

# **Untersuchungen zur Signalweiterleitung in Chemo- und Photorezeptoren**

## **Dissertation**

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

Angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund

vorgelegt von

**Ines Claudia Kube**

aus Herne

Dortmund, im September 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2008 bis Juni 2012 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.

Erstgutachter : Prof. Dr. M. Engelhard

Zweitgutachter : Prof. Dr. S. Brakmann

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

# **Meiner Familie**

**„Freude am Schauen und Begreifen  
ist die schönste Gabe der Natur...“**

**Albert Einstein (1879-1955)**

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	v
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Materialien.....</b>	<b>12</b>
2.1 Chemikalien .....	12
2.2 Enzyme .....	12
2.3 Lipide .....	12
2.4 Fluorophore und Spinsonden .....	13
2.5 Molekularbiologische Kits .....	13
2.6 Größenstandards .....	13
2.7 Säulen und Chromatographiematerial .....	14
2.8 Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	14
2.9 Instrumentation .....	15
2.10 Bakterienstämme .....	16
2.11 Plasmide .....	16
2.12 Oligonukleotide .....	16
<b>3 Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden .....	19
3.1.1 Zellanzucht und Lagerung.....	19
3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA .....	19
3.1.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	19
3.1.4 Analyse und Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	20
3.1.5 Restriktion von DNA.....	20
3.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	21
3.1.7 Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> Zellen.....	21
3.1.8 Ligation von DNA .....	21
3.1.9 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen.....	22
3.1.10 Sequenzierung von DNA.....	22
3.2 Proteinchemische Methoden .....	23
3.2.1. Proteinexpression in <i>E.coli</i> .....	23
3.2.2 Zellaufschluss .....	23
3.2.3 Aufreinigung über Affinitätschromatographie .....	24
3.2.3.1 <i>Ni-NTA Affinitätschromatographie über einen Polyhistidin-Anker .....</i>	<i>24</i>
3.2.3.2 <i>Strep-Tactin® Affinitätschromatographie über einen StrepII-Peptid-Anker .....</i>	<i>25</i>
3.2.3.3 <i>Affinitätschromatographie an Chitin Material über eine Chitin-Bindedomäne .....</i>	<i>25</i>
3.2.4 Spinmarkierung von Proteinen über Cysteine.....	26

---

3.2.5 Rekonstitution von Proteinen in Lipide .....	26
3.2.6 Isolierung polarer Lipide aus <i>H. salinarum</i> und <i>N. pharaonis</i> .....	27
3.2.7 Präparation von Liposomen .....	27
3.2.8 Methylierung des Aspartatrezeptors .....	28
3.2.9 Fluoreszenzmarkierungen von Proteinen .....	28
3.2.9.1 Markierung von Cysteinen .....	28
3.2.9.2 Markierung des N-Terminus .....	29
3.2.10 Cyanylierung von Proteinen über Cysteine .....	29
3.2.11 Proteolytischer Verdau durch Trypsin .....	29
3.3. Analytische Methoden .....	30
3.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	30
3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	30
3.3.3 Western-Transfer und Immunnachweis .....	31
3.3.4 <i>blue native</i> Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	32
3.3.5 Massenspektrometrie .....	32
3.4 Chemische Methoden .....	33
3.4.1 Cyanylierung .....	33
3.5 Biophysikalische Methoden .....	33
3.5.1 Optische mikroskalige Thermophorese (MST) .....	33
3.5.2 Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie (ESR) .....	35
3.5.3 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) .....	36
3.5.4 Circular-Dichroismus Spektroskopie .....	36
3.5.5 Festkörper NMR Spektroskopie (solid state NMR, ssNMR) .....	37
3.5.6 Fluoreszenzspektroskopie .....	37
3.5.7 Fluoreszenzanisotropie .....	37
3.5.8 Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) .....	38
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
4.1 Klonierung, Expression, Aufreinigung und Nachweis der Proteine .....	39
4.1.1 Klonierung des Aspartatrezeptors aus <i>E. coli</i> .....	39
4.1.2 Klonierung des Transducers aus <i>H. salinarum</i> .....	42
4.1.3 Aufreinigung des Aspartatrezeptors, Transducers und der sensorischen Proteine .....	42
4.1.4 Nachweis des Aspartatrezeptors, Transducers und der sensorischen Proteine .....	43
4.2 Charakterisierung der Chemorezeptoren .....	46
4.2.1 Untersuchungen zur Struktur des Aspartatrezeptors .....	46
4.2.2 Charakterisierung von Stabilität und Oligomerisierung des Aspartatrezeptors .....	48

4.2.2.1 Analyse mittels analytischer Gelfiltration .....	48
4.2.2.2 Analyse mittels dynamischer Lichtstreuung .....	54
4.2.2.3 Analyse mittels blue native PAGE .....	54
4.2.2.4 Analyse mittels Fluoreszenzanisotropie .....	56
4.2.2.5 Analyse mittels Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) .....	59
4.3 Signaltransfer in Chemorezeptoren .....	63
4.3.1 FRET Messung in Liposomen .....	63
4.3.2 ESR-Messungen von Tar .....	66
4.3.3 Methylierungsexperimente zum Nachweis des Crosstalks .....	70
4.3.3.1 Methylierung in Detergenzien und Liposomen .....	70
4.3.3.2 Aufreinigung des methylierten Proteins .....	71
4.3.3.3 Nachweis der Methylierungsposition .....	72
4.3.3.4 Einfluss des Liganden Aspartat .....	73
4.3.3.5 Methylierung von Tar $\Delta$ .....	75
4.3.4 ESR Messungen von SRII/HsHtrII398 .....	77
4.3.5 Thermophoresemessungen .....	79
4.3.5.1 Tar und Aspartat .....	79
4.3.5.2 HsHtrII und Serin .....	81
4.3.5.3 HsHtrII398 und Serin .....	83
4.4 Signaltransfer in Photorezeptoren .....	84
4.4.1 FTIR Messungen in NpSRII .....	84
4.4.1.1 FTIR Messungen Peptid .....	84
4.4.1.2 FTIR Messungen NpSRII .....	86
4.4.2 Festkörper NMR von NpSRII .....	87
4.4.2.1 Deuteriertes $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ NpSRII .....	88
4.4.2.2 $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ NpSRII in <i>E. coli</i> Zellen .....	90
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>94</b>
5.1 Oligomerisierung und Stabilität von Tar .....	94
5.2 Die Amplifikation und Signalweiterleitung in Chemo- und Photorezeptoren .....	96
5.2.1 Intermolekulare Signalweiterleitung in Tar .....	96
5.2.2 Signalweiterleitung im transmembranen/HAMP Domänengrenzbereich .....	101
5.2.3 Signalweiterleitung in der HAMP Domäne .....	102
5.3 Intramolekulare Signalweiterleitung in Tar, HsHtrII und NpSRII .....	103
5.3.1 Ligandenbindung in Tar und HsHtrII .....	103
5.3.2 Lichtaktivierung in NpSRII .....	104
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>107</b>

---

<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>118</b>
Proteinsequenzen.....	118
Danksagung.....	128
Lebenslauf .....	129



**Abkürzungsverzeichnis**

$A_x$	Absorption bei x nm
Aer	Aerotaxisrezeptor
AS	Amphipathische Sequenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Å	Ångstrom (0,1 nm)
<i>A. fulgidus</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
bp	Basenpaare
BR	Bakteriorhodopsin
CD	Circulardichroismus
CheA	Chemotaxisprotein A
CheB	Chemotaxisprotein B
CheR	Chemotaxisprotein R
CheW	Chemotaxisprotein W
CheY	Chemotaxisprotein Y
CheZ	Chemotaxisprotein Z
cpm	Photonen pro Minute
CV	Säulenvolumen
d	Tag
$D$	Diffusionskoeffizient
$D_T$	Thermodiffusionskoeffizient
Da	Dalton
DDM	<i>N</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
$\Delta$	Delta
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektronenspray-Ionisation
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
et al.	und andere

---

EtOH	Ethanol
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FTIR	Fourier-Transformation Infrarot
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HAMP	Domäne gefunden in <u>H</u> istidinkinasen, <u>A</u> denylylcyclasen, <u>M</u> ethyl-akzeptierende Proteine und <u>P</u> hosphatasen
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	Halorhodopsin
HRP	Meerrettich Peroxidase
<i>H. salinarum</i> ( <i>Hs</i> )	<i>Halobacterium salinarum</i>
Htr	halobakterieller Transducer
HtrII	halobakterieller Transducer des sensorischen Rhodopsins II
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
$k_D$	Komplexdissoziationskonstante
kDa	kilo-Dalton
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LBD	Ligandenbindedomäne
lg	dekadischer Logarithmus
LMW	Größenstandard für SDS-PAGE
$\lambda$	Wellenlänge, Lambda
M	Molarität in mol L <sup>-1</sup>
(m)M	(milli)molar
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MCP	Methyl-akzeptierendes Chemotaxisprotein
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MM	Minimalmedium
MS	Massenspektrometrie
MTS	(1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-methyl) methanthiosulfonat
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid

---

NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NaPi	Natriumphosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
NMR	Nuklear Magnet Resonanz
<i>N. pharaonis (Np)</i>	<i>Natronomonas pharaonis</i>
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei Wellenlänge x in nm
OG	<i>n</i> -Octyl-β-D-glucopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PML	Purpurchromophore Lipide
PSM	Größenstandard für Western Transfer
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S<sub>T</sub></i>	Soret-Koeffizient
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDSL	<i>site directed spin labeling</i>
sec	Sekunde
SL	Spinlabel
SRII	sensorisches Rhodopsin II
t	Zeit
T	Temperatur
Tar	Aspartatrezeptor
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TM	transmembrane Helix
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Trg	Galaktoserezeptor
Tsr	Serinrezeptor

---

U	Units
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
μ	mikro
VÄ	Volumen-Äquivalent
Vis	<i>visible</i> , sichtbar
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel
ZWP	Zellwaschpuffer

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

## 1 Einleitung

Reaktionen auf äußere Reize sind für Zellen essentiell. Proteine in der Zellmembran können auf einen Liganden (Chemotaxis), Veränderungen des Salzgehalts (Osmotaxis), Temperaturänderungen (Thermotaxis), Sauerstoffgehalt (Aerotaxis) oder auch auf Licht (Phototaxis) reagieren und Antworten auf den Stimulus in der Zelle einleiten. Hierzu werden komplexe Signalkaskaden durchlaufen (Li et al., 1988, Riddle et al., 1997, Taylor et al., 1999).

Ein schon früh untersuchter Photorezeptor ist das Rhodopsin, welches sich in der Retina des Auges von höheren Lebewesen befindet und essentiell für das Sehvermögen ist. Es gibt eine Vielzahl von strukturell verwandten Photorezeptoren, sogenannte mikrobielle Rhodopsine, die sich sowohl in Eukaryoten, Eubakterien und Archaeen finden lassen (Saranak und Foster, 2005, Stone und Dratz, 1977).

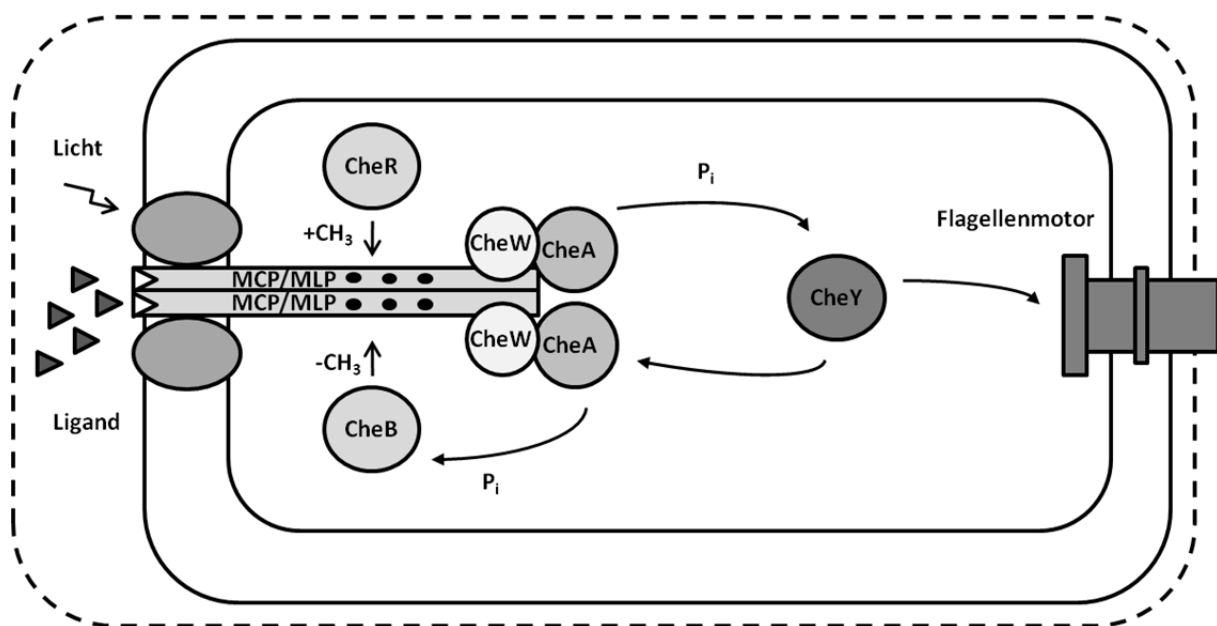
Strukturell bestehen alle Rhodopsine aus sieben transmembranen Helizes, die mit A bis G unterschieden werden. Die Helizes bilden eine Bindungstasche aus, in der als Chromophor ein Retinalmolekül, ein Derivat des Vitamins A, über eine Schiff'sche Base an einen konservierten Lysin Rest gebunden ist (zusammengefasst in Spudich et al., 2014).

