Der Komplex besteht aus SRII und HtrII und liegt im nativen Zustand als 2:2 Komplex vor (Gordeliy et al., 2002). Der Einbau soll, wenn möglich, als Trimer von Dimer erfolgen, um einen Vergleich mit den bakteriellen Chemorezeptoren durchführen zu können. Für diese existieren mehrere Studien die belegen, dass die Signalweiterleitung durch Trimere von Dimeren ausgeführt wird.

3.2.2.1 Nanodiskformation mit eingelagertem *NpSRII/NpHtrII* Komplex

Wie in Kapitel 2.5.5 vorgestellt, wurden für die Formation der Nanodisks 20 μM aufgereinigtes MSP (Membrane scaffold protein), 2 μM *NpSRII/NpHtrII* Komplex, 2 mM Lipide und Puffer auf 200 μl gemischt und bei RT für 2 Stunden inkubiert. Um die Autoformation der Nanodisks einzuleiten, werden 2/3 Volumen Bio-Beads SM2 hinzugefügt und die Probe leicht eine Stunde geschüttelt. Anschließend wird die Probe durch einen 22 μm Filter filtriert und sofort durch Gelfiltration aufgearbeitet. Abbildung 3.37A zeigt die Chromatogramme der Gelfiltration: es sind zwei Peaks bei einer Wellenlänge von 280 nm zu erkennen, wobei nur der Peak bei ca. 9 ml Elutionsvolumen eine Absorption bei 500 nm zeigt und damit SRII enthält. Es wurden die Eluate von 7 ml bis 15 ml gesammelt und in 5 Fraktionen geteilt. Die Fraktionen 1-5 wurden auf einem SDS-Gel analysiert, welches in Abb. 3.38B gezeigt ist. In allen Fraktionen ist das MSP(-) enthalten (29 kDa). Dadurch wird bestätigt, dass es sich bei dem zweiten Peak (12 ml) um leere Nanodisks handelt. Wie erwartet zeigen sich in den ersten zwei Fraktionen die Komplexproteine HtrII (79 kDa), MSP (29 kDa) und SRII (27 kDa). Die Komplexformation wird durch die Denaturierung mit SDS aufgelöst.

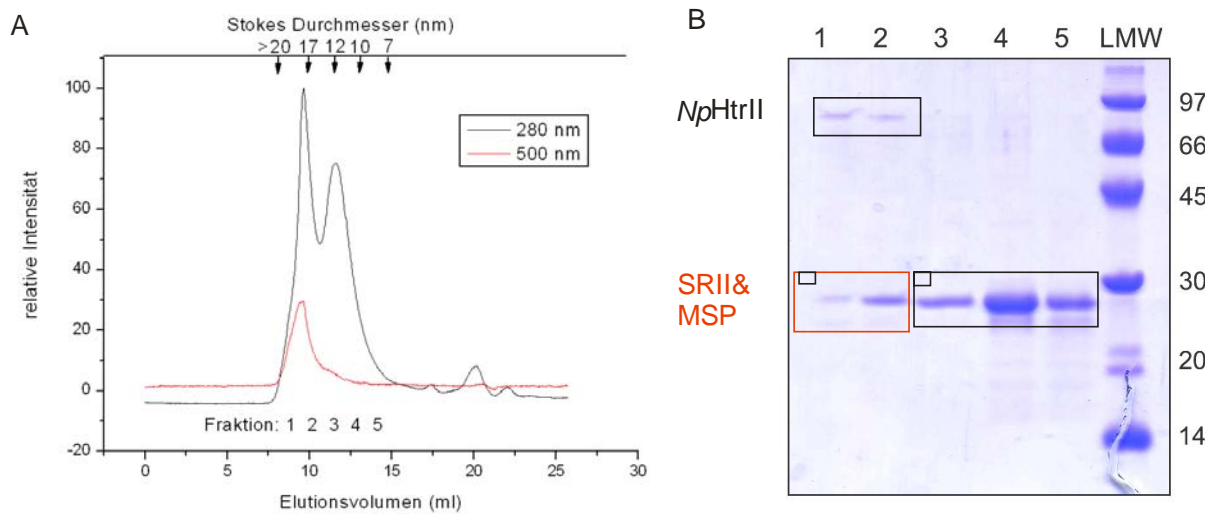


Abb. 3.37 A: Chromatogramm der Gelfiltration über eine Superdex 200 Säule eines Nanodiskformationsansatzes. Es wurde die Absorption bei 280 nm und 500 nm gemessen; B: Analyse der Fraktionen 1-5 über eine SDS-PAGE.

3.2.2.2 Elektronenmikroskopie des *NpSRII/NpHtrII* Komplex in Nanodisks

Es wurden Aufnahmen der Fraktion 1 der Gelfiltration (vgl. 3.2.2.1) mit einem Elektronenmikroskop gemacht. Ausschnitte der Aufnahmen sind in Abbildung 3.39 B gezeigt. Als Vergleich sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Komplexes in Detergenz DDM in Abbildung 3.38 A dargestellt. Der Komplex in Detergenz zeigt kleine runde Fragmente mit einem geschätzten Durchmesser von 5 nm. Im rot markierten Bereich ist eine deutliche Struktur des Transducers HtrII zu erkennen. Dieser ist an eine andere kompakte Struktur gebunden, was die Komplexbildung wahrscheinlich macht. Anhand des Bildes kann zwischen einer 1:1 oder 2:2 Stöchiometrie des Komplexes nicht unterschieden werden. Abbildung 3.38B zeigt eine Fraktion aus dem Ausschussvolumen von einem der Nanodisk-Komplex Ansätze. Es sind deutlich zwei unterschiedliche Strukturen erkennbar. Ein etwas kleineres Fragment, wobei es sich um den reinen Komplex handelt und zusätzlich größere Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 12 nm, wobei es sich eindeutig um Nanodisks handelt. Eine Nanodisk mit eingebauten Transducer Molekülen ist rot markiert. Es ist bekannt, dass sich das HtrII mehrere Nanometer ins Cytoplasma erstreckt. Anhand dieses Bildes ist auch eine Aussage über die Stöchiometrie machbar. Es ist deutlich zu erkennen, dass es sich um 3 Fragmente handelt. Da der Photorezeptor nativ einen 2:2 Komplex bildet, kann hier gezeigt werden, dass es sich also um Trimere von Dimeren handelt. Dieses Ergebnis spricht für die Theorie, dass der Photorezeptor in nativer Umgebung eine Trimer von Dimer

Formation annimmt. Die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie zeigen, dass eine Nanodiskformation, sowie der Einbau von Komplex Trimeren funktioniert. Es sollte aber darauf hingewiesen werden, dass weitere Experimente notwendig sind um den Trimer-Komplex NpSRII/NpHtrII nachzuweisen.

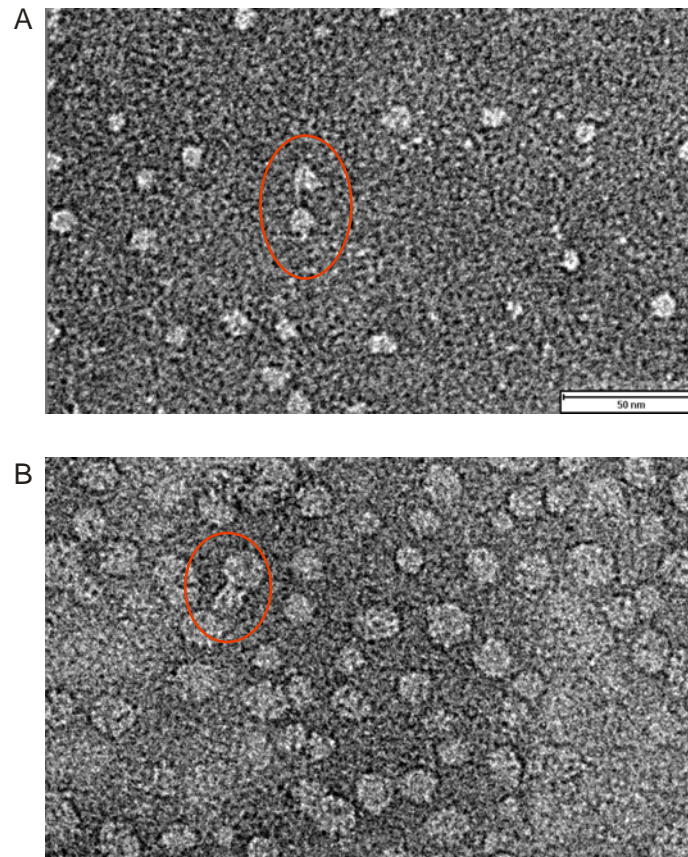


Abb. 3.38 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des *NpHtrII/NpSRII*-Komplexes in Detergenz(A) und in Nanodisks(B).

3.2.2.3 Einfluss der Protein/Lipid-Umgebung auf den Photozyklus von *NpSRII* und den *NpSRII/NpHtrII* Komplex

Kenntnisse über den Photozyklus des *NpSRII*s sind zum Verständnis der Reizaufnahme und der Weiterleitung an die nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade in dem System der Phototaxis notwendig. Es existieren bereits detaillierte kinetische Untersuchungen über den *NpSRII* Photozyklus (Chizhov et al., 1998; Schmies et al., 2000). In dieser Arbeit soll die Laserblitz-Absorptions-Spektroskopie genutzt werden, um den Einfluss der Umgebung, das heißt den Einfluss des Einbaus des SRII bzw. des SRII/HtrII Komplexes in Nanodisks zu untersuchen. Da der Photozyklus des *NpSRII*s mit Konformationsänderungen einhergeht, die sich auch auf die Struktur der Protein-Oberfläche auswirken, könnte die direkte Umgebung des Photorezeptors einen Einfluß haben. Um den Photozyklus zu bestimmen, werden bei drei

charakteristischen Wellenlängen (400nm[M-Intermedial], 500nm[Grundzustand] und 550nm[O-Zustand]) folgenden Proben gemessen und verglichen. Die Spektren sind in Abbildung 3.39 und 3.40 abgebildet.

*Np*SRII oder *Np*SRII/*Np*HtrII Komplex, DDM-solubilisiert

*Np*SRII oder *Np*SRII/*Np*HtrII Komplex, PML-rekonstituiert

*Np*SRII oder *Np*SRII/*Np*HtrII Komplex, in Nanodisks eingelagert

Die transienten optischen Absorptionsänderungen werden bei drei indikativen Wellenlängen gemessen. Die Wellenlänge 400 nm repräsentiert die Bildung und den Zerfall des M-Intermediates, die Wellenlänge 500 nm den Zerfall und die Rückbildung des Grundzustandes und die Wellenlänge 550 nm steht für die Kinetik des $O_{540/550}$ -Intermediates. Vergleicht man den Photozyklus des DDM-solubilierten Rezeptors (Abb. 3.39, Rot Linien) mit dem des PML-rekonstituierten *Np*SRII und dem des in Nanodisks eingelagerten *Np*SRII (schwarze und grüne Linien), lässt sich deutlich erkennen, dass der L→M Übergang in rekonstituierter und in Nanodisks-eingelagerter Form gegenüber der solubilierten Form verlängert wird. Allerdings ist diese Verlangsamung nur minimal .

Die in Nanodisk eingelagerten Proteine, sowohl das *Np*SRII als ungebundenes Protein als auch im Komplex mit dem HtrII, durchlaufen alle Zustände des Photozyklus. Vergleicht man die Photozyklen des rekonstituierten SRII oder des Komplexes mit dem der Nanodisks eingelagerten Form, lässt sich ein identischer Einfluss der Bindung des Transducers beobachten. Dies zeigt, dass die Photorezeptoren sowohl als ungebundenes Protein als auch im Komplex mit dem HtrII im nativen Zustand vorliegen und voll aktiv sind. Unterschiede in der Kinetik der Proben zeigen sich nur im Rückgang des M-Zustandes zum Grundzustand (siehe rote Pfeile), gemessen bei 400 nm. Diese Phase des Photozyklus ist durch mehrere schnelle Gleichgewichte und die Bildung des O-Zustands charakterisiert (Chizhov et al. 1998). Der Grundzustand wird langsamer wieder erreicht, wenn der Rezeptor in Lipid Umgebung ist. Dabei macht es keinen Unterschied, ob es sich um rekonstituierte Proben in Lipiden oder Proben in Nanodisks handelt. Man beobachtet eine Verlangsamung um den Faktor zwei, was auch schon vorher für rekonstituierte Proben des Komplexes beobachtet wurde (Mennes et al., 2007).

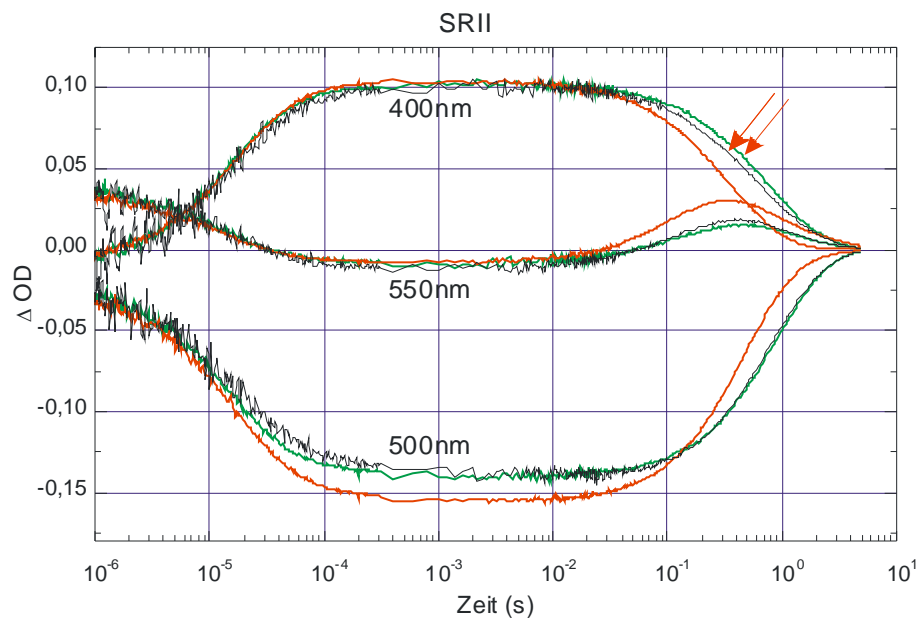


Abb. 3.39 Differentielle Absorptionsänderungen von *NpSRII* in DDM-solubilisiert (Rot), *NpSRII* in PML-rekonstituiert (Schwarz) und *NpSRII* in Nanodisks eingelagert (Grün).

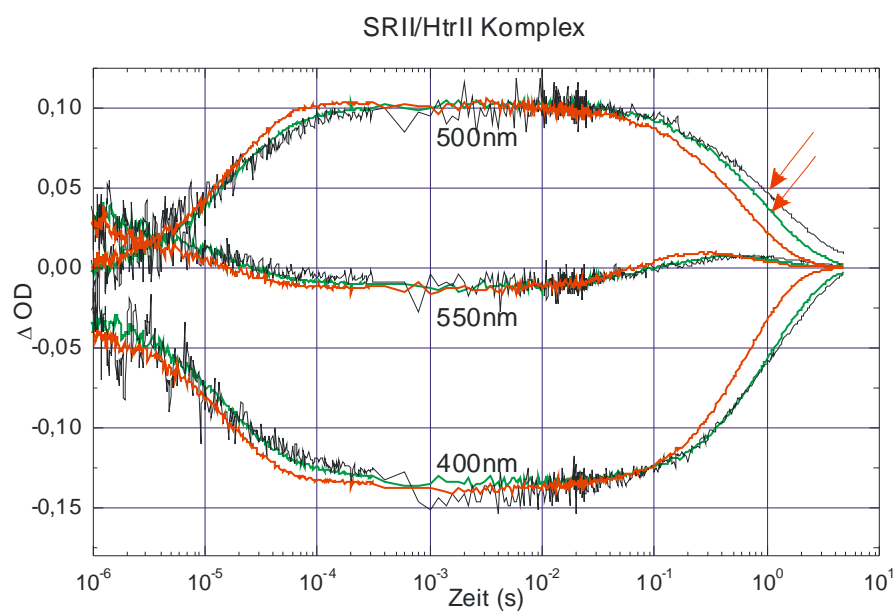


Abb. 3.40 Messung des Photozyklus bei drei verschiedenen Wellenlängen. Rot: *NpSRII/NpHtrII* in DDM, Schwarz: *NpSRII/NpHtrII* in *NpLipids*, Grün: *NpSRII/NpHtrII* in Nanodisks

3.3 Festkörper-NMR Untersuchung zur Licht-Aktivierung des Sensorrhodopsin-Transducer Komplexes

Die vorherigen Arbeiten haben gezeigt, dass mit Hilfe der ssNMR Spektroskopie molekulare Struktur und Dynamik des SRIIs in einer Lipid-Doppelschicht untersucht werden kann (Etzkorn et al., 2007). In dieser Arbeit wurden 2D ssNMR in Kombination mit „Reverse segmental labeling“ und Domänenmarkierung verwendet, um die Veränderung der Proteinstruktur und Dynamik bezüglich Formation und Aktivierung im *Np*SRII/*Np*HtrII Komplex zu untersuchen. Die ssNMR Spektroskopieuntersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Marc Baldus (MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen, jetzt Universität Utrecht) durchgeführt.

3.3.1 Herstellung des lichtaktivierten SRII

Insgesamt sind zwei Methoden durchführbar, um den lichtaktivierten Zustand eines Proteins durch ssNMR zu charakterisieren: Die erste Methode ist die Verwendung eines transparenten Rotors (z. B. Saphir), wodurch die Anregung des Proberaums innerhalb der Proben mittels Laserlicht über einen Glasfaserdraht erfolgt (Metz et al. 1992). Die zweite Methode beschreibt das Einfangen des lichtaktivierten Zustands außerhalb des Magneten. Die angeregte Probe wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und unter niedrigen Temperaturen gemessen, um die aktive Form zu konservieren. In dieser Arbeit wurde die zweite Methode verwendet, da die Stabilität des Saphir-Rotor sehr begrenzt ist.

Unter Beleuchtung mit einer starken Lichtquelle (Projektor in Abbildung 3.41B dargestellt) durch eine 500 nm cut-off Filter (Absorptionskurve in Abbildung 3.41A gezeigt) bei -10°C wurde das in die Membranen rekonstituierte *Np*SRII angeregt, was einem Farbumschlag von orange zu gelb zu Folge hatte (Abbildung 3.42). Flüssiger Stickstoff wurde verwendet, um den angeregten Zustand von SRII einzufangen. Die gefrorenen Proben wurden bei -100°C in den Rotor gefüllt. Die nachfolgenden NMR-Experimente wurden bei -40°C im Rotor durchgeführt.

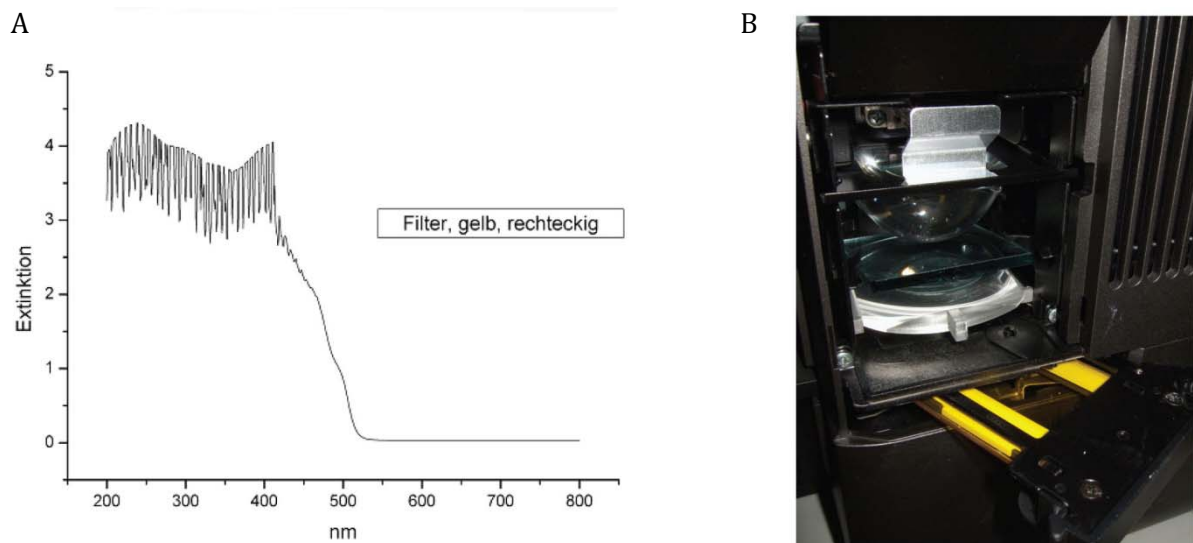


Abb. 3.41 A) Absorptionsspektrum des Filters (B) Foto von dem Filtereinsatz in den Projektor.

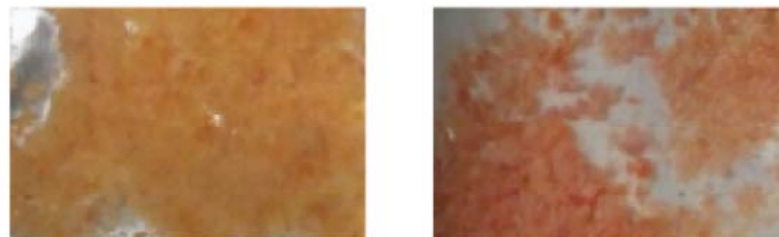


Abb. 3.42 Fotografien von $NpSRII_{\text{komplex}}$ im Lichtangeregten Zustand (Links, gelb) und Grundzustand (Recht, Orange).

3.3.2 1D-NMR Spektroskopie von $[^{15}\text{N}]$ Lysin-SRII

Um zu bestätigen, dass $NpSRII$ in M-Zustand gefangen ist, werden 1D $[^{15}\text{N}]$ -NMR-Spektren von $[^{15}\text{N}]$ Lysin-SRII, in denen nur die N^ϵ Position der Lysin-Seitenketten markiert wurde, durchgeführt. Das ^{15}N -Spektrum von $[^{15}\text{N}]$ Lysin-SRII (Abbildung 3.44) zeigt die Beziehung zwischen Grundzustand von SRII (rot) und dem angeregten SRII (schwarz). Die spektrale Zuordnung kann leicht durchgeführt werden, da nur zwei Lysine (K157 und K205) in $NpSRII$ vorhanden sind. Von rechts (Hochfeldverschiebung) nach links (Tiefeldverschiebung) sind die drei Signale von freie Lysin, dem Peptidrückgrat und die Schiff'sche Base in SRII zu erkennen. Die Hochfeldverschiebung von 27 ppm steht im Einklang mit dem statistischen Durchschnitt des Lysins in BMRB (BioMagResBank: www.bmrb.wisc.edu, Ulrich et al., 2008). Die Tiefeldverschiebung von 180 ppm stimmt sehr gut mit den experimentellen Ergebnissen für die Schiff'sche Base in BR unter ähnlicher Einstellung überein ([Kakshmi et al. 1994] und

[Hu et al. 1998]). Der Peak bei etwa 120 ppm ist das Signal des Protein-Rückgrats durch die natürliche Häufigkeit von ^{15}N hervorgerufen.

In Abbildung 3.43 (Schwarz), wird das Spektrum des *NpSRII* nach Lichtanregung unter gleicher Versuchseinstellung gezeigt. Während das Signal aus der freien Lys-Seitenkette und das Protein-Rückgrat die gleiche Intensität zeigen, reduziert sich das Signal des Lys205 um mehr als einen Faktor zwei. Da in M-Zustand der Stickstoff der Schiff'schen Base deprotoniert wird, wird die Transfereffizienz der Kreuzpolarisation zu Stickstoff reduziert. Zusammen mit der charakteristischen Farbänderung der Probe, zeigt dieses Ergebnis, dass die Probe weitgehend im M-Zustand gefangen war.