In den letzten Jahrzehnten wurden mikrobielle Rhodopsine eingehend untersucht. Diese lassen sich in archaeelle Rhodopsine, eubakterielle Rhodopsine und eukaryotische Typ1 Rhodopsine aufteilen (Klare et al., 2007). Ein Beispiel für ein eubakterielles Rhodopsin ist Proteorhodopsin, welches erstmals in marinem Bakterioplankton identifiziert wurde (Beja et al., 2000). Unter eukaryotische Typ1 Rhodopsine fallen unter anderem Protonenpumpen und Kanäle in Algen, wie die in *Chlamydomonas reinhardtii* gefundenen Kanalrhodopsine 1 und 2 (Hegemann et al., 2001). Zu den archaeellen Rhodopsinen zählen Ionenpumpen wie Bakteriorhodopsin oder Halorhodopsin und sensorische Rezeptoren, wie SRI und SRII (Oesterhelt und Stockenius, 1971, Mukohata et al., 1980, Bogomolni und Spudich, 1982, Spudich et al., 1986).

Die lichtaktivierte Protonenpumpe Bakteriorhodopsin wurde schon Anfang 1970 in *Halobacterium salinarum* identifiziert, einem extremophilen Archaeon, welches bei hohen Salzkonzentrationen lebensfähig ist (Oesterhelt und Stockenius, 1971). Eine Cl<sup>-</sup>-Ionenpumpe, Halorhodopsin, konnte im gleichen Organismus gefunden werden und dient zum Transport von Cl<sup>-</sup>-Ionen gegen das Membranpotential zum Erhalt des osmotischen Gleichgewichts in der Zelle (Sugiyama und Mukohata, 1984). Die sensorischen Proteine SRI und SRII dienen der Zelle um optimalen Bedingungen für die Funktion der Ionenpumpen zu suchen oder der Bestrahlung mit UV Licht zu entgehen. Blaues Licht wird gemieden, um oxidativem Stress zu entgehen (SRII) und favorisiertes längerwelliges Licht kann sondiert werden (SRI). So gelingt es dem Archaeon optimale Bedingungen für die Funktion von BR,

den Aufbau eines Protonen-Gradienten, um ATP über die ATP-Synthase Maschinerie zur Energieversorgung unter anaeroben Bedingungen zu generieren, zu finden (Klare et al., 2007).

*H. salinarum* ist ein stäbchenförmiges Archaeon, das an den Polen mit Flagellen versehen ist (Hildebrandt, 1977). Durch Rotation der Flagellen im Uhrzeigersinn sind Halobakterien in der Lage gerichtet zu schwimmen und durch Umkehrung der Rotationsrichtung gegen den Uhrzeigersinn, bewegen sie sich entgegen der vorherigen Richtung (Alam und Oesterheld, 1984). *E. coli* hingegen schwimmt durch Rotation der Flagellenbündel gegen den Uhrzeigersinn in eine Richtung und beim Wechsel der Rotationsrichtung in den Uhrzeigersinn fallen die Flagellenbündel auseinander, was zu einer Taumelbewegung führt. Durch die Brown'sche Molekularbewegung erfährt das Bakterium beim Stoppen eine zufällige Richtungsänderung (Hazelbauer, 2012, Suzuki et al., 2010). Um sich gerichtet zu bewegen, kann die Schaltfrequenz zwischen den Rotationsrichtungen der Flagellen erhöht oder verringert werden. Dies wird über eine Zwei-Komponenten Signalkaskade innerhalb der Zelle reguliert (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Zwei-Komponenten Signalkaskade aus *E. coli* und *H. salinarum* (nach Klare et al., 2007).

Die Phosphorylierung der Histidin-Kinase CheA und des *response regulator* CheY sind die zentralen Schritte der Zwei-Komponenten Signalkaskade. Ein Methyl-akzeptierendes Chemotaxisprotein (MCP) oder ein MCP ähnliches Protein (MLP) bildet mit der Histidin-Kinase CheA und dem Adapterprotein CheW einen nicht kovalenten Komplex, so dass Ligandenbindung an das MCP bzw. Lichtaktivierung über ein MLP mit der Kinaseaktivität gekoppelt wird. Die Bindung eines Liganden führt zur Inhibition der Histidin-Kinase und zu

niedrigeren Level an Phospho-CheY. Bei einem negativen Signal (z. B. blaues Licht) erhöht sich die Autophosphorylierungsrate der Histidin-Kinase CheA und ein Phosphat kann auf die Aspartat-Kinase CheY übertragen werden. Phospho-CheY diffundiert zum Flagellenmotor und bewirkt dort eine Erhöhung der Umschaltfrequenz des Motors. Das Bakterium oder Archaeon kann sich so von dem negativen Stimulus entfernen. CheY hat eine intrinsische Autophosphataseaktivität, was die Dephosphorylierung von Phospho-CheY neben der Phosphatase (CheZ in *E. coli*) sichert, wenn die Kinaseaktivität von CheA durch ein positives Signal herabgesetzt wird. Wenig Phospho-CheY führt zu einer Verlängerung der Schaltungsfrequenz des Flagellenmotors, woraus eine längere Schwimmbewegung resultiert (Hazelbauer und Lai, 2010, Krell et al., 2010).

Durch den Mechanismus der Adaptation ist es dem Bakterium oder Archaeon möglich auch auf Veränderungen der Ligandenkonzentration und nicht nur auf absolute Werte zu reagieren. Dieser Vorgang wird durch die Methylesterase CheB und die Methyltransferase CheR reguliert. Die Aktivierung der Histidin-Kinase CheA führt zur Übertragung eines Phosphats auf das Protein CheB. Phospho-CheB deaminiert oder demethyliert das MCP bzw. MLP an bestimmten Glutamat/Glutamin Resten im cytoplasmatischen Bereich. Dies führt zu einer Herabsetzung der Autophosphorylierungsaktivität von CheA. Die Methyltransferase CheR ist konstitutiv aktiv und methyliert die Glutamate in dem cytoplasmatischen Bereich wieder, was zu einer erhöhten Aktivität der Histidin-Kinase CheA führt. So gelingt es dem Organismus auf geringe Konzentrationsunterschiede zu reagieren (Hazelbauer und Lai, 2010, Hazelbauer, 2012, Roberts et al., 2010).

Die Methyltransferase CheR katalysiert die Methylierung an spezifischen Glutamat Resten im cytoplasmatischen Bereich des MCPs oder MLPs. Die Reaktion verläuft mit S-Adenosylmethionin (SAM) als Co-Faktor, wobei die Methylgruppe von SAM in einer  $S_N2$  Reaktion auf die  $\gamma$ -Carboxylgruppe des Glutamats übertragen wird. Glutamine können von der Methylesterase/Deamidase CheB deaminiert werden. CheR bindet an eine C-terminale Pentapeptid Sequenz des MCPs, welche über einen flexiblen Arm mit dem cytoplasmatischen Teil des Chemotaxisproteins verbunden ist. CheR ist aus einer N-terminalen Substrat-Interaktionsdomäne, einer C-terminalen katalytischen Domäne und einer  $\beta$ -Faltblatt Unterdomäne aufgebaut. Die Bindung von CheR an das MCP erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen, wobei das Pentapeptid als vierter Strang zu dem  $\beta$ -Faltblatt der Unterdomäne zugefügt wird (Muppirala et al., 2009, Shiomi et al., 2000, Djordjevic und Stock, 1998).

Für die Chemorezeptoren Tar (Aspartatrezeptor) und Tsr (Serinrezeptor) aus *E. coli* wurde die Pentapeptid Sequenz zu NWETF bestimmt. In *Salmonella enterica* wurde für die Chemorezeptoren Tar und Tsr das gleiche Bindemotiv identifiziert, für den Rezeptor Tcp

hingegen wurde das Motiv NWESF gefunden (Muppirala et al., 2009). Den Chemotaxisproteinen Trg und Tap fehlt dieses Bindemotiv und die Methylierungseffizienz ist geringer, jedoch kann die Effizienz der Methylierung dieser Rezeptoren bei Überexpression von CheR gesteigert werden. Die Effektivität der Adaptation wird durch das Rekrutieren von CheR durch die Pentapeptid Sequenz erhöht. Die Pentapeptid Sequenz ist in nur ca. 10% der MCPs zu finden (Okumura et al., 1998, Djordjevic und Stock, 1998, Perez und Stock, 2007). In eubakteriellen Systemen wurde die Konsensussequenz zu (Glx-Glx-X-X-A-T/S) für die Methylierungsstellen innerhalb des Rezeptors bestimmt (Terwilliger und Koshland, 1984). Diese Sequenz wurde auch in archaeellen Transducern gefunden. Eine C-terminale Pentapeptid Sequenz konnte jedoch nicht identifiziert werden.

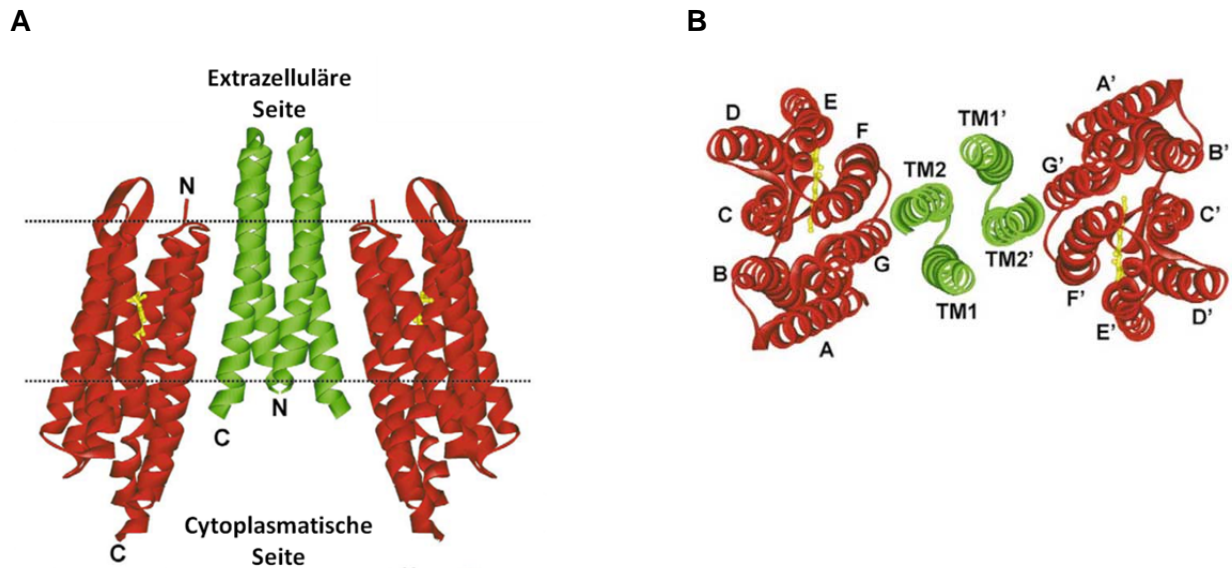
Das sensorische Protein SRII ist für die photophobe Antwort auf blaues Licht in z.B. *H. salinarum* und *N. pharaonis* verantwortlich. Die Röntgenkristallstruktur für NpSRII wurde 2001 gelöst (Luecke et al., 2001, Royant et al., 2001). Wie alle archaeellen Rhodopsine besteht der Photorezeptor aus sieben  $\alpha$ -helikalen Helizes (A-G), die die Membran durchspannen. An dem Aminosäurerest Lysin 205 ist, über eine Schiff'sche Base, ein Retinalmolekül gebunden.

Das Protein durchläuft bei Einstrahlung von Licht der Wellenlänge 498 nm einen Photozyklus. Die Intermediate des Photozykluses von SRII, welche durch ihre unterschiedlichen Absorptionsmaxima gekennzeichnet sind, lassen sich spektroskopisch analysieren. Das Retinalmolekül ändert seine Konformation durch Absorption eines Photons von *all trans* nach *13-cis* (NpSRII  $\rightarrow$  K). Das Protein erfährt daraufhin eine Konformationsänderung (K  $\rightarrow$  L). Dies geschieht innerhalb von einer  $\mu$ sec. Im nächsten Schritt (L  $\rightarrow$  M) wird ein Proton von der Schiff'schen Base auf den Protonenakzeptor Aspartat 75 übertragen. Das M-Intermediat ist durch eine Konformationsänderung des Proteins beim Übergang vom M<sub>1</sub> zum M<sub>2</sub> Zustand charakterisiert. Dieser Übergang beinhaltet die Signalweiterleitung des sensorischen Rhodopsins (Wegener et al., 2000). Das O-Intermediat (M  $\rightarrow$  O) kennzeichnet sich durch die Reprotonierung der Schiff'schen Base, worauf die Relaxation in den Grundzustand des Proteins folgt (O  $\rightarrow$  NpSRII) (Chizhov et al., 1998).