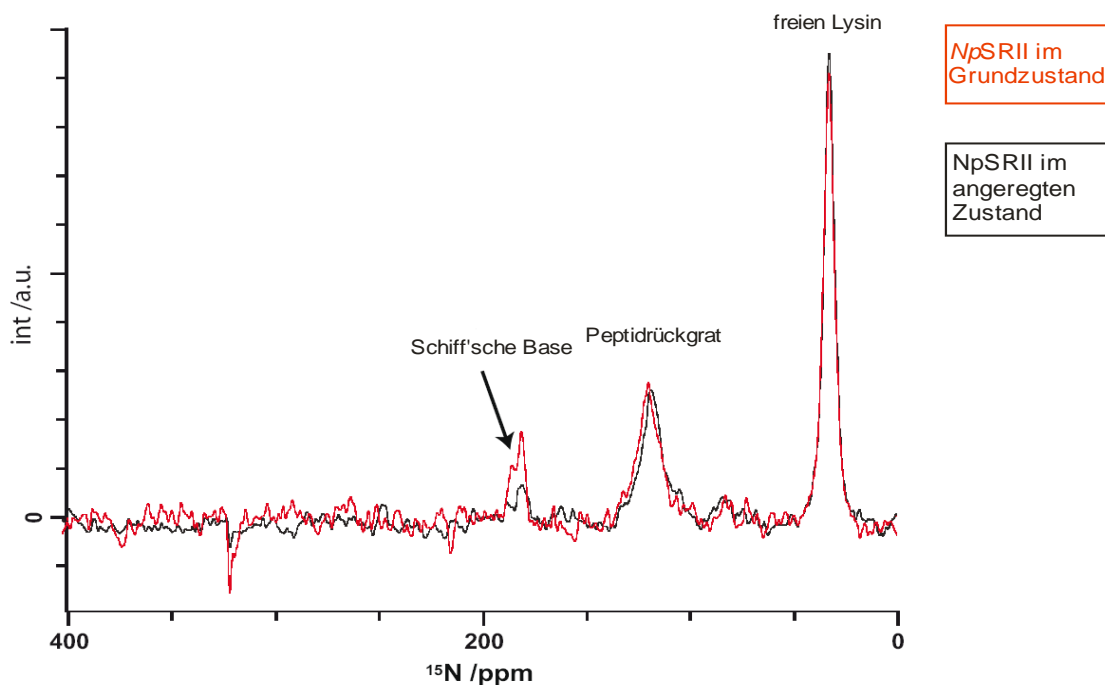


Abb. 3.43 ^1H - ^{15}N CP Spektrum der ^{15}N -Lysin SRII in Grundzustand (rot) und Licht angeregten Zustand (schwarz).

3.3.3 Konformationsänderungen des Rezeptors *NpSRII* bei der Lichtaktivierung durch 2D ssNMR Spektroskopie

Nach den in Abschnitt 3.3.2 durchgeführten Experimenten, wurde eine lichtaktivierte $\text{U}[^{13}\text{C},^{15}\text{N}\backslash(\text{V,L,F,Y})]$ *NpSRII/NpHtrII* (*NpSRII* ist einheitlicher ^{13}C , ^{15}N markiert und mit natürlicher Häufigkeit von V, L, F und Y umgekehrt markiert, der Transducer ist unmarkiert) vorbereitet. Es wurden 2D (^{13}C , ^{13}C) Korrelations-Experimente mit mittleren ($t_{\text{CC}}=40\text{ms}$, Abb. 3.44 A+B) und langen Mischzeiten ($t_{\text{CC}}=350\text{ms}$, Abb. 3.45 C+D) der $\text{U}[^{13}\text{C},^{15}\text{N}\backslash(\text{V,L,F,Y})]$ *NpSRII / NpHtrII* im Grundzustand (a + c) und Licht angeregten Zustand (B + D) aufgenommen.

Die spektralen Veränderungen wurden durch spektrale Subtraktion untersucht. Abbildung 3.44 E zeigt die Differenzspektren der Spektren A-B, Abbildung 3.44F zeigt die der Spektren C-D. Die positiven Werte (Signal, das stärker als in den Grundzustand ist) wurden rot und die negativen Werte sind grün markiert. Grau-Spektren zeigen gleichbleibende Signale an. Ein solcher Vergleich führt leicht zur Identifizierung von Asp75 C α -C β , welches einen starken positiven Peak an der Position im Grundzustand der *Np*SRII Spektren zeigt. Der enge negative Crosspeak zeigt, dass Asp75 C β um etwa 2 ppm im aktivierten Zustand verschoben wird. Die Seitenkette von Asp75 ist der Protonenakzeptor der Schiff'sche Base nach Licht-Aktivierung. Es wird bestätigt, dass mittels 2D ssNMR Spektroskopie die Beobachtung der durch Aktivierung induzierten strukturellen Veränderungen in Komplexen möglich ist.

Weitere positive und negative Crosspeaks in Abbildung 3.44 E zeigen strukturelle Veränderungen an denen mindestens ein Thr, Ala, and Ile Rest beteiligt sind. Um die verbleibenden chemischen Verschiebungsstörungen zu identifizieren, werden die Spektren mit einer Mischzeit von 350 ms T_{cc} aufgenommen (Abb.3.44 C+D). Die entsprechenden Differenzspektren reproduzieren nicht nur die Intra-Rest-Gipfel in Abbildung 3.44 F sondern ermöglichen auch die sequentielle Zuordnung der Perturbation für Gly130-Ala131 und zeigen die stark konformativen Effekte für Ala172-Ile173 und ein zusätzliches Ala-Ile-Paar.

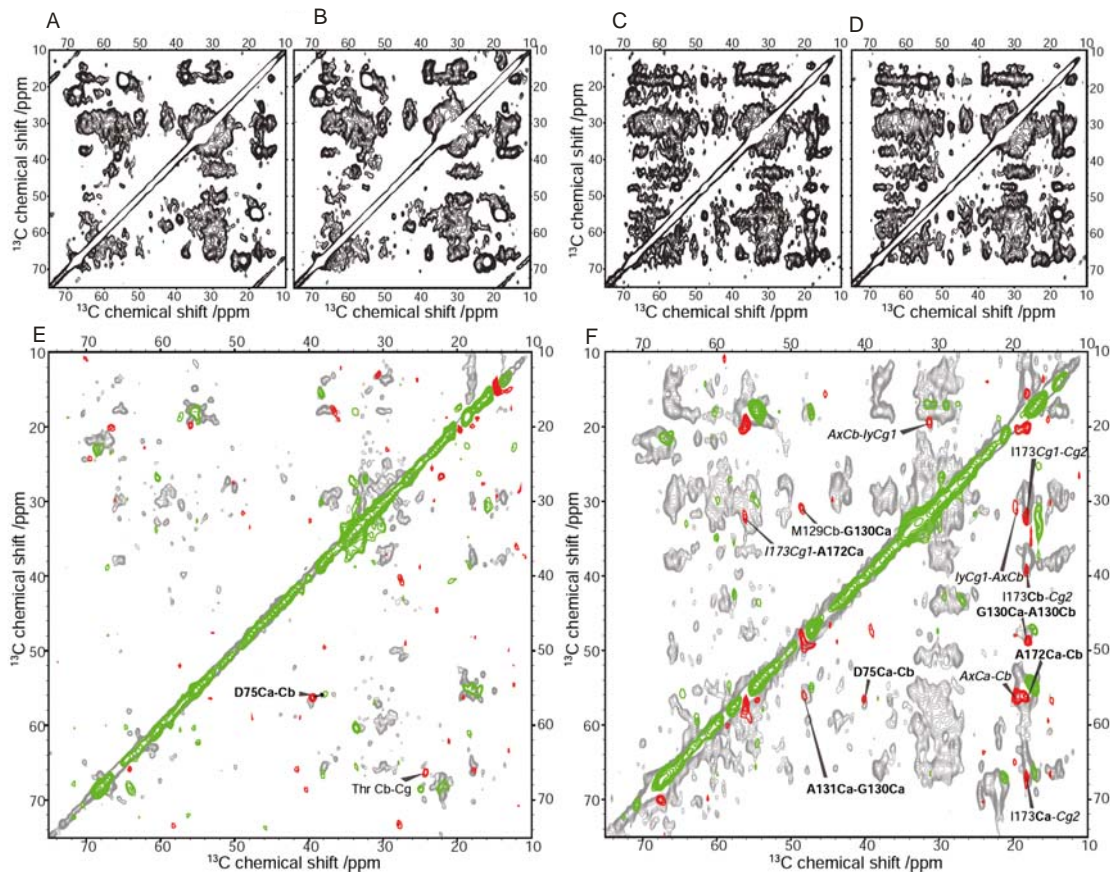


Abb. 3.44 ssNMR Detektion der strukturellen Änderungen des durch Licht induzierten Zustands. A-D: (^{13}C , ^{13}C) PDSD Spektren mit Mischzeiten von $t_{\text{CC}} = 40\text{ms}$ (A + B) und $t_{\text{CC}} = 350\text{ms}$ (C + D) der U [13C, 15N \ (V, L, F, Y)] *Np*SRII / *Np*HtrII in Grundzustand (A + C) und Licht angeregten Zustand (B + D). E + F zeigen die Differenzspektren der Spektren A-B (in E) und C-D (in F). Rote Markierungen zeigen die positiven Werte (Signal, das stärker als im Grundzustand ist), und die negativen Werte sind in grün angegeben. Grau-Spektren zeigen gleichbleibende Signale an. Als Beispiel für $\text{D75C}_\alpha\text{-Cb}$ konnte eine Änderung der chemischen Verschiebung von dem Grundzustand in den angeregten Zustand identifiziert werden.

Generell ist der Vergleich der chemischen Verschiebungen des Grundzustands mit denen des aktivierten Zustands im Einklang mit einer Konformationsänderung in Helix F, wie sie auch aus EPR-Daten abgeleitet wurde. In den Abbildungen 3.45 A und B sind die Konformationsänderungen (blau) und dynamischen Änderungen (grün) der Aminosäuren 154-157 im Strukturmodell gekennzeichnet. Rückstände, die Konformationsänderungen nach Lichtaktivierung zeigen, sind in rot und orange markiert. Interessanterweise sind Gly130 und Ala131 in Helix E direkt gegenüber den Rückständen Ala 172 und Ile173 in Helix F gelegen. Das zusätzliche Ala-Ile-Paar passt zu keiner zugeordneten Korrelation. Das einzige nicht zuordbare Ala-Ile Paar ist Ala-Ile211 in Helix G, welche nach dem Modell in Abbildung 3.45 in der Nähe der EF-Loop Region und TM2 liegt. Licht-induzierte

Veränderungen in diesem Bereich können auf den Veränderungen der Wasserstoffbrückenbindung von Arg162 zu Asp 214, welche im Kristall beobachtet werden, zurückgeführt werden (Moukhametzianov et al., 2006). Wie in Abbildung 3.45 zu sehen, liegen Gly130 und Ala131 in unmittelbarer Nähe des Retinals. Daher können die beobachteten Veränderungen der chemischen Verschiebung von einem direkten Einfluss der Isomerisierung oder einem gekoppelten Effekt durch die Helix G Bewegung erklärt werden. Nach den kristallographischen Daten ist die Helix EF-Fläche von Bewegungen der Helix G unbeeinflusst. Daher kann die chemische Verschiebung auf Störungen der Perturbation in Helices E, F und G durch eine Neigung von Helix F erklärt werden.

Allerdings spricht die eher begrenzte Anzahl von lichtinduzierten chemischen Verschiebungen gegen große strukturelle Umlagerungen in *NpSRII* und schlägt beschränkte Interaktionen vor, die wahrscheinlich durch sterische Kontakte des isomerisierten Retinals induziert werden. Interessanterweise waren die chemischen Verschiebungen hauptsächlich in der Ebene von Tyr199*NpSRII* und Asn74*NpHtrII* mit Ala172-Ile173 auf Helix F und Gly130-Ala131 auf Helix E beschränkt (Abb. 3.45C). Frühere Arbeiten haben bereits darauf hingewiesen, wie wichtig die Wasserstoffbrücke zwischen Tyr174 und Thr204 für die Signaltransduktion ist (Sudo and Spudich, 2006). Da diese Proteinreste in der gleichen Ebene liegen, deutet es darauf hin, dass die strukturellen Änderungen in der Helix EF-Schnittstelle direkt an die in der Helix-FG-Schnittstelle gekoppelt sind. Strukturelle Veränderungen rund um Thr204 wären so erklärt, Thr C β -C γ chemische Verschiebungsänderung wurde in unsere Festkörper-NMR-Untersuchung nach Aktivierung durch Licht beobachtet. Die Bewegung der Helix F öffnet die Grenzflanschen zwischen Transducer und Rezeptor, so dass eine Umlagerung rundum Tyr199 in *NpSRII* und Asn74 in *NpHtrII* induziert wird. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den letzten FTIR-Studien (Bergo et al., 2009) und schlagen einen Signaltransduktionsmechanismus vor, bei dem eine TM2 Drehbewegung eine gekoppelte Bewegung der Helices F und G mit einem erweiterten SRII / HtrII Bindungsmodus hervorrufen. Chimera Studien und Deletionsanalyse zeigten, dass die EF-Schleife eine passive Rolle bei der Signalisierung spielt (Sasaki et al., 2007). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unseren Festkörper-NMR Ergebnissen, die keine strukturellen Änderungen in dem EF-Loop nach Aktivierung durch Licht erkennen lassen.

Interessanterweise ist die EF-Loop Region hier als zentral für die SRII Aktivierung identifiziert worden. Sie spielt eine entscheidende Rolle in der SRII/HtrII Signalisierung (Sudo et al., 2006) und bei der Umlagerung in Bakteriorhodopsin, einem weiteren Mitglied der Rhodopsin-Familie (Sudo und Spudich, 2006). Diese Ergebnisse deuten auf einen effizienten und doch bemerkenswert anpassungsfähigen Mechanismus der

Transportproteine der Rhodopsin-Familie als Meldegeräte über eine zentrale funktionale Einheit hin (Sasaki und Spudich, 2008). In diesem Prozess kann die Beobachtung einer eigenständigen dynamischen HAMP1 Domäne von entscheidender Bedeutung sein, um die nachfolgenden Stufen der Signalübertragung zu erklären.

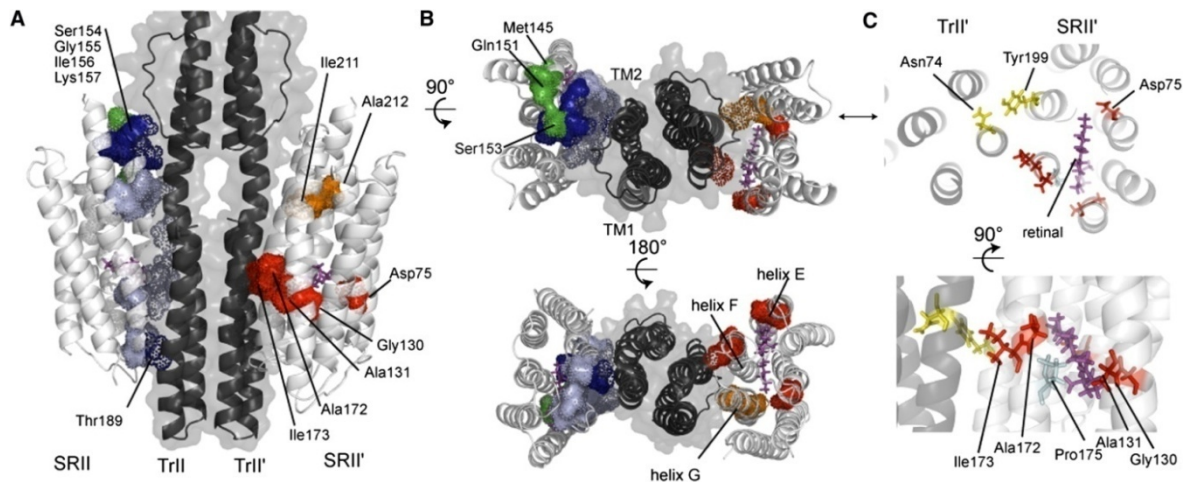


Abb. 3.45 Konformationsänderungen des Rezeptors bei der Komplexbildung und Licht-Aktivierung durch 2D-ssNMR (Etzkorn et al., 2010).

In (A) und (B) sind die Reste, die durch die Transducer Bindung beeinflusst sind, auf der linken Seite der SRlI Struktur hervorgehoben (hell/dunkel blau stehen für identifizierte-/potential chemische Verschiebung). Grüne Reste markieren die Proteinreste, welche eine Verringerung der molekularen Beweglichkeit in dem Komplex zeigen. Hervorgehobene Reste in dem rechten SRlI Strukturmodell veranschaulichen die Bereiche, die Veränderungen der chemischen Verschiebung nach Lichtaktivierung zeigen. Rote Reste könnten sequenziell identifiziert werden. Orange Reste sind konsistent mit den Daten. Das Retinal ist in lila gekennzeichnet. (C) Vergleich von Resten in dieser ssNMR-Analyse (rot) und Resten, die mit Hilfe der zeitaufgelösten FTIR-Spektroskopie identifiziert wurden (gelb) (Bergo et al., 2009).

4 Diskussion

4.1 Untersuchung zur Strukturaufklärung der HAMP Domäne

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

Zur Aufklärung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des Linker-Bereichs des Transducers existieren bislang zwei Modelle: ein festes kompaktes vier-Helix-Bündel (HAMP(A)) und ein lockeres vier-Helix-Bündel (HAMP(B)). Das HAMP(A) Modell wurde mit der Veröffentlichung der ersten Struktur einer HAMP Domäne von Hulko et al. (Hulko et al., 2006) postuliert. Hulko zeigt, dass sich die in dem Linker-Bereich befindliche HAMP-Domäne im Dimer zu einem parallelen, vier-helikalen coiled coil formt, wie es durch Sekundärstrukturvorhersagen vorausgesagt wurde. Die zwei Helizes jedes Monomers sind gleich lang, durch einen Helix-Turn gegeneinander versetzt und sind durch einen Loop von 13 Aminosäuren miteinander verbunden.

Das HAMP(B) Modell wurde kürzlich von Airola et al. postuliert (Airola et al. 2010). In der HAMP(B) Modell haben die vier Helizes auch eine parallele Orientierung aber sind weniger dicht gepackt und liegen voneinander abgespreizt vor: AS1 und AS1' liegen nah zueinander an der Spitze des Bündels; und AS2 und AS2' liegen nah zueinander an der Unterseite des Bündels. Ein ähnliches Modell wurde von Bordignon et al. beruhend auf den Ergebnissen von ESR-Experimente vorgeschlagen (Bordignon et al., 2005). Bei ESR-Experimente sind durchgehend die Aminosäuren von der Position 78 bis zur Position 101 und zusätzlich einige ausgewählte weiter entfernte Aminosäuren im Linker-Bereich untersucht worden. Bis zur Position 94 wird in der AS-1 eine helikale Region identifiziert, die durch eine hohe dynamische Domäne und damit von einer undefinierten Struktur gefolgt wird. Diese tritt deutlich in die wässrige Phase des umgebenden Zytoplasmas ein. Zusammengefasst wird die Gesamtarchitektur der AS-1 Sequenz als ein „molten globular“ Typ beschrieben.

4.1.1 Stabilität der Sekundärstruktur der HAMP Domäne

In dieser Arbeit wurden die Strukturen und Eigenschaften der HAMP Domäne untersucht. Dazu wurden drei verkürzte Transducer Konstrukte *NpHtrII84-230-His*, *NpHtrII84-136-His* und *NpHtrII137-230-His* aus *Natronomonas pharaonis* heterolog in *E. coli* exprimiert und über Affinitätstags aufgereinigt (Abb. 3.1). Im Gegensatz zu den Varianten aus *H. salinarum* bietet die Verwendung des Transducers *NpHtrII* den Vorteil hoher Proteinstabilität. Durch die Verwendung von T7-Transkriptionssystemen kann die heterologe Expression von Teilen des *NpHtrII* in *E. coli* erfolgreich durchgeführt werden. Analog zur Aufreinigung des *NpSRII-His* (Hohenfeld et al., 1999) kann ebenfalls für die C-terminal verkürzten Varianten des *NpHtrII* eine schnelle und effektive Reinigung über Ni-NTA-Säulen erreicht werden.

Die Aufklärung der Sekundärstruktur der HAMP Domäne ist ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Signaltransduktionskaskade von Photorezeptoren. Die hohe strukturelle Homologie zwischen Photorezeptoren und 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 Linkerbereich der Chemorezeptoren. Daher ist die Aufklärung dieser Domäne zwingend zum Verständnis der Signaltransduktion von Photorezeptoren notwendig.

Erste Strukturuntersuchungen der HAMP Domäne werden mit Hilfe von spektroskopischen Methoden durchgeführt. Durch CD Analysen kann gezeigt werden, dass die solubilisierete HAMP Domäne eine un stabile Sekundärstruktur aufweist.

Das HAMP1 (*NpHtrII84-136-His*) zeigt durch CD-Analyse hauptsächlich eine zufällig geknäulte Sekundärstruktur. Die Spektren werden kaum durch die Veränderung des Lösungsmittels (Salzkonzentration und pH) beeinflusst. Durch Zugabe von TFE kann eine α -helikale Sekundärstruktur des Proteins induziert werden. Mögliche Gründe für die beobachtete Stabilisierung der Sekundärstruktur ist die angenäherte Dielektrizitätskonstante des TFE zur Dielektrizitätskonstante des Innenraums von Proteinen. Unterschiede in der Acidität und Basizität im Lösungsmittel TFE und Wasser können auch die relative Stabilität der Wasserstoffbrücken ändern (Sönnichsen et al., 1992).

Unterschiedlich zu der 1.HAMP Domäne, kann ein unmittelbarer Zusammenhang von Salzkonzentration und Sekundärstruktur bei HAMP 2 (*NpHtrII136-230-His*) festgestellt werden. In Abwesenheit von Salz zeigt das CD-Spektrum hauptsächlich zufällig geknäulte Sekundärstrukturanteile. Bei Zugabe von Salz nimmt der Anteil α -helikalen Gehalts an.

Der Einfluss der Salzkonzentration auf HAMP1+2 gibt Hinweise darauf, dass sich wesentliche Strukturveränderungen vollziehen: bei niedrigen Salzkonzentrationen zeigt das Protein eine zufällig geknäulte Konformation mit wenig α -helikalen Anteilen und bei höherer Ionenstärke nimmt der Anteil α -helikaler Struktur des Proteins zu. Daraus kann vermutet werden, dass die vorhergesagte vornehmlich α -helikale Struktur in *NpHtr84-230-His* durch Ionenstärke stabilisiert wird. Der solubilisierte Transducer weist eine ähnliche Sekundärstruktur-Verteilung wie die aufgereinigten und solubilisierten Chemorezeptoren auf [z.B. der Tar-Rezeptor (Foster et al., 1985) oder der Tsr- Rezeptor (Burrows et al., 1989) aus *E.coli*, welche einen α -helikalen Anteil von ca. 80 % aufweisen]. Ähnliche Abhängigkeiten der Sekundärstruktur von der Salzkonzentration wurden in zwei löslichen Transducern des *HsHtrX* und *HsHtrIXI* von Randy W. Larsen et. al., 1999 beobachtet: *HsHtrX* liegt bei einer NaCl Konzentration von 0,2 M überwiegend als Zufallsknäuel vor, während bei einer NaCl Konzentration von 3,8 M eine α -helikale Struktur ausgebildet wird.