Die sensorischen Rhodopsine SRI und SRII aus *H. salinarum* und *N. pharaonis* (nur SRII) liegen im Komplex mit dem Transducer HtrI bzw. HtrII vor. Während der Lebensdauer des M-Intermediats kommt es zu einer Konformationsänderung im NpSRII, wodurch die Signalübertragung auf die transmembrane Helix 2 des Transducers HtrII stattfindet. Gordeliy und Mitarbeiter (Gordeliy et al., 2002) konnten die Struktur des NpSRII/NpHtrII Komplexes

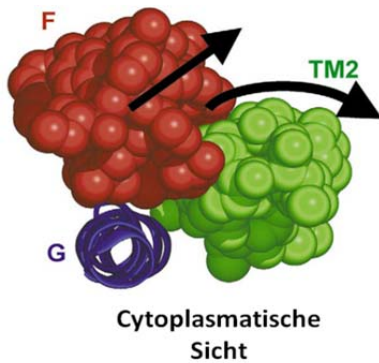


lösen, wobei nur die Struktur des transmembranen Teils des Transducers (23-82) aufgelöst werden konnte (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Kristallstruktur des transmembranen Teils von NpSRII/NpHtrII im 2:2 Komplex. Die Struktur von NpSRII ist in rot, die des Transducers HtrII in grün dargestellt. A zeigt die Seitenansicht und B die Aufsicht von der cytoplasmatischen Seite. Zwischen den gestrichelten Linien liegt der Membranbereich, welcher von der extrazellulären und cytoplasmatischen Seite abgegrenzt wird. (entnommen aus Klare et al., 2004).

Die Kristallstruktur von NpSRII (rot) und NpHtrII (grün) zeigt, dass Helix F und Helix G (NpSRII) mit den transmembranen Helixen TM1 und TM2 des Transducers assoziiert sind. Der Signaltransfer von NpSRII auf den Transducer kann über Helix F oder aber auch Helix G verlaufen. Hierzu wurde von Moukhametzianov und Mitarbeitern auf Grund von Kristallstrukturuntersuchungen eine Verschiebung der Helix G in NpSRII um 0,5 Å vorgeschlagen, was in einer Rotation der TM2 des Transducers um 15° resultiert (Moukhametzianov et al., 2006). Basiert auf ESR Messungen von Wegener und Mitarbeitern (Wegener et al., 2001) schlagen diese einen anderen Mechanismus vor, bei welchem eine Auswärtsbewegung der Helix F von NpSRII zu einer Rotation der TM2 des Transducers um 15° führt (Abbildung 3).

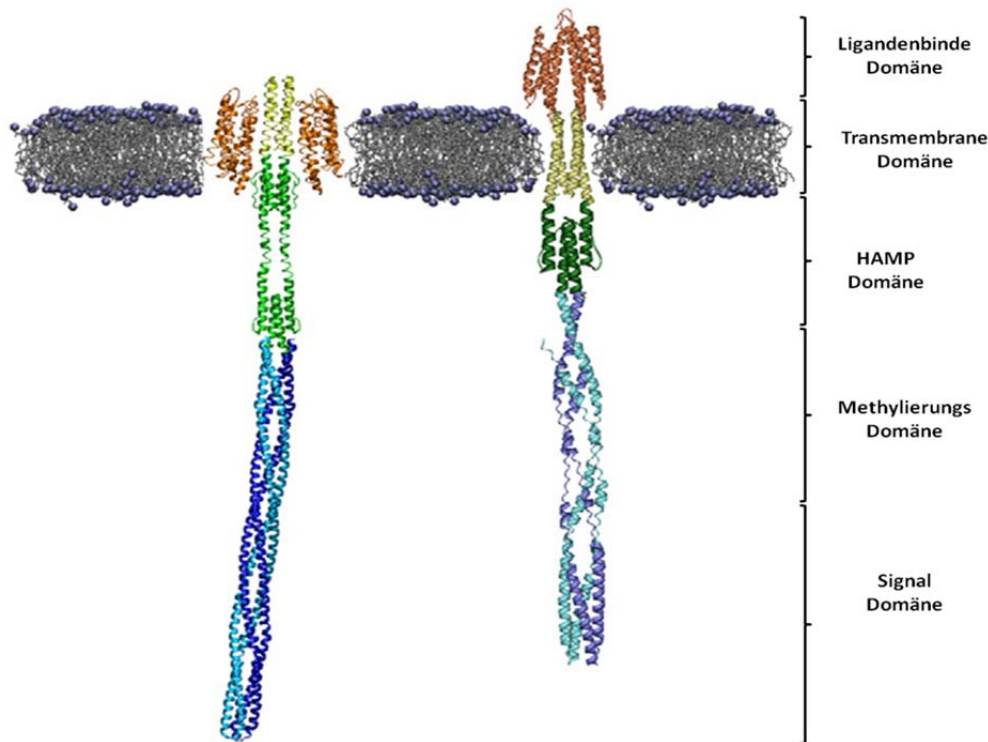


**Abbildung 3:** Darstellung der Licht-induzierten Konformationsänderung der Helix F (rot, NpSR11) und TM2 (grün, NpHtrII) (Klare et al., 2004).

Vor allem der Signaltransfer innerhalb des Transducers ist von großem Interesse. HtrI und HtrII sind durch zwei transmembrane Helices und eine cytoplasmatische, langgestreckte,  $\alpha$ -helikale Struktur charakterisiert. Zu dieser Familie gehört auch der Aspartatrezeptor (Tar), der allgemein als Methyl-akzeptierendes Chemotaxisprotein (MCP) bezeichnet wird. HtrI und HtrII werden durch ihre hohe Homologie zu den MCPs auch MLPs (*MCP like protein*) genannt (Suzuki et al., 2010).

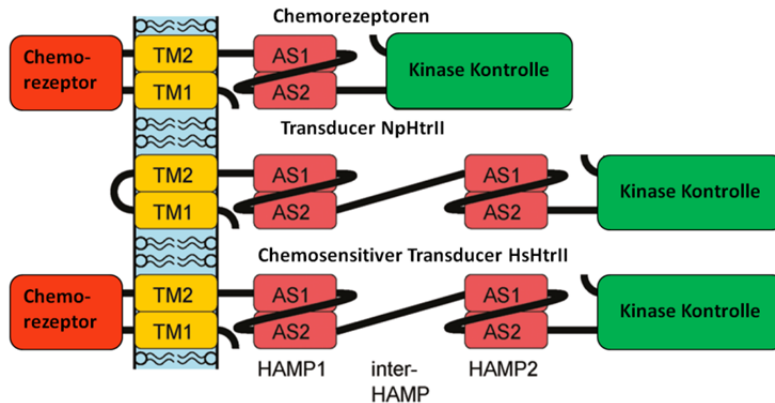
Die transmembrane Helix 1 durchspannt die Membran von der cytoplasmatischen zur extrazellulären Seite und die transmembrane Helix 2 entgegengesetzt. NpHtrII besitzt einen kleinen extrazellulären Loop, welcher vermutlich ein evolutionärer Rest einer Ligandenbindedomäne ist (vgl. Abbildung 2). Für HsHtrII konnte eine Ligandenbindedomäne mit Affinität zu Serin identifiziert werden (Hou et al., 1998). Somit werden Licht und chemische Reize über die gleiche Signalkaskade ins Cytoplasma geleitet (Suzuki et al., 2010).

Der Aspartatrezeptor fungiert ebenfalls als Rezeptor mit Affinität zu Aspartat. Der Rezeptor setzt sich aus einer Ligandenbindedomäne, welche Aspartat bindet, einer Signalkonvertierungsdomäne und einer Signaldomäne zusammen.



**Abbildung 4:** Modell des NpSRII/NpHtrII Komplex (links) und ein eubakterieller Rezeptor (rechts) mit Bezeichnung der Domänen. Der Photorezeptor und die Ligandenbindedomäne sind in orange, die transmembrane Domäne in gelb, die HAMP Domäne(n) in grün und der cytoplasmatische Bereich in blau/cyan dargestellt (nach Klare et al., 2011).

Die Modelle des Transducers/Rezeptors sind als Homodimere dargestellt (Abbildung 4). Die kleinste funktionelle Einheit für den Aspartatrezeptor ist ein Dimer (Amin und Hazelbauer, 2010). Die beiden Monomere bilden eine *coiled coil* Struktur im cytoplasmatischen Bereich der Signal- und Methylierungsdomäne. Die Ligandenbindedomäne besteht aus zwei antiparallelen Vier-Helix Bündeln, die insgesamt je eine Bindetasche für den Liganden Aspartat ausbilden. Für Tar aus *E. coli* konnte eine negative Kooperativität bei der Ligandenbindung festgestellt werden (Biemann und Koshland, 1994). Das Signal nach Ligandenbindung wird in einer Hubkolbenbewegung von der Ligandenbindedomäne über die transmembrane Domäne zur HAMP Domäne weitergeleitet (Ottemann et al., 1999, Falke und Hazelbauer, 2001). Die HAMP Domäne (gefunden in Histidinkinasen, Adenylatcyclasen, Methylakzeptierenden Chemotaxisproteinen und Phosphatasen) von Chemotaxisproteinen in *E. coli* besteht aus einem parallelen Vier-Helix Bündel. In dieser homodimeren Struktur besteht jede Untereinheit aus zwei amphipathischen Helizes AS1 und AS2, die über einen Linker miteinander verbunden sind (Hazelbauer und Lai, 2010, Hulko et al., 2006). Im Unterschied zum Aspartatrezeptor, der eine HAMP Domäne enthält, sind in den Transducern NpHtrII und HsHtrII zwei HAMP Domänen hintereinander geschaltet, die über eine Inter HAMP Helix miteinander verbunden sind (Abbildung 5).

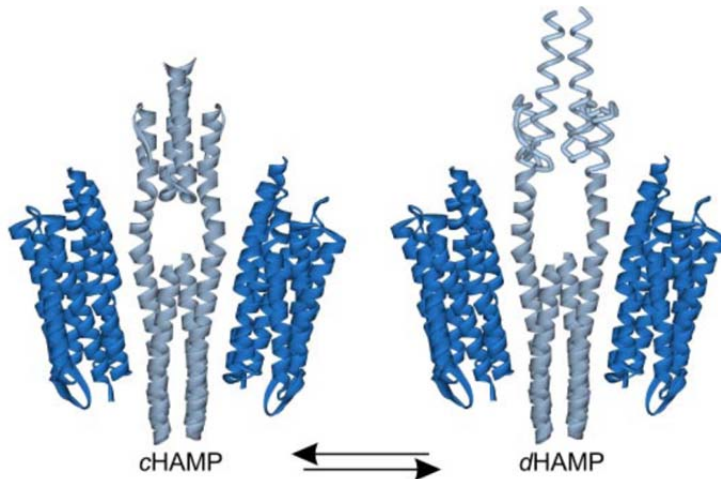


**Abbildung 5:** Domänenaufbau eines bakteriellen Chemorezeptors (oben) eines phototaktischen Signaltransducers NpHtrII (Mitte) und des Transducers und Chemorezeptors HsHtrII (unten) (nach Gushchin et al., 2011).

2006 gelang es Hulko und Mitarbeitern erstmals die NMR Struktur der HAMP Domäne aus dem Protein Af1503 aus *Archeoglobus fulgidus* zu lösen. Es kann ein Heptadenmuster in der Proteinsequenz beobachtet werden, bei welchem die Positionen mit a-g bezeichnet werden. Hydrophobe Aminosäurereste liegen an den Positionen a und d, die Positionen e und g sind meist mit polaren Resten besetzt und die Positionen b,c und f sind hydrophil und zeigen nach außen (Hulko et al., 2006). Swain und Falke konnten durch Disulfidmapping der HAMP Domäne von Tar aus *E. coli* zeigen, dass der Aufbau dem der HAMP Domäne aus Af1503 gleicht (Swain und Falke, 2007). Die Struktur der HAMP Domänen des Proteins Aer2 aus *Pseudomonas aeruginosa* konnten 2010 kristallographisch aufgeklärt werden (Airola et al., 2010). Mittels Modelling, basierend auf den bekannten Strukturen, konnte für die HAMP Domäne aus NpHtrII die gleiche Faltung bestätigt werden (Gushchin et al., 2011, Nishikata et al., 2010, Etzkorn et al., 2010).

Die Weiterleitung des Signals über die HAMP Domäne erklärt Hulko so, dass durch Zahnrad ähnliche Rotation um  $26^\circ$  der Helizes zwischen zwei Signalzuständen gewechselt werden kann, wobei von einer a-d Anordnung zu einer ungewöhnlichen x-da Anordnung gedreht wird (Hulko et al., 2006).

Bordignon und Mitarbeiter zeigten für eine HAMP Domäne aus NpHtrII durch ESR Messungen eine hohe Dynamik der Domäne (Bordignon et al., 2005). Untersuchungen von Doebber und Mitarbeitern (Doebber et al., 2008) zeigten ein Gleichgewicht zwischen einer dynamischen HAMP Domäne und einer kompakten HAMP Struktur (Abbildung 6). Zhou und Mitarbeiter schlugen 2009 für die HAMP Domäne aus Tsr ebenfalls eine dynamische Struktur vor (Zhou et al., 2009).



**Abbildung 6:** Modell einer kompakten (links, cHAMP) und dynamischen HAMP Domäne (rechts, dHAMP) von NpHtrII im Komplex mit NpSRII (Doebber et al., 2008).

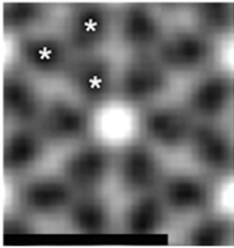
Gushchin und Mitarbeiter führten molekular-dynamische Simulationen an der HAMP Domäne 1 von NpHtrII durch und fanden zwei unterschiedliche Zustände, die sich in der Verschiebung um eine halbe  $\alpha$ -helikale Windung von AS1 relativ zu AS2 unterscheiden (Gushchin et al., 2013).

Die Funktionsweise der zweiten HAMP Domäne in NpHtrII scheint entgegengesetzt zur HAMP 1 zu sein. Die Verschiebung der AS1 zu AS2 in HAMP 1 verläuft in der HAMP 2 Domäne umgekehrt, was die Signalübertragung durch wechselnde Konformationen mit alternierendem Signal indiziert (Wang et al., 2012).