Die strukturelle pH-Abhängigkeit der HAMP 1+2 wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht: die Auffaltung der α -Helix eines Proteins zu einer zufällig geknäulten Konformation wird bei pH-Werten oberhalb von 6 beobachtet. Bei pH-Werten von 9 bis 6 liegt ein Zufallsknäuel vor.

Die Temperatur spielt eine wichtige Rolle für die Stabilität der Sekundärstruktur: Bei niedriger Temperatur liegen für HAMP 1+2 α -helikale Strukturen vor, ab ca. 47°C sind die helikalen Strukturen weitestgehend denaturiert. Unter physiologischen Bedingungen hat *N. pharaonis* ein Temperaturoptimum von 45-50 °C ([Rodriguez 1993] und [Robinson et.al., 2005]). Die geringe Differenz zur experimentell gemessenen Denaturierungstemperatur lässt vermuten, dass die isolierte HAMP Domäne *in vitro* thermisch instabiler ist als der native Rezeptor- Transducer-Komplex *in vivo*.

ANS-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie und CD-Daten weisen darauf hin, dass HAMP Bereiche von *NpHtrII* bei niedrigem pH-Wert und hohen Salzkonzentrationen im Molten-Globule Zustand vorliegen.

Aus der weiteren Charakterisierung der HAMP Domäne mit Hilfe von Gelfiltrations-experimenten wurden Monomer und Dimer Spezies nachgewiesen. Zusätzlich wurde deutlich, dass die HAMP Domänen eine zeitabhängige Dimerisierung aufweisen. Es erhöht sich der Dimeranteil nach längerer Inkubationszeit. Die Sequenzanalyse von *NpHtrII* zeigt, dass der Bereich von 165–230 das für die parallele „coiled-coil“-Struktur typische heptadische Sequenzmotiv aufweist. Die „coiled-coil“ Struktur besteht aus zwei Homodimeren. Unter der Annahme, dass der Transducer in nativer Form Dimere bildet, könnte vermutet werden, dass ein Monomer wahrscheinlich in denaturierter Form vorkommt und dimerisieren muss.

4.1.2 Singalweiterleitung in der HAMP-Domäne von NpHtrII

Durch CD-Spektroskopie konnte eine instabile Sekundärstruktur der HAMP Domäne gezeigt werden. Diese Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass die Konformationsänderung in HAMP Domänen leicht durch Umweltfaktoren wie Salzkonzentration, Temperatur und Detergenzkonzentration induziert werden können. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von Doebber et al. 2008 durch ESR Spektroskopie erhalten.

Doebber et al. untersuchte den Einfluss der Salzkonzentration auf die Struktur der HAMP Domäne. Es konnte gezeigt werden, dass für die HAMP Domäne von *NpHtrII* zwei verschiedene Konformationen bei niedriger und auch hoher Salzkonzentration nebeneinander koexistieren (Abbildung. 4.1). Diese beiden Konformationen unterschieden sich durch ihre dynamischen Eigenschaften. Es wurde ein Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen postuliert, welches durch Änderungen der Temperatur oder Salzkonzentration verschoben werden kann (Doebber et al., 2008).

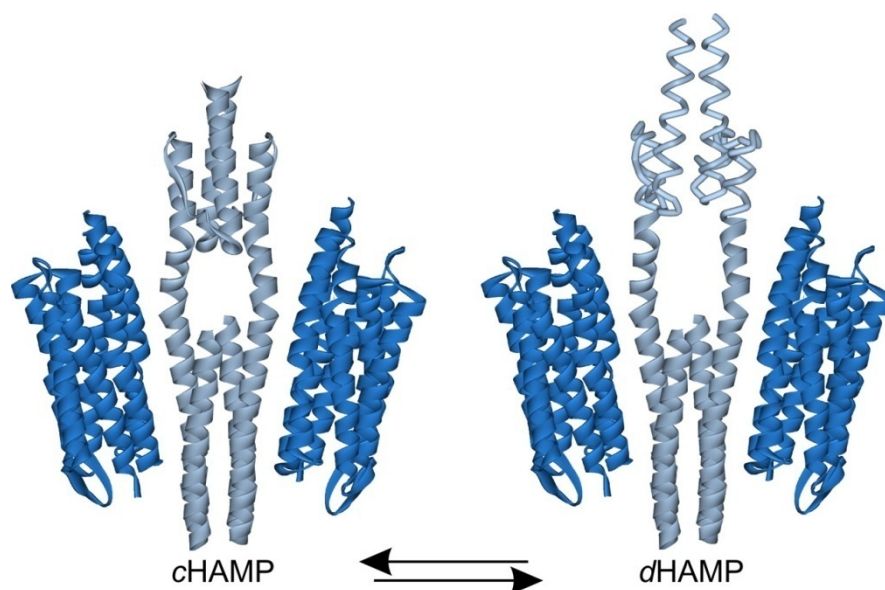


Abb. 4.1 Modelle der vorgeschlagenen Konformationen der Kompakten (cHAMP, links) und der dynamischen (dHAMP, rechts) Konformation der *NpHtrII* HAMP Domäne. Für das cHAMP Modell sind die Strukturen der *A. fulgidus* HAMP-Domäne (PDB: 2ASW) und des NpSRII/NpHtrII-Komplexes (PDB: 1H2S) kombiniert worden. Die dHAMP Struktur basiert auf dem cHAMP Modell, wobei die erhöhte Dynamik dieser Konformation durch dünne Bänder dargestellt ist. (Doebber et al., 2008).

Für die cHAMP Konformation unterstützen mehrere Befunde eine parallel vier Helixbündel Struktur: (1) Sowohl die Mobilität und Zugänglichkeit von ESR Daten passen zu einem

definierten Muster von periodischen Eigenschaften in AS1 und AS2, (2) die experimentell gefundenen periodischen Profile der NiEDDA Zugänglichkeit passen perfekt mit der berechneten Wasserzugänglichkeit der analogen Reste in dem HAMP NMR Modell von Af1503 (Hulko, et al., 2006) überein. (3) Das beobachtete Inter-Spin-Abstände Muster steht im Einklang mit den erwarteten Abständen innerhalb eines vier helikalen Bündels. Während für AS1 und AS2 eine ausgezeichnete Übereinstimmung zwischen den experimentellen Daten und dem NMR-Modell der HAMP Domäne von *A. fulgidus* gefunden wurde, könnte eine solche Analyse nicht für den Linkerbereich, wo nur ein paar Positionen untersucht wurden, durchgeführt werden.

Disulfid-Scan Daten der HAMP Domäne des Chemorezeptor Tar aus *E. coli* in intakten membrangebundenen Chemorezeptoren bestätigen, dass das HAMP NMR-Modell genau die Architektur der konservierten HAMP Domäne der Chemorezeptoren zeigt (Swain und Falke, 2006). In vivo Vorbrückungsstudien (cross-linking) zeigten, dass die HAMP Domänen von Aer, dem *E. coli* Aerotaxis Rezeptor, in die vier Helixbündel Kategorie fallen (Taylor et al.). Diese Entdeckung hebt hervor, dass das NMR-Modell von Hulko tatsächlich ein Prototyp für die HAMP Domänen aus *NpHtrII* ist.

4.1.3 NMR Spektroskopie der HAMP Domänen

Um die strukturelle Rolle der HAMP1 Domäne für die Komplexbildung und Stabilisierung zu untersuchen, wurde die ssNMR Untersuchung von isotopenmarkierten HAMP Domänen entsprechend den Resten 84-136 (HAMP1), 84-230 (HAMP1+2) und ein Komplex mit markierten Transducer und unmarkierten Rezeptor (*NpHtrII*1-157-His/*NpSR*II-His) durchgeführt. Anders als die Erkenntnisse zu Af1503 (Hulko et al., 2006), ist die HAMP1 Domäne in Lösung bei Raumtemperatur weitgehend unstrukturiert. Im Gegensatz dazu zeigten Festkörper-NMR Experimente an HAMP Domänen α -helikale Resonanzmuster, die im Einklang mit einem HAMP-Domäne Strukturmodell, basierend auf der Homologie mit Af1503 (Abbildung. 4.2 A), stehen. Die zusätzlichen Korrelationen geben Hinweise auf die Existenz von nicht-helikalen Ala Positionen, die nicht im Af1503-Homologie-Modell erwartet wurden, während die zu erwartenden Korrelationen für Ile117 fehlen. Beide Befunde könnten durch eine erhöhte Störung des N-Terminus in beiden Helizes um Ala87, Ala88, Ile117 und anderen terminalen Resten erklärt werden (Abb. 3.25A). HAMP1 zeigt einen viel höheren α -Helikalen Gehalt im Präzipitat als im Vergleich zum löslichen Zustand. Dies weist darauf hin, dass intermolekulare Wechselwirkungen für die Stabilisierung der HAMP1 Domäne bedenkende sind.

Festkörper-NMR Experimente an der HAMP1+2 Domäne zeigten α -helikale Resonanzmuster, die im Einklang mit dem Strukturmodell in Abbildung 4.2 B stehen. Die zwei HAMP Domänen

in dem Modell, basierend auf der Homologie mit Af1503, wurden nach der PsiPred Analyse modelliert, wobei die Linkerregion als Coiled-coil-Helix dargestellt wurde, was im Einklang mit Hayashi et. al 2007 steht.

Die in dieser Arbeit durchgeführten ssNMR-Messungen implizierten eine signifikante Erweiterung der Bindungsfläche des SRII/HtrII Komplexes C-Terminal des durch Röntgenkristallographie nachgewiesenen HtrII Rests Leu Leu82 (Etzkorn et al., 2010) und deuten auf eine strukturelle Homologie von HAMP1 zur HAMP Domäne von Af1503 hin. Diese Ergebnisse erlauben ein Modell von *Np*SRII im Komplex mit *Np*HtrII157 zu erstellen, das die Kristallstruktur in Kombination mit der modellierten HAMP Domäne in Homologie zu Af1503 berücksichtigt. Das Verbindungselement zwischen der HAMP Domäne und dem Transmembran Bereich, sowie die Linkerregion wurden als α -Helix modelliert (Abbildung 4.2 C). Die experimentell ermittelten Spektren von HtrII1-157 im Komplex stimmen mit den vorhergesagten Spektren überein. Dies zeigt, dass die Annahme einer strukturellen Homologie zu der HAMP Domäne aus Af1503 stichhaltig ist.

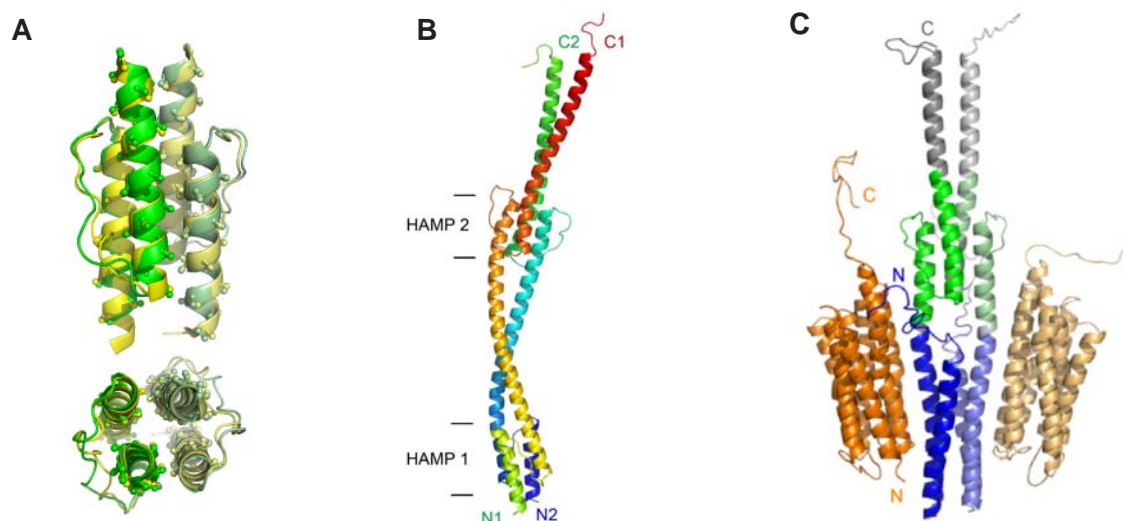


Abb. 4.2 **A:** Seitenansicht und Draufsicht auf das Strukturmodell für HAMP1 (grün) basierend auf der Homologie mit Af1503 (gelb, PDB Eintrag 2ASW). **B:** Seitenansicht auf das Strukturmodell für HAMP1+2 (Modell von Karsten Seidel). **C:** Strukturmodell für *Np*HtrII1-157/*Np*SRII-Komplex (Etzkorn 2010).

Unsere NMR-Analyse legt nahe, dass die isolierte HAMP1 Domäne von *Np*HtrII eine hohe molekulare Plastizität aufweist und dass intermolekulare Wechselwirkungen für die Protein-Stabilisierung entscheidend sind. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit CD- (Kapitel 4.1.1) und ESR-Ergebnisse ([Bordignon et al., 2005] und [Doebber et al., 2008]), einer dynamisch destabilisierten HAMP Domäne, die von äußeren Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert oder Salzkonzentration beeinflusst werden kann.

Trotz der zunehmenden Kenntnisse über strukturelle Details der HAMP Domäne, existiert kein experimenteller Beweis zur Erklärung des Mechanismus der Aktivierung der negativen Phototaxis oder der positiven Taxis. Dennoch wurde die Hypothese eines „eingefrorenem-dynamischen“ Modells für die Aktivierung / Deaktivierung von Chemorezeptoren von Kim vorgeschlagen, bei dem die Signaldomäne in zwei Konformationen durch verschiedene Grade der Dynamik charakterisiert wird (Kim, 1994). Dieses Modell ist auf dem Gebiet der Forschung der bakteriellen Chemotaxis akzeptiert. Die Vorstellung, dass ein Gleichgewicht zwischen Populationen mit unterschiedlichen Graden der Dynamik der Schlüssel der Aktivierung / Deaktivierung der zytoplasmatischen Domäne sein kann, wird bei Hazelbauer et al., 2008 wieder aufgenommen. Kürzlich wurden Hinweise auf einen Stabilisierungs-/Destabilisierungs-Mechanismus für die bakterielle Signaltransduktion in vivo zur Verfügung gestellt (Borrok et al., 2008).

Durch ESR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie wurde gezeigt, dass eine Rotation der TM2 von *NpHtrII* unter Lichtanregung von *NpSRII* stattfindet ([Wegener et al. 2001] und [Moukhametzianov et al. 2006]). Die Rotation in der transmembranen Region des Proteins kann zu einer Beeinflussung der HAMP Helizes führen. Die Umdrehung kann das Gleichgewicht zwischen den beiden HAMP Konformationen in Richtung der Ein- oder Aus-Zustände ändern, so dass eine Signalübertragung hervorgerufen wird. Die Beeinflussung der Dynamik der HAMP Domäne könnte ein wirksames Mittel sein, die gesamte Transducer Signalisierung zu modulieren. Dies würde zu leichten Veränderungen in der Wechselwirkung zwischen den Dimer in Chemorezeptor Trimeren und auch in der Cluster-Struktur für die Chemo- und Photorezeptoren führen (Khursigara et al., 2008).

4.2 Aufbau des Rezeptor/Transducer-Komplexes

Zur Charakterisierung des *NpHtrII* wurden Gelfiltrationsanalysen durchgeführt und die Anwesenheit von verschiedenen oligomeren Spezies nachgewiesen. Es ist deutlich, dass der Transducer nicht nur in monomerer Form vorliegt, sondern auch eine hohe Bereitschaft zur Oligomerisierung zeigt. Sogar die dimere Form, die aus einem coiled coil Bündel besteht, wird nur zu ca. 20% gebildet. Stattdessen formt der Transducer eher höhere, oligomere Spezies, wie Trimere von Dimeren und auch größere Oligomere. Insgesamt ist eine klare Präferenz zur Ausbildung von Trimere von Dimeren zu erkennen, die laut Untersuchungen an den Chemorezeptoren eine funktionelle Einheit darstellen (Francis et al., 2004; Kim et al., 1999). Zusätzlich wird durch eine weitere Beobachtung deutlich, dass die Oligomerisierung des Transducers eine Zeitabhängigkeit aufweist: es erhöht sich die Aggregat-Bildung nach einer längeren Inkubationszeit. Ein Grund für diese Oligomerisierung könnte in unspezifischen Bindungen begründet liegen. Die sehr langen zytoplasmatischen coiled coil Bündel könnten miteinander in unspezifischen Kontakt treten. Jedoch ist eine Clusterbildung der Transducer auf Grund von spezifischen Interaktionen an der Signal-Domäne auch möglich.

Anders als der Transducer *NpHtrII*, zeigt das *NpSRII* nur eine einzige Spezies in der Gelfiltrationsanalyse mit dem apparente Molekulargewicht von 110 kDa. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit der Größe eines Dimers in einer DDM Mizelle.

Die Bindung des Transducer an das *NpSRII* konnte durch Phototzyklus- und ITC-Messungen ([Hippler-Mreyen et al., 2003] und [Mennes et al., 2006]) nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung des Komplexes durch Gelfiltrationsexperimente beobachtet. Der *NpSRII/NpHtrII* Komplex wurde in der Gelfiltrationsanalyse mit einem apparenten Molekulargewicht von 620 kDa beobachtet. Der isolierte Rezeptor-Transducer Komplex ist bei 4°C bzw. 20°C mehre Tage stabil und homogen. Es gibt einen Hinweis für eine Clusterbildung des Komplexes.

Durch eine weitere Beobachtung wird deutlich, dass die Bildung des Komplexes sowohl eine Zeitabhängigkeit und als auch eine Temperaturabhängigkeit aufweist. Die Ausbeute an Komplex erhöht sich nach einer längeren Inkubationszeit und/oder einer höheren Temperatur.

Phospholipiddoppelschicht-Nanodisks bilden eine vielversprechende Modellmembran für die Studie von Membranproteinen unter nativen Bedingungen. Nanodisks bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, welche von einem Proteinmantel von definierter Größe umgeben ist (Bayburt et al., 2002). Einige verschiedene Membranproteine konnten schon in Nanodisks

eingelagert werden und sind weiterhin für funktionelle und strukturelle Untersuchungen verwendet worden. Darunter auch das 7-transmembrane Protein Rhodopsin (Rind), das Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* und die *E.coli* Chemotaxisproteine Tar und Tsr. Über die bakteriellen Chemorezeptoren ist bekannt, dass die Signaltransduktion nur nach Zusammenlagerung zu Trimere von Dimeren stattfinden kann. Da das *NpHtrII* eine Strukturhomologie zu den Chemorezeptoren aufweist, soll die Gültigkeit dieser Theorie auch für den Transducer geprüft werden. In dieser Arbeit wurde der *NpSRII/NpHtrII* Komplex erfolgreich in Nanodisks eingelagert. Die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie zeigen, dass eine Nanodiskformation, sowie der Einbau von Komplex Trimeren funktioniert. Die Funktionalität wurde durch Photozyklus Messungen überprüft.

Wird sowohl das *NpSRII* als ungebundenes Protein und als auch *NpSRII* im Komplex mit dem Transducer betrachtet, lässt sich der gleiche Effekt auf den Photozyklus beobachten. Die Rekonstitution in Nanodisks oder in Lipiden bewirkt eine Verlangsamung des Photozykluses im Gegensatz zum solubilisierten Zustand. Dies zeigt, dass die Photorezeptoren sowohl als ungebundenes Protein als auch im Komplex mit dem HtrII im nativen Zustand vorliegen und in Bezug auf die Photozyklen voll aktiv sind.

Aus den Ergebnissen der Gelfiltrations- und EM- Experimente kann geschlossen werden, dass die Formung der Transducer-, als auch der Rezeptor- Transducer-Cluster eine intrinsische Eigenschaft dieser Proteine ist. Da sie eine große Homologie zu den Chemotaxis-Rezeptoren aufweisen, ist diese Eigenschaft vermutlich auf die Primärsequenz und Sekundärstruktur zurückzuführen.

5 Zusammenfassung

Die Negative Phototaxis in dem Haloarchaeum *Natronomonas pharaonis* wird von einem Transducer Protein (*NpHtrII*) vermittelt. *NpHtrII* zeigt eine strukturelle Analogie und funktionelle Ähnlichkeit mit Chemorezeptoren. Anders als bei Chemorezeptoren wird das Signal nicht von einer periplasmatischen Sensordomäne, sondern durch ein verwandtes Sensorprotein, das sensorische Rhodopsin II (*NpSRII*), aufgenommen. SRII gehört zu der Familie der sieben-Transmembran-Helizes Proteine und überträgt ein Lichtsignal durch einen noch unbekanntem Mechanismus auf das Transducer-Molekül. Der Transducer leitet dieses Signal weiter und aktiviert eine Signaltransduktionskaskade.

In dieser Arbeit wurden insbesondere die Struktur und die Eigenschaften des Linkerbereichs (HAMP) des Transducers und die Bindung des Transducers zum Rezeptor unter Verwendung von CD- und NMR-Spektroskopie sowie Gel-Chromatographie untersucht, um Anhaltspunkte für den Mechanismus der ersten Schritte in der Signaltransduktion zu finden. Dazu wurden verschiedene Konstrukte aus dem Transducer *NpHtrII*, die eine oder zwei HAMP Domänen enthalten, erfolgreich heterolog im Modellorganismus *E. coli* exprimiert und anschließend mit Hilfe eines Affinitäts-Tags aufgereinigt. Mit Hilfe unterschiedlicher Methoden wie CD-Spektroskopie, NMR- und ESR-Untersuchungen ist deutlich geworden, dass die Konformation der HAMP Domäne von äußeren Bedingungen abhängig ist. Die Struktur ist abhängig von Ionenstärke und Temperatur. Ein Zwei-Zustands-Gleichgewicht zwischen einer sehr dynamischen (dHAMP) und einer kompakteren (cHAMP) Konformation wurde gefunden, welches durch Änderungen der Temperatur oder Salzkonzentration verschoben werden kann. Die strukturellen Eigenschaften der cHAMP stehen im Einklang mit dem vier Helix-Bündel NMR-Modell der HAMP Domäne aus *Archaeoglobus fulgidus*.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die Bildung des *NpSRII/NpHtrII*-Komplexes mit Gelfiltrationsanalysen beobachtet. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Transducer sowohl Dimere als auch höher Oligomere ausbildet. Der Transducer *NpHtrII* bildet mit *NpSRII* einen stabilen, homogenen Komplex mit dem apparenten Molekulargewicht 620 kDa. Daraus lässt sich ein Trimer von Dimer berechnen, welches die funktionelle Einheit bei den Chemorezeptoren darstellt. Durch die Einlagerung in Nanodisks erhält man lösliche Membranproteine in einer Phospholipid Doppelschicht, die durch einen Proteinhülle von definierter Größe und Form umrandet wird. Aufnahmen des in Nanodisks eingelagerten *NpSRII/NpHtrII* Komplex wurde mittels Elektronenmikroskopie erstellt und zeigen ebenfalls die Hinweise auf Trimere von Dimeren.

Der initiiertende Teil der Signaltransduktion ist die Rotation der Transducerhelix TM2 durch den aktivierten Rezeptor. Es gibt zwei Modelle der TM2-Aktivierung: Die ESR-Untersuchungen (Wegener *et al.*, 2001) zeigen eine Aktivierung der TM2-Helix über die Auswärtsbewegung der Helix F, wohin gegen Röntgenstrukturuntersuchungen (Moukhametzianov *et al.*, 2006) eine Rotation der Helix G nahe legen. In dieser Arbeit wurde die Festkörper-NMR Spektroskopie verwendet, um die Struktur und Dynamik des sensorischen Rhodopsin / Transducer (SRII/HtrII)-Komplex von *N. pharaonis* in einer natürlichen Membrenumgebung zu studieren. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen des Grundzustands mit denen des aktivierten Zustands ist im Einklang mit einer Konformationsänderung in Helix F, wie sie auch aus EPR-Daten abgeleitet wurde.