Der Signaltransfer erfolgt von der HAMP Domäne zur cytoplasmatischen Signaldomäne. An der Spitze der Signaldomäne bindet die Histidin-Kinase CheA und es wird eine Signaltransduktionskaskade durchlaufen. Die Stöchiometrie und Anordnung zwischen Rezeptor, CheA und Adapterprotein CheW ist von großem Interesse, um den Signaltransfer vollständig aufzuklären. ESR Experimente von Bhatnagar und Mitarbeitern zeigen die Anordnung von CheA, CheW und dem löslichen MLP Tm14 aus *Thermotoga maritima* (Bhatnagar et al., 2010). Die genaue Stöchiometrie des ternären Komplexes ist noch kontrovers und variiert zwischen drei bis neun Rezeptoren pro Histidin-Kinase Dimer und zwei CheW Proteinen (Gegner et al., 1992, Levit et al., 2002, Li und Hazelbauer, 2004, Wolanin et al., 2006, Erbse et al., 2009). 2011 zeigten Li und Hazelbauer, dass die Kerneinheit des chemotaktischen Signalkomplexes aus zwei Trimeren von Rezeptor Dimeren, zwei CheW Proteinen und einem Histidin-Kinase Dimer besteht (Li und Hazelbauer, 2011). Die Anordnung von Rezeptor Homodimeren zu „Trimeren von Dimeren“ wurde schon früh diskutiert und es konnte gezeigt werden, dass eine Kinaseaktivierung nur möglich ist, wenn ein Trimer von Rezeptordimeren vorliegt (Boldog et al., 2006). Eine Erklärung für die unterschiedlichen gefundenen Stöchiometrie könnten die Variationen der

Proben und Präparationen sein. Die Vollständigkeit eines Arrays bzw. Clusters kann auch je nach Bedingung anders ausgeprägt sein und so die unterschiedliche Stöchiometrie erklären (Briegel et al., 2012).

In chemotaktischen Bakterien ist die Kerneinheit des Signalkomplexes in großen Arrays organisiert. Hauptsächlich lagern sich die Signalkomplexe an den Zellpolen großflächig an, jedoch nicht ausschließlich (Khursigara et al., 2011). Die Signalkomplexe sind in dichten Clustern hexagonal angeordnet (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Subtomogramm (gemittelt) eines *E. coli* Chemorezeptorarrays (Briegel et al., 2012).

Die Rezeptorcluster haben eine hohe Sensitivität und können schon auf geringe Konzentrationsunterschiede der Liganden (10 nM) reagieren. Dies wird durch eine starke Gesamtsignalamplifikation ermöglicht, die bei einem Faktor von etwa 110 liegt (Kentner und Sourjik, 2008). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Flagellenmotor in kooperativer Weise auf die Änderung der Phospho-CheY Konzentration reagiert, was eine etwa vierfache Signalverstärkung bewirkt. Der Hauptanteil (Faktor 30) der Signalamplifikation findet auf der Ebene der Rezeptor-Kinase Komplexe statt (Kentner und Sourjik, 2008). Die Anordnung der Rezeptoren in Clustern ermöglicht eine Kommunikation zwischen den MCPs und kann so zur kooperativen Signalverarbeitung beitragen. Man geht davon aus, dass sich die Rezeptoren gegenseitig in ihrem Zustand (CheA Kinase aktiv/CheA Kinase inaktiv) stabilisieren und so kooperative Einheiten an Rezeptoren gemeinsam „geschaltet“ werden können (Bray et al., 1998, Kentner und Sourjik, 2008). Wie diese kooperative Kommunikation im Einzelnen aussieht, konnte noch nicht aufgeklärt werden.

## Zielsetzung

Das Verständnis der Signaltransduktion und der Amplifikation innerhalb von Chemo- und Photorezeptoren ist noch lückenhaft. Die HAMP Domäne ist als Bindeglied zwischen Ligandenerkennung und Signalausgabe ein wichtiger Teil der Signalweiterleitung. Es sind unterschiedliche Modelle beschrieben, die den Mechanismus der Weiterleitung erklären. Durch die Verwendung von Elektronenspinresonanz Spektroskopie soll die Aufklärung der Signalweiterleitung und der Signalamplifikation innerhalb der HAMP Domäne erweitert werden. Da die Kristallstrukturen der Membranproteine nur teilweise zugänglich sind, können Veränderungen innerhalb des Proteins mittels ESR Spektroskopie in einer Lipidumgebung beobachtet werden. Anhand des Aspartatrezeptors aus *E. coli* soll die horizontale Signalübertragung über die HAMP Domäne untersucht werden. Dazu sollen Cysteinmutanten hergestellt werden, um gezielt Spinmarkierungen in das Protein einzuführen, und Elektronenspinresonanz Spektroskopie Daten aufgenommen werden.

Die Oligomerisierung und Stabilität des Aspartatrezeptors soll mittels Größenausschlusschromatographie, Fluoreszenzpolarisation und Kleinwinkel Röntgenstreuung untersucht werden. Die Daten sollen zum weiteren Verständnis der Struktur des Rezeptors dienen und sind Voraussetzung für weitere Untersuchungen. Der Rezeptor soll in Liposomen rekonstituiert werden, um so die Zusammenlagerung von Rezeptoren in einer geeigneten Lipidumgebung zu generieren.

Durch Methylierungsexperimente an Tar soll ebenfalls die Signalverstärkung über eine Anordnung von mehreren Rezeptoren in definierter Lipidumgebung untersucht werden.

Die Untersuchung des Transducers und Rezeptors HsHtrII mittels ESR Spektroskopie soll tiefere Einblicke in die Signalweiterleitung in der LBD oder durch die Anregung über ein sensorisches Protein mittels Licht geben.

Zudem soll die Affinität der Rezeptoren Tar und HsHtrII zu Aspartat und Serin mittels Thermophorese untersucht und mit ITC Daten verglichen werden.

Festkörper NMR und FTIR Daten von NpSRII sollen weitere Perspektiven zur Untersuchung der Signalweiterleitung nach Lichtaktivierung innerhalb des sensorischen Rezeptors aufzeigen.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität und stammten von den Firmen Acros (Geel), Baker (Groß-Gerau), Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm) Gibco-BRL (Neu Isenburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim).

### 2.2 Enzyme

Enzym	Hersteller
EcoRI	New England Biolabs (Schwalbach)
HindIII	New England Biolabs (Schwalbach)
NcoI	New England Biolabs (Schwalbach)
Pfu Polymerase	Fermentas (Seelze)
SapI	New England Biolabs (Schwalbach)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Schwalbach)

### 2.3 Lipide

Lipid	Hersteller
1,2 Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (Hühnerei)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)
L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamin ( <i>E. coli</i> )	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)
L- $\alpha$ -Phosphatidylglycerol ( <i>E. coli</i> )	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)
<i>E. coli</i> total lipid extract	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)



## 2.4 Fluorophore und Spinsonden

Fluorophor und Spinsonde	Hersteller
1-Oxyl-2,2,5,5-Tetramethyl-3-Pyrroline-3-Methyl (Methanthiosulfonat) (MTSSL)	Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)
N-(1-Oxyl-2,2,6,6-Tetramethyl-4-Piperidinyloxy) Iodoacetamid (IASL)	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Steinhoff (Osnabrück)
Alexa Fluor 546 C <sub>5</sub> -Maleimid	Invitrogen (Darmstadt)
Alexa Fluor 647 C <sub>2</sub> -Maleimid	Invitrogen (Darmstadt)
Alexa Fluor 647 Succinimidylester	Invitrogen (Darmstadt)
Bodipy FL N-(2-Aminoethyl) Maleimid	Invitrogen (Darmstadt)

## 2.5 Molekularbiologische Kits

Kit	Hersteller
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAPrep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAQuick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAQuick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)

## 2.6 Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
1 kb DNA-Marker	New England Biolabs (Schwalbach)
100 bp DNA-Marker	New England Biolabs (Schwalbach)
HMW Gelfiltrations-Kalibrierungskit	GE Healthcare (München)
LMW Gelfiltrations-Kalibrierungskit	GE Healthcare (München)
<sup>14</sup> C Protein Standard	Perkin Elmer (Rodgau)
Native Mark unstained Protein Standard	Invitrogen (Darmstadt)
LMW SDS Marker Kit	GE Healthcare (München)
Magic Marker Western Protein Standard	Invitrogen (Darmstadt)

## 2.7 Säulen und Chromatographiematerial

Säulen und Chromatographiematerial	Hersteller
Ni-NTA Superflow	Qiagen (Hilden)
Strep-Tactin® Superflow high capacity	IBA (Göttingen)
Superdex 200 10/300 GL (Tricorn)	GE Healthcare (München)
HiLoad 16/60 Superdex 200	GE Healthcare (München)

## 2.8 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien und Verbrauchsmaterial	Hersteller
$^{13}\text{C}_6, ^2\text{H}_7$ Glukose	Cortecnet (Voisins Le Bretonneux, Frankreich)
$^3\text{H}$ SAM	PerkinElmer (Rodgau)
Amicon Ultrafiltrationsröhrchen	Millipore (Cork, Irland)
BioBeads SM-2 Adsorbent	Biorad (München)
Complete (Protease-Inhibitor-Cocktail)	Roche (Penzberg)
$\text{D}_2\text{O}$	Cortecnet (Voisins Le Bretonneux, Frankreich)
n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid	Calbiochem (Schwalbach am Taunus)
ECL Plus Western Blotting Reagenz	GE Healthcare (München)
Elektroporationsküvette	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
Hyperfilm ECL	GE Healthcare (München)
Nitrocellulose Membran Optitran BA-S 85	Whatman (Dassel)
PD10 Säulen	GE Healthcare (München)
Slide-A-Lyzer (Dialysekassette)	Thermo (Rockford, USA)
Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg)

## 2.9 Instrumentation

Gerät	Hersteller
ABI Prism 3100 Gene Sequencer	Applied Biosystems (Lincoln)
CD-Spektrometer J-815	Jasco (Gross-Umstadt)
Finnigan LCQ Advantage MAX (Elektrospraymassenspektrometer)	Thermo Fisher Scientific (Corston, UK)
FPLC-System ÄKTA Purifier	GE Healthcare (München)
Gene Pulser (Elektroporationsgerät)	Bio-Rad (München)
Heraeus CO <sub>2</sub> Auto zero (Brutschrank)	Heraeus (Hanau)
Mikrofluidizer M-110S	Microfluidics (Newton, USA)
Mikrokalorimeter, iTC200	GE Healthcare (München)
Mini-PROTEAN 3 Cell oder Mini-PROTEAN Tetra Cell (SDS Gelsystem)	Bio-Rad (München)
Monolith NT.015T (Thermophorese)	NanoTemper (München)
PCR Express-Gerät Hybaid	Thermo (Franklin, USA)
pH-Meter 766 Calimatic	Knick (Berlin)
Schüttler	New Brunswick (Nürtingen)
Sonifier W-250	Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
Spektrometer UV-2401 PC UV-Vis Recording	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Sub-Cell System (Agarosegelkammer)	Bio-Rad (München)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad (München)
Ultrazentrifuge Optima L-80 XP	Beckman (Krefeld)
Ultrazentrifuge Optima TL	Beckman (Krefeld)
Voyager-DE Pro MALDI-Massenspektrometer	Applied Biosystems (Darmstadt)
Zentrifuge Avanti J-26 XP	Beckman (Krefeld)
Zentrifuge Avanti Allegra X-22R	Beckman (Krefeld)
Zentrifuge R5424	Eppendorf(Hamburg)
Zentrifuge RC 28S	Sorvall (Hamburg)
Zentrifuge RC-5B	Sorvall (Hamburg)

## 2.10 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1 <i>blue</i>	endA1 gyrA96(nal <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 relA1 lac glhV44 F' [::Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<i>E. coli</i> RP3098	(flhD-flhA)DEtr4 thr(AM)-1 leuB6 his-4metf(Am)159 srlC::Tn10-300rpsL136[thi-1 ara-14 mtl-1 xyl-5 tonA31 tsx-78]/ras/

## 2.11 Plasmide

pET27bmod	Zur Verfügung gestellt von Dr. R. Seidel (MPI Dortmund)
pTXB3-His	Zur Verfügung gestellt von Dr. R. Seidel (MPI Dortmund)
pET27bmod Tar 1-553-His	Zur Verfügung gestellt von Dr. Y.-J. Kim (MPI Dortmund)
pET27bmod NpSOplI-His	Zur Verfügung gestellt von Dr. R. Seidel (MPI Dortmund)
pET27bmod HsSOplI-His	Zur Verfügung gestellt von Dr. Y.-J. Kim (MPI Dortmund)
pET27bmod HsHtrII-His	Zur Verfügung gestellt von Dr. Y.-J. Kim (MPI Dortmund)
pET27bmod NpHtrII-His	Zur Verfügung gestellt von Dr. R. Seidel (MPI Dortmund)
pUC12 pME43:CheRgene	Zur Verfügung gestellt von Dr. G.L. Hazelbauer (Simms et al., 1987)

## 2.12 Oligonukleotide

Die im Folgenden aufgeführten Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) bezogen.

### Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung in den pET27bmod Vektor:

T7 Promotor\_for: TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG GAA

T7 Terminator Primer\_rev: GCT AGT TAT TGC TCA GCG G

### Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung in den pXTB3-His Vektor:

Primer	Sequenz von 5' nach 3'
Tar 553_Sapl_rev	GGT GGG CTC TTC AGC AGA ATG TTT CCC AGT
TarΔ_Sapl_rev	ACA GGG CTC TTC AGC AGA ATG TTT CCC AGT T
Del_Sapl_Tar 553_hin	CAT AGC CAG AAA AGC TTT GTG G
Del_Sapl_Tar 553_rev	CCA CAA AGC TTT TCT GGC TAT G
HsHtrII 398_Sapl_rev	GGT GGG CTC TTC AGC AGC GAG CCG TTT CT
HsHtrII 765_Sapl_rev	GGT GGG CTC TTC AGC AGT AGT CCT CCG GT

Primer zur Generierung von Cystein-Mutanten in Tar 553:

<b>Primer</b>	<b>Sequenz von 5' nach 3'</b>
Tar 553_R214C_hin	GGC ATT CGC TGC ATG TTG CTT
Tar 553_R214C_rev	AAG CAA CAT GCA GCG AAT GCC
Tar 553_L216C_hin	CGC CGT ATG TGC CTT ACT CCG
Tar 553_L216C_rev	CGG AGT AAG GCA CAT ACG GCG
Tar 553_T218C_hin	ATG TTG CTT TGT CCG CTG GCA
Tar 553_T218C_rev	TGC CAG CGG ACA AAG CAA CAT
Tar 553_I224C_hin	GCA AAA ATT TGT GCT CAC ATT CGC
Tar 553_I224C_rev	GCG AAT GTG AGC ACA AAT TTT TGC
Tar 553_I227C_hin	ATT GCT CAC TGT CGC GAA ATC GC
Tar 553_I227C_rev	GC GAT TTC GCG ACA GTG AGC AAT
Tar 553_A231C_hin	T CGC GAA ATC TGC GGT GGT AAC
Tar 553_A231C_rev	GTT ACC ACC GCA GAT TTC GCG A
Tar 553_E246C_hin	GGG CGC AGT TGT ATG GGC GAC CT
Tar 553_E246C_rev	AG GTC GCC CAT ACA ACT GCG CCC
Tar 553_M247C_hin	CGC AGT GAA TGT GGC GAC CTG GC
Tar 553_M247C_rev	GC CAG GTC GCC ACA TTC ACT GCG
Tar 553_M257C_hin	GTT TCA CAC TGT CAA CGC TCT TTG
Tar 553_M257C_rev	CAA AGA GCG TTG ACA GTG TGA AAC
Tar 553_T264C_hin	TTG ACT GAC TGT GTC ACT CAT GTC
Tar 553_T264C_rev	GAC ATG AGT GAC ACA GTC AGT CAA

Primer zur Generierung von TarΔ (28-191)-StreptII:

<b>Primer</b>	<b>Sequenz von 5' nach 3'</b>
TarΔ 1-28_NpHtrII_hin	AT ACC ATG GTT AAC CGT ATC C
TarΔ 1-28_NpHtrII_rev	CTC CTG TAC GGC ATC ACC GGT CGC GGC GGC GGC GGT TAC CAG ACT GCC GGA AAT AAG CT
TarΔ 191-553_NpHtrII _Tev_hin	GCC GCG ACC GGT GAT GCC GCA GCC GTA CAG GAG GCG GCC CAG TGG CAA CTG GCG GT
TarΔ 191-553_NpHtrII _Tev_rev	GGA TCC ACC CTG GAA GTA CAG GTT TTC CGA ATT CAA TGT TTC CCA GTT TGG
TarΔ _StreptII_hin	GA TCC AAC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA TAA TAA A
TarΔ _StreptII_rev	AG CTT TTA TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA GTT G

Primer zur Generierung von Cystein-Mutanten in TarΔ (28-191):

Es wurden die gleichen Primer zur Generierung der Cystein Mutanten in TarΔ verwendet wie in Tar 553.

Primer zur Generierung von Cystein Mutanten in HsHtrII 398:

<b>Primer</b>	<b>Sequenz von 5' nach 3'</b>
HsHtrII_I298C_hin	CTC TCA CTG TGC GGT GTC ACT
HsHtrII_I298C_rev	AGT GAC ACC GCA CAG TGA GAG
HsHtrII_V302C_hin	GGT GTC ACT TGC GGC TCG ACC
HsHtrII_V302C_rev	GGT CGA GCC GCA AGT GAC ACC

Primer zur Generierung von Cystein Mutanten in NpSRII:

<b>Primer</b>	<b>Sequenz von 5' nach 3'</b>
NpSRII T218C/A221C_for	CT GCG GCG TGC CTT CGG TGC GAA CAC GG
NpSRII T218C/A221C_rev	CC GTG TTC GCA CCG AAG GCA CGC CGC AG
NpSRII T146C/S150C_for	CCG ATG TGC GAA AGT GCC TGC CAG CGG T
NpSRII T146C/S150C_rev	A CCG CTG GCA GGC ACT TTC GCA CAT CGG

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die molekularbiologischen Methoden nach Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1987) angewandt.

#### 3.1.1 Zellanzucht und Lagerung

*E. coli* Zellen wurden in LB Medium (10 g Trypton, 10 g NaCl und 5 g Hefeextrakt pro L, pH 7,2) angezogen. Es wurden 2 ml Vorkulturen in 10 ml Reagenzgläsern gezogen und 100 - 1000 ml Erlenmeyerkolben verwendet, um Bakterien anwachsen zu lassen. Bakterienkulturen wurden entweder mit einer Kolonie von einer Agarplatte oder mit 50 µl Flüssigkultur angeimpft. Die Inkubation der Zellen erfolgte über Nacht in einem Schüttler bei 37°C und 160 rpm. Zur Selektion der *E. coli* Zellen wurde das Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zu dem Medium gegeben.

Für die Präparation von Glycerinkulturen zur Lagerung wurden 700 µl einer gerade trüben Flüssigkultur an *E. coli* mit 300 µl 80% sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

#### 3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von DNA wurden Zellen aus 100 ml Kulturen durch Zentrifugation (5000 x g, 15 min, 4°C) geerntet. Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels Qiagen Plasmid Midi Kit über einen Qia-Tip-100 mit Anionenaustauschermaterial nach Angaben des Herstellers.

#### 3.1.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987) amplifiziert. In der Regel wurden 10 ng DNA-Matrize, 20 pmol Primer, 5 nmol jedes der vier dNTP's und 1,25 U Pfu-Polymerase in 50 µl Ansätzen verwendet. Die Amplifikation der DNA im Thermocycler erfolgte durch eine „Hot-Start“-PCR in drei Schritten. Die PCR-Proben wurden für 3 Minuten auf 96 °C erhitzt, gefolgt von der Zugabe der Pfu-Polymerase. Folgende PCR-Zyklen wurden durchlaufen:

Schritt	Temperatur	Dauer	
Hot-Start	96°C	3 min	
	96°C	Hold	
Denaturierung	96°C	15 sec	} 5 Zyklen
Hybridisierung	55°C	30 sec	
Elongation	72°C	X sec	
Denaturierung	96°C	15 sec	} 20 Zyklen
Hybridisierung	Schmelztemperatur d. Primer - 2°C	30 sec	
Elongation	72°C	X sec	
	72°C	4 min	
	4°C	Hold	

Die Elongationszeit X wurde an die Länge des zu amplifizierenden Fragments angepasst, wobei davon ausgegangen wurde, dass die Pfu-Polymerase den DNA-Strang um 1000 bp pro Minute verlängert.

Es wurde die *overlap extension* Methode verwendet, um ortsspezifische Mutationen in ein Gen einzuführen (Ho et al., 1989).

### 3.1.4 Analyse und Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierzu wurden die DNA-Proben mit Probenpuffer (TBE-Puffer: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,9 mM EDTA, pH 8,9 unter Zusatz von 10 % (w/v) Ficoll-400, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau, 0,025 % (w/v) Xylencyanol) versetzt und auf 0,7 – 2 %ige (w/v) Agarosegele in TBE-Puffer aufgetragen. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte in TBE-Puffer durch das Anlegen einer Spannung von 120 V. Das Anfärben der DNA-Banden im Gel resultierte durch die Zugabe von 0,6 mg/l Ethidiumbromid zum Puffer.

Zur Separation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Qiagen Gel-Extraktions-Kits nach Angaben des Herstellers isoliert.

### 3.1.5 Restriktion von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA wurde durch Inkubation bei 37°C mit dem entsprechenden Restriktionsenzym für 1 – 1,5 h erreicht. Die Wahl des geeigneten Puffers erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Menge an eingesetztem Enzym wurde folgendermaßen berechnet:



Enzymaktivität

$$\frac{\text{bp } (\lambda)}{\text{bp (Plasmid)}} \times \frac{\text{Anzahl Schnittstellen (Plasmid)}}{\text{Anzahl Schnittstellen } (\lambda)} = x \text{ Units}$$

Umrechnung auf Aktivität:

$$\frac{x \text{ Units}}{\text{Konzentration } \left(\frac{\text{U}}{\mu\text{l}}\right)} = y \mu\text{l schneiden } 1 \mu\text{g}$$

### 3.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde durch die Messung der Absorption bei 260 nm abgeschätzt. Eine Extinktion von 1 entspricht hierbei einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 ng/ $\mu\text{l}$ .

### 3.1.7 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter XL1-Blue oder BL21(DE3) Zellen wurden 100 ml LB Medium (+ 32,5  $\mu\text{g/ml}$  Tet bei XL1-Blue) mit einer gepickten Kolonie angeimpft und bei 37°C und 160 rpm über Nacht inkubiert. 1 L LB Medium (+ 32,5  $\mu\text{g/ml}$  Tet bei XL1-Blue) wurde mit der Übernachtskultur auf eine  $\text{OD}_{578}$  von 0.05 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer  $\text{OD}_{578}$  von 0,7 wachsen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 5000 rpm (GS3) und 4°C geerntet. Das Pellet aus 6 Zentrifugationsbechern wurde in eiskaltem, sterilem 5%igem Glycerol resuspendiert, auf 4 Zentrifugationsbecher aufgeteilt und erneut zentrifugiert. Es folgte die Wiederholung des Waschschritts, indem zunächst die resuspendierten Pellets in 2 Bechern und dann in einem Becher vereinigt wurden. Anschließend wurde erneut mit 5% Glycerol in einem 50 ml Röhrchen gewaschen und das nach Zentrifugation entstandene Pellet in 2 ml 10%igem sterilen Glycerol aufgenommen. Bei einer  $\text{OD}_{578}$  zwischen 120 und 160 wurden 80  $\mu\text{l}$  Aliquots in Stickstoff eingefroren und bei – 80°C gelagert.

### 3.1.8 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA erfolgte durch Inkubation über Nacht mit T4-DNA-Ligase bei 8°C oder für 6 h bei Raumtemperatur. Dabei wurde nachstehende Formel zur Bestimmung der Mengen an Fragment (F) und Vektor (V) im Ligationsansatz verwendet:

$$\text{Masse (F)[ng]} = \frac{5 \times \text{Masse (V)[ng]} \times \text{Länge (F)[bp]}}{\text{Länge (V)[bp]}}$$

Die geschnittene Plasmid-DNA wurde mit entsprechender Menge an DNA-Fragment, Ligase-Puffer (50 mM Tris, pH 7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5 % (w/v) PEG 8000) und 1 U T4-DNA-Ligase in 20 µl Ansätzen inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Ligationsansätze durch Erhitzen für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

### 3.1.9 Transformation von *E. coli* Zellen

Elektrokompetente *E. coli* Bakterien wurden durch Elektroporation mit Plasmid-DNA nach der Methode von Dower et al. (1988) transformiert. Hierzu wurden 3 ng Plasmid-DNA bzw. 10 µl eines Ligationsansatzes (mit 10 µl H<sub>2</sub>O zu 20 µl aufgefüllt) mit 80 µl einer 10%igen Glycerinsuspension elektrokompetenter Zellen (OD<sub>578</sub> ≈ 120) vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die Transformation erfolgte durch einen Puls von 1,5 kV, 800 Ω, 25 µF und einer Zeitkonstante von 10 ± 2 Sekunden. Anschließend wurden die Zellen in 900 µl LB-Medium aufgenommen und zur Regeneration 30 – 60 min bei 37°C und 160 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden auf antibiotikahaltigen LB-Agar Platten ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 3.1.10 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) wurde auf Basis von fluoreszenzmarkierter Didesoxyterminatoren nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Herstellung von 20 µl Sequenzierungsansätzen erfolgte, indem 500 ng DNA mit 4 µl Big Dye Terminator-Mix (Applied Biosystem, ABI), 4 µl 5 × Sequenzierungspuffer (Tris, MgCl<sub>2</sub>, pH 9,0), 3,2 µl 1 pmol Sequenzierungsprimer versetzt und auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt wurde. Es wurden folgende PCR-Zyklen durchlaufen:

Schritt	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	96°C	10 sec	} 25 Zyklen
Hybridisierung	55 °C	5 sec	
Elongation	60°C	4 min	
	4°C	Hold	

Das Reaktionsprodukt wurde aufgereinigt, indem der Sequenzierungsansatz mit 1 µl 125 mM EDTA (pH 8), 2 µl 3 M NaOAc (pH 4,7) und 50 µl abs. Ethanol versetzt wurde. Das Fällen der DNA erfolgte durch Inkubation der Ansätze für 15 Minuten auf Eis. Das nach Zentrifugation (15 min, 4°C, 14.000 rpm (Eppendorf, Tischzentrifuge)) erhaltene Pellet wurde mit 400 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