6 Literaturverzeichnis

- Altenbach, C., Marti, T., Khorana, H. G. und Hubbell, W. L. (1990): Transmembrane Protein Structure: Spin Labeling of Bacteriorhodopsin Mutants. *Science* **248**, 1088-1092.
- Appleman, J. A., und Stewart, V. (2003): Mutational Analysis of a Conserved Signal-Transducing Element: the HAMP Linker of the *Escherichia coli* Nitrate Sensor NarX. *J. Bacteriol.* **185**, 89-97.
- Aravind, L. und Ponting, C. P. (1999): The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins FEMS Microbiol. Lett. **176**, 111-116.
- Brünger, A. T. (1998): Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D* **54**, 905-921.
- Borrok, M. J., Kolonko, E. M. und Kiessling, L. L. (2008): Chemical probes of bacterial signal transduction reveal that repellents stabilize and attractants destabilize the chemoreceptor array. *ACS Chem. Biol* **3**, 101-109.
- Bordignon, E., Klare, J. P., Doebber, M., Wegener, A. A., Martell, S., Engelhard, M. und Steinhoff, H.-J. (2005): Structural Analysis of a HAMP Domain. The linker region of the phototransducer in complex with sensory rhodopsin II. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 38767-38775.
- Burrows, G. G., Newcomer, M. E. und Hazelbauer, G. L. (1989): Purification of receptor protein Trg by exploiting a property common to chemotactic transducers of *E. coli*. *JBC* **264**, 29, 17309-17315.
- Budyak, I. L., Pipich, V., Mironova, O. S., Schlesinger, R., Zaccai, G., und Klein-Seetharaman, J. (2006) : Shape and oligomerization state of the cytoplasmic domain of the phototaxis transducer II from *Natronobacterium pharaonis*. *PNAS* **103**,15428-15433.
- Butler, S. L. und Falke, J. J. (1998): Cysteine and disulfide scanning reveals two amphiphilic Helices in the linker region of the aspartate chemoreceptor. *Biochemistry* **37**, 10746-10756.
- Bowie, J. U., Kaplan, N., Hess, J. F.,& Simon, M. I. (1995) The three-dimensional structure of the aspartate receptor from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica Section D***51**, 145-154.
- Chen, X. und 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.

- Etzkorn, M., Martell, S., Andronesi, OC., Seidel, K., Engelhard, M. und Baldus, M. (2007): Secondary Structure, Dynamics, and Topology of a Seven-Helix Receptor in Native Membranes, Studied by Solid-State NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Intl. Ed.* **46**, 459-462.
- Ulrich, E. L., Akutsu, H., Doreleijers, J.F., Harano, Y., Ioannidis, Y.E., Lin, J., Livny, M., Mading, S., Maziuk, D., Miller, Z., Nakatani, E., Schulte, C.F., Tolmie, D. E., Kent, W. R., Yao, H., Markley, J. L. (2008): BioMagResBank. *Nucleic Acids Res* **36**, 402-408.
- Falb, M., Pfeiffer F., Palm, P., Rodewald, K., Kickmann, V., Tittor, J. und Oesterhelt, D. (2005): Living with two extremes: conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis*. *Genome Research* **15**, 1336-1343.
- Francis, N. R., Wolanin, P. M., Stock, J. B., DeRosier, D. J., und Thomas, D. R. (2004): Three dimensional structure and organization of a receptor/signaling complex. *PNAS USA* **101**, 17480-17485.
- Ferrando-May, E., Krah, M., Marwan, W. und Oesterhelt, D (1993): The methyl-accepting transducer protein HtrI is functionally associated with the photoreceptor sensory rhodopsin I in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *EMBO J.* **12**, 2999-3005.
- Fink, A. L. (2001): Molten Globule. Encyclopedia of Life Sciences. www.els.net
- Foster, David L.,(1985): Purification and characterization of the aspartate chemoreceptor. *Journal of Biological Chemistry* **260**. 11706-11710.
- Gordeliy, V. I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R., Buldt, G., Savopol, T., Scheidig, A. J., Klare, J. P., und Engelhard, M (2002): Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex. *Nature* **419**, 484-487.
- Hayashi, K., Sudo, Y., Jee, J., Mishima, M., Hara, H., Kamo, N. und Kojima, C. (2007): Structural analysis of phototactic transducer protein HtrII linker region from *Natronomonas pharaonis*. *Biochemistry* **46**, 14380-14390.
- Hazelbauer, G. L., Falke, J. J., and Parkinson, J. S. (2008): Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 9-19.
- Hargrave, P. A., (2001): Rhodopsin. Eecyclopedia of Life Sciences. Published Online 12 DEC. 2001, www.els.net.
- Hippler-Mreyen, S., Klare J.P., Wegener, A.A., Seidel, R., Herrmann, C., Schmies, G., Nagel, G., Bamberg, E., und 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.

- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. und Pease, L. R. (1989): Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Hohenfeld, I.P., Wegener, A.A. und Engelhard, M. (1999): Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in Escherichia coli. *FEBS Lett.* **442**, 198-202.
- Holterhues, J. (2009): Analyse der Signalweiterleitung im spinmarkierten sensorischen Rhodopsin/Transducer-Komplex mittels zeitaufgelöster ESR-Spektroskopie. Ref Type: Dissertation. 1-215.
- Hou, S., Brooun, A., Yu, H.S., Freitas, T. und Alam, M. (1998) Sensory rhodopsin II transducer HtrII is also responsible for serine chemotaxis in the archaeon *halobacterium salinarum*. *J.Bacteriol.* **180**, 1600-1602.
- Hu, J. G., Sun, B. Q., Bizounok, M., Hatcher, M. E., Lansing J. C., Raap J., Verdegem P. J., Lugtenburg J., Griffin R. G., und Herzfeld J. (1998). Early and late m intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle: a solid-state nmr study. *Biochemistry*, **37**: 8088–8096.
- Jin, T. und Inouye, M. (1994). Mutational Analysis of the Cytoplasmic Linker Region of Taz1-1, a Tar-Envz Chimeric Receptor in Escherichia-Coli. *Journal of Molecular Biology* **244**, 477-481.
- Kishii, R., Falzon, L., Yoshida, T., Kobayashi, H., und Inouye, M. (2007): Structural and functional studies of the HAMP domain of EnvZ, an osmosensing transmembrane histidine kinase in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **282**, 26401-26408.
- Kim, S.-H. (1994): "Frozen" dynamic dimer model for transmembrane signaling in bacterial chemotaxis receptors. *Protein Sci.* **3**, 159-165.
- Kim, K. K., Yokota, H. und Kim, S.H. (1999): Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature* **400**, 787-792.
- Kim, S.-H., Wang, W. und Kim, K. K. (2002): Dynamic and clustering model of bacterial chemotaxis receptors: Structural basis for signalling and high sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11611-11615.
- Klare, J. P., Schmies, G., Chizhov, I., Shimono, K., Kamo, N. und Engelhard, M. (2002): Probing the Proton Channel and the Retinal Binding Site of Natronobacterium pharaonis Sensory Rhodopsin II. *Biophys. J.* **82**, 2156-2164.
- Klare, J.P., Gordeliy, V.I., Labahn, J., Buldt, G., Steinhoff, H.J., und Engelhard M. (2004): The archaeal sensory rhodopsin II/transducer complex: a model for transmembrane signal transfer, *FEBS Lett.* **564**, 219–224.

- Klare, J.P., Chizhov, I. und Engelhard, M. (2008): Microbial rhodopsins: scaffolds for ion pumps, channels, and sensors, *Results Probl. Cell Differ.* **45**, 73–122.
- Klare, J.P.(2003): Strukturelle und funktionelle Untersuchungen des photophoben Rezeptor /Transducer-Komplexes aus *Natronobacterium pharaonis*. 1-137. Universität Dortmund. Ref Type: Dissertation.
- Koretke, K. K., Lupas, A. N., Warren, P.V., Rosenberg, M., und Brown, J. R. (2000): Evolution of two-component signal transduction. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 1956-1970.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., und Lopez, R. (2007): Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947–2948.
- Levit, M. N., Grebe, T. W. und Stock, J. B. (2002): Organization of the Receptor-Kinase Signaling Array That Regulates Escherichia coli Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **277**, 36748-36754.
- Luo, P. und Baldwin, R.L. (1997): Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry* **36**, 8413-8421.
- Luecke, H., Schobert, B., Lanyi, J.K., Spudich, E.N. und Spudich, J.L. (2001): Crystal structure of sensory rhodopsin II at 2.4 angstroms: insights into color tuning and transducer interaction, *Science* **293**, 1499–1503.
- Martell, S. (2005): Untersuchungen zur Signaltransduktion in der archaebakteriellen Phototaxis mittels ortsspezifisch spinmarkierten Rezeptor-Proteinen. Ref. Type: Diplomarbeit.
- Martell, S. (2008): Untersuchungen der Struktur und Funktion von Sieben-Helix-Membranrezeptoren. Ref. Type: Dissertation
- Mennes, N. (2006): Strukturelle und funktionelle Untersuchungen des Transducer HtrII aus *Natronomonas pharaonis* und von HtrII/Tar-Chimären. Ref. Type: Dissertation
- Metz, G., Siebert, F. und Engelhard, M. (1992): Asp85 is the only internal aspartic acid that gets protonated in the m intermediate and the purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin. a solid-state ¹³C cp-mas nmr investigation. *FEBS Letters* **303**, 237–241.
- Metz, G., Siebert, F. und Engelhard, M. (1992): High-resolution solid state ¹³C NMR of Bacteriorhodopsin: characterization of [4-¹³C] asp resonances. *Biochemistry* **31**, 455–462.
- Milburn, M. V., Prive, G. G., Milligan, D. L., Scott, W. G., Yeh, J. I., Jancirak, J., Koshland, D. E., und Kim, S. -H. (1991) Three-Dimensional Structures of the Ligand-Binding Domain of the Bacterial Aspartate Receptor With and Without a Ligand. *Science* **254**, 1342-1347.

- Moukhametzianov, R., Klare, J. P., Efremov, R., Baeken, C., Göppner, A., Labahn, J., Engelhard, M., Büldt, G. und Gordeliy, V.I. (2006): Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer. *Nature* **440**, 115-119.
- Nara, T., Kawagishi, I., Nishiyama, S., Homma, M., und Imae, Y. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 17932–17936.
- Nath, A., Atkins, W. M., und Sligar, S. G. (2007): Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. *Biochemistry* **46**, 2059-2069.
- Randy, W. L. und Yang, J. (1999): Spectroscopic Characterization of Two Soluble Transducers from the Archaeon *Halobacterium salinarum*. *J. Chem* **18**, 269-275.
- Robinson, J. L., Pyzyrna, B., Atrasz, R. G., Henderson, C. A., Morrill, K. L., Burd, A. M., DeSoucy, E., Fogleman, R. E., Naylor, J. B., Steele, S. M., Elliott, D. R., Leyva, K. J. und Shand, R. F. (2005): *J. Bacteriol* **187**, 923–929.
- Rodriguez, V., Vreeland, R. H. und Hochstein, L. I. (1993): in *The Biology of Halophilic Bacteria* (eds) pp. 1–23, *CRC Press*, Boca Raton, FL.
- Salman, H. und Libchaber, A. (2007): A concentration-dependent switch in the bacterial response to temperature. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1098–1100.
- Sasaki, J., Nara, T., Spudich, E. N. und Spudich, J. L. (2007): Constitutive activity in chimeras and deletions localize sensory rhodopsin II/HtrII signal relay to the membrane-inserted domain. *Mol. Microbiol.* **66**, 1321–1330.
- Schiffer, E. (2005): Domain specific isotope labelling of membrane Proteins NMR an FTIR spectroscopy of SRII/HtrII complexes from *Natronbacterium pharaonis*. Universität Dortmund. Ref Type: Dissertation, 1-163.
- Seidel, R. P., Scharf, B. E., Gautel, M., Kleine, K., Oesterhelt, D. und Engelhard, M. (1995): The primary structure of sensory rhodopsin II: A member of an additional retinal protein subgroup is coexpressed with its transducer, the halobacterial transducer of rhodopsin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3036-3040.
- Sonnichsen, F. D., Van Eyk, J. E., Hodges, R. S. und Sykes, B. D. (1992): Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry* **31**, 8790-8798.
- Stoeckenius, W., Wolff, E. K. und Hess, B. (1988): A rapid population method for action spectra applied to *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **170**, 2790-2795.