### 3.2 Proteinchemische Methoden

#### 3.2.1. Proteinexpression in *E.coli*

Für die Expression von Proteinen in *E. coli* BL21(DE3) wurde eine Expressionskultur (1-1,5 L LB Medium) mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einer Vorkultur auf eine  $OD_{578} \approx 0,05$  inokuliert. Für die Herstellung isotopenmarkierter Proteine wurde in einem Liter Minimalmedium folgende Zusammensetzung verwendet: 7,5 g  $Na_2HPO_4$  (wasserfrei), 3 g  $KH_2PO_4$ , 0,5 g NaCl, 0,25 g  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 0,014 g  $CaCl_2 \times 2H_2O$ , pH 7,1. Unmittelbar vor dem Animpfen folgte die Zugabe von 10 ml einer Spurenelement-Lösung bestehend aus 1 ml SL6 (1L SL6: 300 mg  $H_3BO_3$ , 200 mg  $CoCl_2 \times 6H_2O$ , 100 mg  $ZnSO_4 \times 7H_2O$ , 30 mg  $MnCl_2$ , 30 mg  $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ , 10 mg  $CuCl_2 \times 2H_2O$ , 20 mg  $NiCl_2 \times 6H_2O$ ), 5 mg EDTA und 2 mg Fe(II)- $SO_4$  auf 10 ml mit  $H_2O$  aufgefüllt. Je nach Isotopenmarkierung wurden dem Medium 2 g  $^{13}C$ -Glukose bzw. 5 ml 40 % (v/v) Glukose, 1 g  $^{15}N$ -Ammoniumchlorid bzw. 1 g Ammoniumchlorid hinzugefügt. Für die  $^2H$  Isotopenmarkierung wurde das Minimalmedium sowie die Spurenelement-Lösung mit  $D_2O$  anstatt mit  $H_2O$  angesetzt und  $^{13}C_6, ^2H_7$  Glukose sowie  $^{15}N$ -Ammoniumchlorid verwendet. Die angeimpfte Kultur wurde bei 37°C unter Schütteln (130 rpm) inkubiert, bis eine  $OD_{578}$  von 0,8 - 1 erreicht war. Im Anschluss folgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Bei der Expression von Retinalproteinen wurde 10 µM *all-trans* Retinal in EtOH zugefügt. Die Inkubation der Expressionskultur erfolgte für weitere 3 h bei 37°C oder bei 30°C über Nacht. Nach Zellernte durch Zentrifugation (5.000 rpm (JLA 8.100), 15 min, 15 °C) wurde das Zellpellet gewaschen (ZWP: 150 mM NaCl, 25 mM  $NaP_i$ , 2 mM EDTA, pH 8), erneut pelletiert und weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

#### 3.2.2 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss für die Retinal- und Transducerproteine erfolgte mittels Mikrofluidizer, während Tar Proteine per Ultraschall aufgeschlossen wurden. Für den Zellaufschluss wurden die gewaschenen Zellen in ZWP unter Zugabe einer Spatelspitze DNase I und einer Protease-Inhibitor-Cocktail Tablette resuspendiert. Das Zelllysate wurde zur Abtrennung der

cytosolischen Fraktion bei 100.000 x g für 1,5 h bei 4 °C zentrifugiert. Die pelletierte Membranfraktion wurde in DDM-haltigen Puffer über Nacht bei 8°C unter Rühren solubilisiert. Die Abtrennung der solubilisierten Proteine erfolgte durch Zentrifugation bei 100.000 x g, bei 4°C für 1,5 h.

<b>Solubilisierungspuffer</b> <b>HsHtrII /HsSRII</b>	<b>Solubilisierungspuffer</b> <b>NpHtrII und NpSRII</b>	<b>Solubilisierungspuffer</b> <b>Tar</b>
500 mM/ 4M NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
50 mM MES	50 mM NaP <sub>i</sub>	50 mM Tris
2 % DDM	2 % DDM	2 % DDM
pH 6	pH 8	pH 7

### 3.2.3 Aufreinigung über Affinitätschromatographie

#### 3.2.3.1 Ni-NTA Affinitätschromatographie über einen Polyhistidin-Anker

Zur Isolierung von rekombinanten Proteinen mit einem Polyhistidin-Anker wurde Ni-NTA Material eingesetzt. Die Äquilibration des Ni-NTA Materials wurde durch Waschen mit 2 SV Äquilibrationspuffer erreicht. Die solubilisierte Proteinlösung wurde aufgetragen und unspezifisch gebundenes Protein durch niedrige Konzentrationen an Imidazol im Waschpuffer entfernt (30 SV). Die Elution des Zielproteins konnte durch Einstellung einer höheren Imidazolkonzentration im Elutionspuffer erreicht werden. Durch Dialyse gegen ein 100faches Volumen an Äquilibrationspuffer wurde das Imidazol entfernt.

<b>Äquilibrationspuffer</b> <b>HsHtrII /HsSRII</b>	<b>Äquilibrationspuffer</b> <b>NpHtrII und NpSRII</b>	<b>Äquilibrationspuffer</b> <b>Tar</b>
500 mM/ 4M NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
50 mM MES	50 mM NaP <sub>i</sub>	50 mM Tris
0,05 % DDM	0,05 % DDM	0,05 % DDM
pH 6	pH 8	pH 7

<b>Waschpuffer HsHtrII /HsSRII</b>	<b>Waschpuffer NpHtrII und NpSRII</b>	<b>Waschpuffer Tar</b>
500 mM/ 4M NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
50 mM MES	50 mM NaP <sub>i</sub>	50 mM Tris
0,05 % DDM	0,05 % DDM	0,05 % DDM
50 mM Imidazol	30 mM Imidazol	50 mM Imidazol
pH 6	pH 8	pH 7
<b>Elutionspuffer HsHtrII /HsSRII</b>	<b>Elutionspuffer NpHtrII und NpSRII</b>	<b>Elutionspuffer Tar</b>
500 mM/4M NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
50 mM MES	50 mM NaP <sub>i</sub>	50 mM Tris
0,05 % DDM	0,05 % DDM	0,05 % DDM
250 mM Imidazol	200 mM Imidazol	250 mM Imidazol
pH 6	pH 8	pH 7

### ***3.2.3.2 Strep-Tactin® Affinitätschromatographie über einen Strept-II-Peptid-Anker***

Die Aufreinigung von rekombinant hergestelltem Protein, welches einen Strept-II-Anker trug, erfolgte über ein Strep-Tactin® Material. Nach Äquilibrierung des Säulenmaterials mit 2 SV Waschpuffer wurde die solubilisierete Proteinlösung aufgetragen. Unspezifisch an das Material gebundenes Protein wurde mit 20 SV Waschpuffer entfernt. Die Elution des Zielproteins von der Säule erfolgte durch Zusatz von Desthiobiotin im Elutionspuffer. Durch Dialyse gegen ein 100-faches Volumen Waschpuffer wurde das Desthiobiotin entfernt.

<b>Waschpuffer Tar</b>	<b>Elutionspuffer Tar</b>
300 mM NaCl	300 mM NaCl
50 mM Tris	50 mM Tris
0,05 % DDM	0,05 % DDM
1 mM EDTA	1 mM EDTA
pH 7	2,5 mM Desthiobiotin
	pH 7

### ***3.2.3.3 Affinitätschromatographie an Chitin Material über eine Chitin-Bindedomäne***

Chitin Material wurde mit Waschpuffer äquilibriert und die solubilisierete Proteinlösung aufgetragen. Das Säulenmaterial mit gebundenem Zielprotein wurde mit 10 SV Waschpuffer

gereinigt, um unspezifisch gebundene Verunreinigungen zu entfernen. Die Abspaltung des Zielproteins erfolgte durch die Zugabe von DTT-haltigem Elutionspuffer und Inkubation für 1-3 h bei RT oder über Nacht unter leichtem Schütteln bei 8°C. Das Protein wurde als DTT-Thioester von der Säule eluiert und die Säule mit Elutionspuffer nachgewaschen. Der DTT-Thioester hydrolysiert nach Dialyse gegen Waschpuffer spontan zum freien Carboxylat, wobei das Protein mit freiem C-Terminus vorliegt (Mootz, 2007).

Waschpuffer Tar	Elutionspuffer Tar
300 mM NaCl	300 mM NaCl
50 mM Tris	50 mM Tris
0,05 % DDM	0,05 % DDM
pH 7	30 mM DTT
	pH 7

### 3.2.4 Spinmarkierung von Proteinen über Cysteine

Aufgereinigte Proteine wurden durch Zugabe von 1 mM DTT für 2 h bei RT unter leichtem Schütteln reduziert, um frei vorliegende Cysteinseitenketten zu erhalten. Das Entfernen des DTTs erfolgte über eine PD-10 Entsalzungssäule nach Angaben des Herstellers gegen verwendeten Dialysepuffer. Für das Markieren mit einem MTS-Spinlabel wurde die Proteinlösung (0,5 mg/ml) mit 1 mM MTSSL (in DMSO gelöst) versetzt und über Nacht bei 8°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Für die Markierung mit einem Iodacetamid SL wurde ebenfalls 1 mM SL (in DMSO gelöst) zu der Proteinlösung zugegeben. Die Abtrennung von freiem Spinlabel erfolgte über eine PD-10 Entsalzungssäule, wobei das Protein in verwendetem Dialysepuffer aufgenommen wurde. Diese Kopplungsreaktion ist auch unter der Bezeichnung *site directed spin labeling* (SDSL) bekannt (Hubbel und Altenbach, 1994).

### 3.2.5 Rekonstitution von Proteinen in Lipide

Für die Rekonstitution von NpSR<sub>II</sub> oder NpHtr<sub>II</sub> wurden polare Lipide aus *N. pharaonis*, *H. salinarum* oder DMPC verwendet, wohin gegen für HsSR<sub>II</sub> oder HsHtr<sub>II</sub> polare Lipide aus dem Organismus *H. salinarum* und für die Rekonstitution des Aspartatrezeptors ein Lipidgemisch aus 2 PE : 1 PC : 1 PG oder ein *E. coli total lipid extract* verwendet wurden. Zur Untersuchung von Komplexen wurden die gereinigten Komponenten in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt und für 1 h bei 8°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die solubilisierten Proteine oder Proteinkomplexe wurden mit Lipiden in einem molaren Verhältnis von 1:20 bis 1:40 gemischt. Für die Rekonstitution in Archaeal-Lipiden wurde eine

Spatelspitze NaCl zugesetzt und für 20 min bei 8°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Um das Detergenz zu entfernen, wurde der Protein-Lipidlösung 1/3 Volumen BioBeads zugegeben und über Nacht bei 8°C unter Schütteln inkubiert. Die Abtrennung der BioBeads erfolgte durch Zentrifugation bei 1000 x g. Die Protein-Lipidsuspension wurde 5-mal durch Zentrifugation (15.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge, 15 min, 4°C) und anschließendes Resuspendieren in Puffer M (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8) gewaschen. Das Pellet wurde in 50 -100 µl Puffer M aufgenommen.

### 3.2.6 Isolierung polarer Lipide aus *H. salinarum* und *N. pharaonis*

Die Isolierung von polaren Lipiden aus *H. salinarum* erfolgte nach Kates et al. (1982). Zur Gewinnung von polaren Lipiden aus *N. pharaonis* wurden Zellen in M9 Minimalmedium mit 3,4 M NaCl, pH 9 bei 40°C, 120 rpm unter Bestrahlung mit orangenem Licht angezogen. Nach Zellernte (5.000 rpm (JLA 8.100), 15°C, 15 min) wurden die Zellen mit Basalsalz (250 g/L NaCl, 20 g/L MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 3 g/L Natriumcitrat, 2 g/L KCl) gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurde diesen 3 mg DNase A/L Kultur zugesetzt und das Pellet gegen H<sub>2</sub>O über Nacht dialysiert. Das Lysat wurde bei 170.000 x g pelletiert, 3-mal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und lyophilisiert. Lipide wurden mit CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1) unter Argon über Nacht extrahiert. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen, der Extrakt in CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1) gelöst und auf eine mit Diethylether/Petrolether (85:15) äquilibrierte Silicagel Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Diethylether/Petrolether (85:15) und CHCl<sub>3</sub>/EtOH (2:1) mit 1% (v/v) H<sub>2</sub>O und 1% (v/v) Ameisensäure gewaschen. Mit einem Gemisch aus CHCl<sub>3</sub>/EtOH (1:1) mit 10% (v/v) H<sub>2</sub>O und 10% (v/v) Ameisensäure wurden die polaren Lipide eluiert. Die lipidhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Um Verunreinigungen wie Proteine zu entfernen, wurde CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1) zugefügt und die Lösung bei 5.000 x g für 10 min zentrifugiert. Diese Extraktion wurde solange wiederholt, bis keine Verunreinigungen mehr auf einem SDS-Gel nachweisbar waren. Lyophilisierte Lipide wurden in 50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 8 aufgenommen und mit Ultraschall behandelt, um eine Suspension zu erhalten.

### 3.2.7 Präparation von Liposomen

Zur Herstellung von Liposomen wurden in der Regel 1250 µl Lipid (20 mg/ml) in Chloroform/Methanol (1:1) in einem 25 ml Kolben vorgegeben. Die Entfernung des Lösungsmittels erfolgte an einem Rotationsverdampfer unter leichtem Heliumstrom. Der Kolben mit dem entstandenen Lipidfilm wurde unter Argon gesetzt und mit 1,25 ml Wasser hydratisiert, so dass eine 20 mg/ml Liposomensuspension entstand. Nach Inkubation bei RT

für 1 h wurde der Kolben in Abständen von 20 min geschwenkt, so dass eine trübe Suspension multilamellarer Liposomen entstand. Zur Herstellung von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUVs) wurde die Liposomensuspension solange in einem Ultraschallbad behandelt, bis diese opaleszent erschien. Das Abtrennen von größeren Lipidfragmenten erfolgte durch Zentrifugation, 15.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge), 15 min, RT.

### 3.2.8 Methylierung des Aspartatrezeptors

Für die Methylierung des Aspartatrezeptors wurde 5 µM rekonstituiertes Protein (in TEDG Puffer) eingesetzt und <sup>3</sup>H-SAM zu 50 µM zu den Proteoliposomen gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von CheR als Lysat (Simms et al., 1987). Die Methylierung war nach 2h bei RT abgeschlossen. Die Experimente wurden in Kooperation mit Sarah Ulbrich durchgeführt (Ulbrich, 2011).

---

#### TEDG Puffer

---

50 mM Tris

2 mM DTT

0,5 mM EDTA

10% Glycerol

pH 7,2

---

### 3.2.9 Fluoreszenzmarkierungen von Proteinen

#### 3.2.9.1 Markierung von Cysteinen

Für die Markierung über eine Cysteinseitenkette wurden 50 µM Proteinlösung mit 500 µM TCEP und einer Spatelspitze des Fluorophors (als Maleimid funktionalisiert) versetzt und über Nacht bei 8°C unter Lichtausschluss und leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl β-Mercaptoethanol gestoppt und freies Fluorophor über eine PD-10 Säule oder eine Superdex 200 Säule abgetrennt.

Bestimmung der Markierungseffizienz nach Zlotnik et al. (2007):

$$[Bodipy] = \frac{A_{504}}{78.000 M^{-1}}$$

$$[Protein] = \frac{A_{280} - [Bodipy] * 1.300 M^{-1}}{\epsilon_{Protein} M^{-1}}$$

Für Bodipy FL ist  $A_{max} = 504 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{max} = 78.000 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und  $\epsilon_{280} = 1.300 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .



### 3.2.9.2 Markierung des N-Terminus

Für die Markierung des N-Terminus wurde das Fluorophor als Succimidylester eingesetzt. Die Proteine wurden in PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 9) umgepuffert, da Tris die Reaktion durch ein freies Amin stören kann. 50 µM Proteinlösung wurden mit 1 Spatelspitze Fluorophor versetzt und für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Abtrennung von freiem Fluorophor erfolgte über eine PD-10 Säule, wobei das Protein in jeweiligem Dialysepuffer aufgenommen wurde.

Bestimmung der Markierungseffizienz (DOL):

$$\frac{\text{moles of dye}}{\text{moles of protein}} = \frac{A_{\max}}{\epsilon_{\max}} \times \frac{MW_{\text{Protein}}}{\text{mg protein/ml}}$$

MW beschreibt das Molekulargewicht des Proteins und A die Absorption beim Absorptionsmaximum des Fluorophors,  $\epsilon$  steht für den Extinktionskoeffizienten des Fluorophors bei seinem Absorptionsmaximum.

Für Alexa 647 ist  $A_{\max} = 650 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{\max} = 239.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und für Alexa 546 ist  $A_{\max} = 554 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{\max} = 112.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.2.10 Cyanylierung von Proteinen über Cysteine

Die Cyanylierung von Cysteinen in Proteinen erfolgte nach Fafarman et al. (2006). Zu einer konzentrierten Proteinlösung in Äquilibriumspuffer wurden 1,1 molare Äquivalente 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (Ellman's Reagenz oder DTNB) gegeben und für 30 min unter Lichtausschluss und leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Die resultierende Lösung wurde mit 20 Äquivalenten KCN versetzt und für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Aufreinigung des cyanylierten Proteins erfolgte über eine PD-10 Entsalzungssäule nach Angaben des Herstellers in Äquilibriumspuffer.

### 3.2.11 Proteolytischer Verdau durch Trypsin

Die Serinprotease Trypsin spaltet Peptidbindungen selektiv nach den Aminosäuren Lysin und Arginin. Die methylierten Proteinproben wurden mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt und die Banden des Zielproteins ausgeschnitten. Durch die Zugabe von Acetonitril wurden die Gelstücke dehydriert (10 min) und mit 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> rehydriert (5 min). Der Überstand wurde verworfen, die Gelstücke an der SpeedVac getrocknet (30 min) und anschließend auf Eis in Verdauungspuffer mit Trypsin inkubiert (45 min).

Danach wurde der Überstand entfernt und Verdauerpuffer ohne Trypsin hinzugegeben (37°C, über Nacht). Das Gelstück wurde durch Zentrifugation (14.000 rpm) vom Überstand getrennt und mehrfach mit Acetonitril gewaschen, um die Peptide auszulösen. Alle Überstände wurden gesammelt, vereinigt und an der SpeedVac getrocknet (60 min). Die Peptide wurden bei -20°C gelagert.

### 3.3. Analytische Methoden

#### 3.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lambert-Beer durchgeführt.

$$A = \varepsilon \times c \times d$$

Wobei A die Absorption,  $\varepsilon$  der Extinktionskoeffizient in  $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$ , c die Konzentration in  $mol \times L^{-1}$  und d die Schichtdicke der Küvette in cm ist.

Für sensorische Proteine wurde ein UV/Vis Spektrum aufgenommen, um zusätzlich die Reinheit aus dem Verhältnis der Absorption am Absorptionsmaximum und der Absorption bei 280 nm zu bestimmen. Ein Wert von 1,3 entspricht einer Reinheit von 95%.

Für NpHtrII, welches einen niedrigen Extinktionskoeffizient bei 280 nm besitzt, wurde die Konzentration nach Ehresmann abgeschätzt (Ehresmann et al., 1973).

$$c \left( \frac{mg}{ml} \right) = \frac{A_{228,5} - A_{234,5}}{3,14}$$

Hierbei ist A die Absorption und c die Konzentration.

#### 3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Analyse von Proteinen erfolgte nach der Methode von Schagger und Jagow (1987) unter Verwendung der denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6,8, 6% (w/v) SDS, 30% (w/v) Glycerin, 300 mM Monothioglycerol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau (für 2 × Probenpuffer)) versetzt und auf 0,75 mm dicke 12%ige Acrylamidgele gegeben.

12%iges Trenngel		4%iges Sammelgel	
	1 Gel		1 Gel
30% Acrylamid	1.5 ml	30% Acrylamid	0.296 ml
S. und J. Gelpuffer (3 M Tris, 0,01 M SDS, pH 8,45)	1.25 ml	S. und J. Gelpuffer (3 M Tris, 0,01 M SDS, pH 8,45)	0.6 ml
H <sub>2</sub> O	1 ml	H <sub>2</sub> O	1.334 ml
10% APS	19 µl	10% APS	12.5 µl
TEMED	2 µl	TEMED	1 µl

Durch Anlegen einer äußeren Spannung wurden die Proben bei 80 V in das Sammelgel eingeleitet. Die Trennung der Proteine erfolgte mit einer Spannung von 120 V (Anodenpuffer: 200 mM Tris, pH 8,9; Kathodenpuffer: 100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,25).

#### *Coomassie Blue Färbung:*

Das Anfärben der Proteinbanden im Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue R250 (Färbelösung: 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 10% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) Methanol; Entfärbelösung: 10% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) Methanol) erreicht.

Gele mit <sup>3</sup>H markierten Proben wurden in 10% Essigsäure für 10 Minuten fixiert, für 30 min in ENLIGHTNING Lösung inkubiert und auf Whatman Papier für 1 h auf dem Gelrockner getrocknet. Zur Detektion der markierten Proteinbanden wurde ein Film bei -80°C für 4-7 Tage mit dem Gel belichtet.

Zur Quantifizierung der Radioaktivität wurde eine Gelbande aus dem getrockneten Gel herausgeschnitten und in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde offen in ein Szintillationsröhrchen mit 2,4 ml Szintillationsflüssigkeit gestellt. Die Gelbande wurde mit 100 µl 1 M NaOH inkubiert, das Szintillationsröhrchen mit Parafilm verschlossen und für 48 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Die Radioaktivität wurde mittels Szintillationszähler gemessen (Chelsky et al., 1984).

### **3.3.3 Western-Transfer und Immunnachweis**

Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran mit einem Semidry Blotter (20 min bei 5 mA/cm<sup>2</sup>) transferiert (Anodenblotpuffer: 300 mM Tris, 100 mM Tricin, pH 8,7 – 8,8; Kathodenblotpuffer: 30 mM Tris, 300 mM 6-Amino-ε-kapronsäure, pH 8,6 – 8,7). Der Proteintransfer auf die Membran wurde durch reversibles

Anfärben mit dem Farbstoff Ponceau Rot (Ponceau Rot Lösung: 3% (w/v) TCA, 0,2% (w/v) Ponceau Rot), der durch Waschen der Membran in H<sub>2</sub>O wieder entfernt werden kann, überprüft.

Die Membran wurde mit 5% (w/v) fettfreiem Milchpulver in TBS-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) über Nacht bei 8°C unter Schütteln blockiert. Die erste Antikörper-Lösung (Maus-Anti-His-IgG (Sigma, Steinheim) in 5% (w/v) Milchpulver in TBS-Puffer) wurde für eine Stunde mit der Membran unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-mal für 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen (TBST-Puffer: TBS-Puffer + 0,1% Tween 20). Der 2. Antikörper (Ziege-Anti-Maus-IgG-HRP (Boehringer, Mannheim)) wurde unter Schütteln in TBST-Puffer mit der Membran für 1 Stunde inkubiert und ebenfalls wie oben beschrieben gewaschen. Mit Hilfe des Chemolumineszenz Western-Blotting-Kit wurde die Detektion auf Röntgenfilm mit einer Belichtungszeit von 30 Sekunden bis 10 min durchgeführt.

### 3.3.4 *blue native* Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteinkomplexe und Oligomere detektiert werden, da eine Denaturierung der Proteine nicht erforderlich ist (Schägger und Jagow, 1991). Hierzu kam ein diskontinuierliches 4% -16%iges Bis-Tris Gel (Invitrogen) zum Einsatz. Die Proben wurden mit 10x Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen.

Anodenpuffer	Kathodenpuffer	Auftragspuffer
50 mM Bis Tris pH 7	50 mM Tricin 15 mM Bis Tris 0,02% Coomassie Serva blue G pH 7	50 mM Bis Tris 5 % Coomassie Blue G 0,5 M ε-Aminocapron- säure pH 7

Durch Anlegen einer äußeren Spannung wurde das Gel bei 150 V und 8°C für 5 h laufen gelassen. Danach wurde das Gel für 15 min mit 40% Methanol/ 10% Essigsäure fixiert und in 10% Essigsäure entfärbt.

### 3.3.5 Massenspektrometrie

Für die MALDI Massenspektrometrie müssen Proteinproben, die Detergenzien enthalten, zunächst gefällt werden. Dies erfolgte über die Extraktion mit Methanol/Chloroform. 100 µl Proteinlösung wurden mit 400 µl Methanol, 100 µl Chloroform und 300 µl H<sub>2</sub>O (alle Lösungen

eiskalt) versetzt und gemischt. Nach Zentrifugation (15.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge), 5 min, RT) wurde die obere Phase verworfen und mit 300 µl Methanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 % Ameisensäure zu einer Konzentration von 1 mg/ml aufgenommen (Wessel et al., 1984).

Zur Vorbereitung der Matrix wurde eine Spatelspitze 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in 50 % H<sub>2</sub>O, 50 % MeCN und 0,1 % TFA gelöst, bis eine gesättigte Lösung entstand. Die Probenvorbereitung erfolgte durch Kokristallisation von 1 µl Matrix und 1 µl Proteinlösung auf einer MALDI Goldplatte.

### 3.4 Chemische Methoden

Verwendete Peptide:

SVCAIL (zur Verfügung gestellt von Sascha Gentz, MPI Dortmund)

SVF<sub>(CN)</sub>AIL (zur Verfügung gestellt von Sascha Gentz, MPI Dortmund)

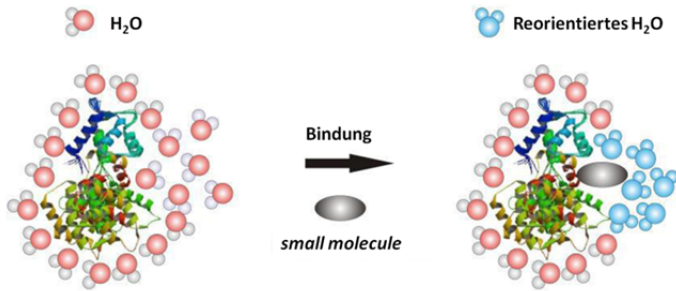
#### 3.4.1 Cyanylierung

Die verwendeten Peptide wurden zu einer Konzentration von 20 mM in 1 M Ammoniumcarbonat pH 9,5 gelöst. Nach Zugabe von 1,2 Äquivalenten Ellman's Reagenz (DNTB) wurde für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln und Lichtausschluss inkubiert. Die Lösung wurde über Nacht lyophilisiert. Das Reaktionsintermediat wurde in H<sub>2</sub>O gelöst und mit 10 Äquivalenten Kaliumcyanat für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln umgesetzt. Die Aufreinigung des cyanylierten Peptids erfolgte mittels HPLC über eine C-18 Säule, wobei ein Gradient von 5% - 60% Acetonitril in H<sub>2</sub>O mit 0,1% TFA in 30 min gefahren wurde (Fafarman et al., 2006). Die Reaktion wurde bei 214 nm verfolgt. Die Reaktionskontrolle erfolgte über Massenbestimmung mittels ESI.

### 3.5 Biophysikalische Methoden

#### 3.5.1 Optische mikroskalige Thermophorese (MST)

Die gerichtete Bewegung von Teilchen in einer Flüssigkeit entlang eines Temperaturgradienten wird als Thermophorese bezeichnet. Thermodiffusion in Flüssigkeiten ist noch immer Gegenstand der aktuellen Forschung. Mit Hilfe der MST lassen sich Größenänderungen und die Veränderung der Hydrathülle und Ladung der Moleküle detektieren. Die Grundlage zur Erklärung der Thermophorese liegt in der Oberflächenenergie zwischen Molekül und Lösungsmittel (Abbildung 8).