- Sudo, Y., Iwamoto, M., Shimono, K. und Kamo, N. (2001a): Pharaonis phoborhodopsin binds to its cognate truncated transducer even in the presence of a detergent with a 1:1 stoichiometry. *Photochemistry and Photobiology* **74**, 489-494.
- Sudo, Y., Iwamoto, M., Shimono, K., Sumi, M. und Kamo, N. (2001b): Photo-Induced Proton Transport of Pharaonis Phoborhodopsin (Sensory Rhodopsin II) Is Ceased by Association with the Transducer. *Biophys. J.* **80**, 916-922.
- 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
- Boldog, T., Grimme, S., Li, M., Sligar, S., und Hazelbauer, G. L. (2006): Nanodiscs separate chemoreceptor oligomeric states and reveal their signaling properties. *PNAS* **103**, 11509-11514
- Ulrich, E. L., Akutsu, H., Doreleijers, J., Harano, Y., Ioannidis, Y., Lin, J., Livny, M., Mading, S., Maziuk, D., Miller, Z., Nakatani, E., Schulte, C., Tolmie, D., Wenger, R., Yao, H. und Markley, J. (2008): Biomagresbank. *Nucleic Acids Research*, **36**: D402–D408,
- Wegener, A. A. (2000): Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaebakteriellen Lichtrezeptors pSRII mit seinem Transducerprotein pHtrII. Dissertation, Universität Dortmund. Ref Type: Dissertation.
- Wegener, A. A., Klare, J. P., Engelhard, M. und Steinhoff, H. J. (2001): Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis. *EMBO Journal*, **20**, 5312–5319.
- Winter, R. und Noll, F. (1998): Methoden der Biophysikalischen Chemie. Teubner, Ref Type: Lehrbücher. ISBN 3-519-03518-9
- Yao, V. J. und Spudich, J. L. (1992): Primary structure of an archaebacterial transducer, a methyl-accepting protein associated with sensory rhodopsin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11915-11919.
- Zhang, W., Brooun, A., McCandless, J., Banda, P. und Alam, M. (1996): Signal transduction in the Archaeon *Halobacterium salinarium* is processed through three subfamilies of 13 soluble and membrane-bound transducer proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4649-4654.
- Zhu, Y. und Inouye, M. (2004): The HAMP linker in histidine kinase dimeric receptors is critical for symmetric transmembrane signal transduction. *J. Biol Chem.* **279**, 48152-48158.

7 Anhang

7.1 Proteinsequenzen

7.1.1 NpHtrII84-230-His

10 20 30 40 50 60
MDTAASLSTL AAKASRMGDG DLDVELETRR EDEIGDLYAA FDEMQRQSVRT SLEDAKNARE
70 80 90 100 110 120
DAEQAQKRAE EINTELQAEA ERFGEVMDRC ADGDFTRQLD AETDNEAMQS IEGSFNEMMD
130 140 150
GIEALVGRIE RFADAVSEDA EAVRANAENS HHHHHHHH

Number of amino acids: 157

Molecular weight: 17525.8

Theoretical pI: 4.42

Formula: C₇₂₄H₁₁₄₁N₂₂₅O₂₆₇S₈

7.1.2 NpHtrII1-230-His

10 20 30 40 50 60
MALNVSRLLL PSRVRHSYTG KMGAVFIFVG ALTVLFGAIA YGEVTAATAAT GDAAAVQEAA
70 80 90 100 110 120
VSAILGLIIL LGINLGLVAA TLGGDTAASL STLAAKASRM GDGDLVLE TRREDEIGDL
130 140 150 160 170 180
YAAFDEMQRQSVRTSLEDAKN AREDAEQAQK RAEINTELQ AEAERFGEVM DRCADGDFTR
190 200 210 220 230 240
RLDAETDNEA MQSIEGSFNE MMDGIEALVG RIERFADAVS EDAEAVRANA ENSHHHHHHH

Number of amino acids: 240

Molecular weight: 25717.5

Theoretical pI: 4.56

Formula: C₁₁₀₀H₁₇₅₉N₃₂₃O₃₇₀S₉

7.1.3 NpHtrII84-136-His

10 20 30 40 50 60
MDTAASLSTL AAKASRMGDG DLDVELETRR EDEIGDLYAA FDEMQRQSVRT SLENSHHHHH
HH

Number of amino acids: 62

Molecular weight: 6999.5

Theoretical pI: 5.28

Formula: C₂₉₁H₄₅₆N₉₄O₁₀₂S₃

7.1.4 NpHtrII137-230-His

10 20 30 40 50 60
 MDAKNAREDA EQAQKRAEEI NTELQAEAER FGEVMDRCAD GDF'TQRLDAE TDNEAMQSI E
 70 80 90 100
 GSFNEMMDGI EALVGRIERF ADAVSEDAEA VRANAENSHH HHHHH

Number of amino acids: 105**Molecular weight: 11836.6****Theoretical pI: 4.53****Formula: C₄₈₇H₇₅₆N₁₅₆O₁₇₈S₆****7.1.5 NpSRII-His**

10 20 30 40 50 60
 MVGLTTLFWL GAIGMLVGTL AFAWAGR DAG SGERRYVYVTL VGISGIAAVA YAVMALGVGW
 70 80 90 100 110 120
 VPVAERTV FV PRYIDWILTT PLIVYFLGLL AGLDSREFGI VITLNTVVML AGFAGAMVPG
 130 140 150 160 170 180
 IERYALFGMG AVAFIGLVYY LVGPMTESAS QRSSGIKSLY VRLRNLTVV L WAIYPIWLL
 190 200 210 220 230 240
 GPPGVALLTP TVDVALIVYL DLVTKVGF GF IALDAAATLR AEHGESLAGV DTDTPA VADE

NSHHHHHHHH

Number of amino acids: 249**Molecular weight: 26661.2****Theoretical pI: 6.03****Formula: C₁₂₄₄H₁₉₂₂N₃₁₀O₃₂₆S₇****7.1.6 NpHtrII-His**

10 20 30 40 50 60
 MALNVSRLLL PSRVRHSYTG KMGAVFIFVG ALTVLFGAIA YGEV TAAAAT GDAAAVQEAA
 70 80 90 100 110 120
 VSAILGLIIL LGINLGLVAA TLGGDTAASL STLAAKASRM GDGDLDVELE TRREDEIGDL
 130 140 150 160 170 180
 YAAFDEMRQS VRTSLDAKNA REDAEQAQKR AEEINTELQA EAERFGEVMD RCADGDF'TQR
 190 200 210 220 230 240
 LDAETDNEAM QSIEGSFNEM MDGIEALVGR IERFADAVSE DAEAVRANAE SVMEASED VN
 250 260 270 280 290 300
 RAVQNISDAA GDQTETVQQI ALEMDDVSAT TEEVAASADD IAKTARQAAE TGEAGRETAE
 310 320 330 340 350 360
 TAITEMNEVE SRTEQAVASM EELNEDVREI GEVSEMIADI AEQTNILALN ASIEAARADG


```

      370          380          390          400          410          420
NSEGFAVVAD EVKALAEETK AATEEIDDLI GTVQDRQTQT VDDIRETSDQ VSEGVEVVED

      430          440          450          460          470          480
TVDALERIVD SVERTNDGIQ EINQSTDAQA DAAQKATTMV EDMAATSEQT ASDAETAET

      490          500          510          520          530          540
TETQAESVKE VFDLIDGLSE QADSLSETLS RTDTEEASAA DLDDQPTLAA GDDENSHHHH

```

HHH

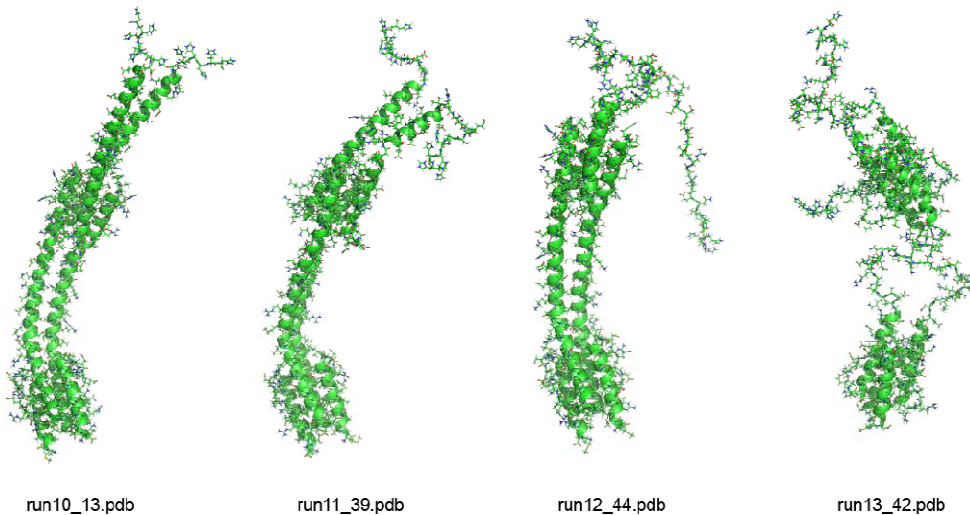
Number of amino acids: 539

Molecular weight: 57439.1

Theoretical pI: 4.02

Formula: C2400H3871N687O911S16

7.2 Modelle der Zwei HAMP-Domäne



Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Engelhard für die interessante Aufgabenstellung und die großzügige Betreuung meiner Umsetzung dieser Aufgaben. Herrn Prof. Dr. R. S. Goody für die Aufnahme in seine Abteilung am MPI in Dortmund.

Ich möchte Prof. Dr. R. Winter für die freundliche Übernahme des Korreferates danken.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Prof. Dr. M. Baldus und seinen Mitarbeitern Karsten Seidel und Manuel Etzkorn für die Feststoff-NMR-Messungen, Herrn Prof. Dr. H.-J. Steinhoff und der kompletten Arbeitsgruppe und der Universität Osnabrück für ESR-Spektren-Messung, Herrn Dr. Matthias Geyer und Bernhard Griewel für die NMR-Messungen, Dr. Stefan Rauser und Dr. Elmar Behrmann für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Dr. Igor Chizhov für Blitzlicht-Photolyse-Messung.

Besonderer Dank gilt auch Prof. Oliver Ernst und Dr. Takefumi Morizumi für die die Einführung der Nanodiskformation.

Herrn Dr. Ralf Seidel sei gedankt für die Unterstützung bei molekularbiologischen Arbeiten.

Ein großes Dankeschön sage ich Ines Heinrich und Marc Dittmann für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herzlichen Dank an Swetlana Martell, Joung Jun Kim für die vielen Hilfestellungen im Labor und die Diskussionsbereitschaft.

An alle Kolleginnen und Kollegen, insbesondere Jörg Sauermann, Nadine Mennes, Miria Schumacher, Sunanda Lahiri, und Annika Göppner, geht mein ausdrücklicher Dank für die freundschaftliche Hilfe.

Großer Dank natürlich auch an alle anderen (inkl. ehemaligen) „Engelhard’s“ für das gute Arbeitsklima in unserem Büro.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich für die unermüdliche Unterstützung während dieser Jahre danken. Sie haben mich in allen Umbrüchen und Veränderungen gestärkt und mir vieles möglich gemacht, das ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Mann Xiang Fu danke ich herzlich für das Verständnis während meines gesamten Studiums.