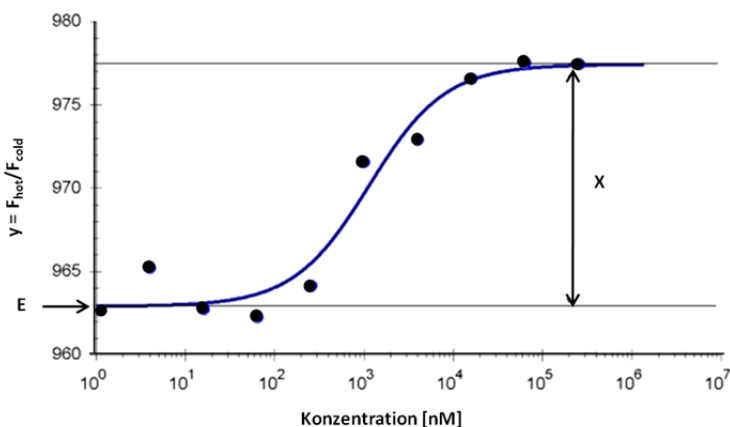
**Abbildung 8:** Veränderung in der Hydrathülle nach Bindung eines *small molecules* (Nano Temper GmbH, modifiziert).

Ein IR Laser erzeugt einen Temperaturgradienten und die Änderung in der Molekülkonzentration kann mittels Fluoreszenzmikroskopie über eine Fluoreszenzmarkierung am Molekül gemessen werden. Wenn Moleküle aneinander binden, verändert sich ihre thermophoretische Bewegung, so dass sich die Bindungsstärke berechnen lässt.

Die Messung erfolgt über die Bestimmung der Veränderung in der Fluoreszenz des zu untersuchenden, fluoreszenzmarkierten Moleküls. Die Ausgangsfluoreszenzintensität wird als  $F_{\text{cold}}$  bezeichnet und die Fluoreszenzintensität, welche im Gleichgewichtszustand vorliegt, als  $F_{\text{hot}}$ . Für die normierte Fluoreszenz gilt:

$$F_{\text{norm}} = \frac{F_{\text{hot}}}{F_{\text{cold}}}$$

Eine typische Messkurve enthält Informationen über die Komplexdissoziationskonstante (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Parameterbezeichnung zur Auswertung der Thermophoresemessungen (Nano Temper GmbH, modifiziert).

Die Komplexdissoziationskonstante  $k_D$  kann wie folgt berechnet werden:

$$y = \frac{[AB]}{[B]} = \frac{[A] + [B] + k_D - \sqrt{([A] + [B] + k_D)^2 - 4[AB]}}{2[B]}$$

$y$  beschreibt die Thermophorese,  $[AB]$  die Konzentration der gebundenen Komplexes,  $[A]$  die Konzentration des variablen Bindungspartners,  $[B]$  steht für die Konzentration des konstanten Bindungspartners und  $k_D$  für die Komplexdissoziationskonstante (Seidel et al., 2013).

Für die Messungen der Thermophorese lag ein Bindungspartner N-terminal fluoreszenzmarkiert und der andere Bindungspartner unmarkiert im gleichen Puffer vor. Die Konzentration des markierten Bindungspartners wurde konstant gehalten und der unmarkierte in einer Verdünnungsreihe dazu titriert. Die Lösungen wurden auf hydrophile Kapillare (Nanotemper (München)) aufgezogen und bei unterschiedlichen Laserintensitäten vermessen. Die Fluoreszenzanregung der Proteine erfolgte mit Hilfe einer LED und die Erzeugung eines Temperaturgradienten mit einem Infrarotlaser.

Vor Start der Messungen wurde die Fluoreszenzintensität auf Gleichmäßigkeit beobachtet. Darauf wurde die Fluoreszenz im Grundzustand gemessen und im Anschluss der Laser eingeschaltet, was eine Diffusion aus dem beobachteten Bereich zur Folge hatte. Dieser Effekt ist auf eine erhöhte Brown'sche Molekularbewegung zurückzuführen. Daraufhin kommt es zur Thermophorese, wobei sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Effekten einstellt, was in einer gleichbleibenden Fluoreszenzintensität beobachtet werden kann. Nach dem Abschalten des Lasers, kam es zur Rückdiffusion der Proteine.

Die Messungen wurden an einem Monolith NT.015T der Firma Nanotemper unter Anleitung von Silke Kerruth (AG Prof. Heberle, FU Berlin) in Kooperation mit Arne Bothe (Bothe, 2011) durchgeführt.

### 3.5.2 Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie (ESR)

Mittels ESR Spektroskopie lassen sich paramagnetische Substanzen untersuchen. Für die Untersuchungen an Proteinen können stabile Spinmarkierungen eingeführt werden, was die Untersuchung von Struktur und Dynamik erlaubt. Die Probe wird in ein homogenes Magnetfeld eingebracht und mit Mikrowellen konstanter Frequenz bestrahlt. Das magnetische Moment des ungepaarten Elektrons tritt dabei in Wechselwirkung mit dem äußeren Magnetfeld. Nach Einstrahlung von Mikrowellen können Elektronen in ein höheres Energieniveau angehoben werden, so dass es zur Absorption der eingestrahltten elektromagnetischen Energie kommt. Als ESR Spektrum wird die erste Ableitung des Absorptionsspektrums verwendet. Durch Wechselwirkungen der magnetischen Momente

des ungepaarten Elektrons mit benachbarten Kernspins kommt es zu einer Hyperfeinwechselwirkung, was zur weiteren Aufspaltung der ESR Linien führt. Da das ESR Spektrum deutliche Unterschiede zwischen einer stark immobilisierten Spinsonde und einer frei beweglichen Sonde aufweist, können Veränderungen beispielsweise durch Ligandenbindung detektiert werden (Winter und Noll, 1998).

Die Messungen erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Steinhoff unter Anleitung von Ioan Orban (Universität Osnabrück) an selbstgebaute X-Band Spektrometern. Die Proben wurden wie in 3.2.4 und 3.2.5 beschrieben vorbereitet und bis zu ihrer Vermessung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.5.3 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR)

Die IR-Spektroskopie ist sowohl zur Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen als auch zur Untersuchung eines Reaktionsmechanismus einsetzbar. Des Weiteren kann mittels IR-Spektroskopie die Veränderung in der Proteinstruktur verfolgt werden (Vogel und Siebert, 2000). Um strukturelle oder elektrostatische Veränderungen im Protein zu untersuchen, können IR Sonden an ausgesuchten Positionen im Protein eingebracht werden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde eine Cyanogruppe ( $\text{C}\equiv\text{N}$ , Nitril) gewählt, da diese in einem Bereich absorbiert, in dem keine Absorptionsbanden von Schwingungsmoden des Proteins liegen.

Die Proteine und Peptide wurden wie in 3.2.10 und 3.4.1 beschrieben cyaniliert, um eine IR Sonde einführen zu können. Die Proteine und Peptide wurden in 10 mM NaCl, 10 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 8, aufgenommen. Die Probe wurde als Film aufgetrocknet und vermessen. Die Messung wurden von Hendrik Mohrmann und Michael Schlegler aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heberle (FU Berlin) durchgeführt.

### 3.5.4 Circular-Dichroismus Spektroskopie

Mittels CD-Spektroskopie kann der Anteil der Sekundärstrukturelemente eines Proteins bestimmt werden. Diese Methode wurde verwendet, um die korrekte Faltung verkürzter Rezeptoren zu überprüfen.

CD-Spektren wurden an einem J - 720 Spektrometer (Jasco, Tokio, Japan) in einer 0,1 cm Quarzküvette aufgenommen. Der Wellenlängenbereich betrug 190 nm – 260 nm. Die Scangeschwindigkeit wurde auf 50 nm/min eingestellt, die Bandbreite auf 1 nm, die Empfindlichkeit auf 100 mdeg und die Auflösung auf 0,1 nm gesetzt. Für die Aufnahme eines Pufferspektrums und für die Proteinproben wurden 10 Messungen akkumuliert und gemittelt.



Die Konzentration der Proteinproben betrug 0,15 mg/ml in 20 mM NaP<sub>i</sub>, 100 mM NaCl, 0,1 % DDM, pH 7,2.

### 3.5.5 Festkörper NMR Spektroskopie (solid state NMR, ssNMR)

Mittels Festkörper NMR ist es möglich, Membranproteine in ihrer natürlichen Lipidumgebung zu untersuchen.

Festkörper NMR Messungen wurden an der Universität von Utrecht (NL) in der Arbeitsgruppe von Prof. Marc Baldus von Sabine Gradmann (Gradmann, 2013) durchgeführt. Die Proteine wurden wie unter 3.2 exprimiert, aufgereinigt und rekonstituiert (in DMPC). Für Experimente mit zellulärem NpSR<sub>II</sub> wurde Minimalmedium wie in 3.2.1 beschrieben zur Expression verwendet. Das Zellwachstum und die Expression erfolgten in markiertem Medium. In einem zweiten Ansatz wurden Zellen in unmarkiertem Medium angezogen und bei Induktion der Expression in isotoopenmarkiertes Medium überführt.

### 3.5.6 Fluoreszenzspektroskopie

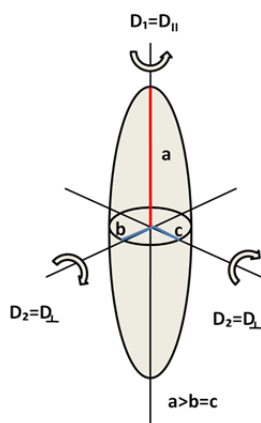
Die Fluoreszenzspektroskopie macht sich die spontane Emission von Licht eines photochemisch angeregten Moleküls, welches in den energetischen Grundzustand zurückfällt, zunutze.

Zur Aufnahme von Emissionsspektren am FluoroMax 3 (Horiba Jobin Yvon Inc. (Edison, U.S.A.)) wurde eine 10 mm Quarzküvette (Hellma (Müllheim)) verwendet, die eine Durchmischung der Proben durch Rühren erlaubte. Rekonstituierte Proben wurden sorgfältig resuspendiert, um eine Streuung an größeren Partikeln in der Suspension zu verhindern.

### 3.5.7 Fluoreszenzanisotropie

Bei der Fluoreszenzanisotropie bzw. Fluoreszenzdepolarisation werden Biomoleküle mit linear polarisiertem Licht bestrahlt, wobei aus der Analyse des Fluoreszenzlichtes Schlüsse auf die Rotationsbeweglichkeit von Chromophoren, deren Orientierung und die Viskosität der Umgebung gezogen werden können. Es wird der Einfluss der Rotation eines Moleküls in der Zeitspanne der Fluoreszenzlebensdauer untersucht (Winter und Noll, 1998).

Diese Methode wurde gewählt, um Informationen über die Oligomerisierung von Tar und Tar $\Delta$  zu erlangen. Die Rotationskorrelationszeit hängt von der Größe des Moleküls ab, so dass abgeschätzt werden kann, welches Molekulargewicht das untersuchte Molekül besitzt. Bei den Proteinen Tar und Tar $\Delta$  wurde von einem gestreckten Ellipsoid mit zwei unterschiedlichen Symmetrieachsen ausgegangen (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung eines gestreckten Ellipsoids. Die Symmetrieachsen B und C sind gleich lang, wobei die Symmetrieachse A länger ist als B und C (*Prolate ellipsoid of revolution*) (modifiziert nach Lakowicz, 2006).

Lakowicz hat für diese Ellipsoide eine Tabelle angefertigt, in der Rotationskorrelationszeiten für Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten aufgelistet sind (Tabelle 3).

Für die Messungen wurde eine verdünnte Tar-Bodipy Lösung verwendet. Die Markierung erfolgte wie in 3.2.9.1 beschrieben. Nach Aufreinigung über eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60 Superdex 200) wurde die Reinheit auf einem SDS-Polyacrylamid Gel kontrolliert und die Markierungseffizienz bestimmt. Die Messung erfolgte an einem K2 Multifrequenz Phasen und Modulationsfluorometer (ISS, Champaign, IL) bei 25 °C in einer 2 ml Quarzküvette in der Arbeitsgruppe von Prof. Winter unter Anleitung von Alexander Werkmüller (TU Dortmund). Die Probe wurde auf eine Bodipy Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  verdünnt. Als Referenz diente eine Bodipy-Lösung in MeOH. Die Anregung von Bodipy erfolgte durch eine 473 nm Laserdiode und die Emission wurde durch einen Filter bei 505 nm gemessen.

### 3.5.8 Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS)

Mit Hilfe von SAXS können Aussagen über die Struktur von Proteinen in Lösung getroffen werden, wobei keine Markierung der Moleküle nötig ist. Dabei wird die Intensität der gestreuten Strahlung bei einem Streuwinkel von  $2\Theta$  gemessen. Das Streubild gibt Aufschluss über Umriss und Gestalt der Proteine, jedoch nicht in atomarer Auflösung (Winter und Noll, 1998; Jeworrek, 2011). Aus der Streukurve lässt sich eine Abstandsverteilungskurve berechnen, welche die Häufigkeit der Abstände im Molekül widerspiegelt. Auf Grund dieser Informationen wurden *ab initio* Berechnungen durchgeführt, um die Elektronendichte der Proteine zu erhalten.

SAXS Messungen wurden am ESRF in Grenoble (Frankreich), Strahllinie ID02 von Christoph Jeworrek (TU Dortmund) aus der Gruppe von Prof. Dr. R. Winter durchgeführt. Es wurden monodisperse, solubilisierte Proteinlösungen in Konzentrationen von 0,6% – 0,1% (w/v) in 300 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,05% DDM, pH 7,2, vermessen.

## 4 Ergebnisse

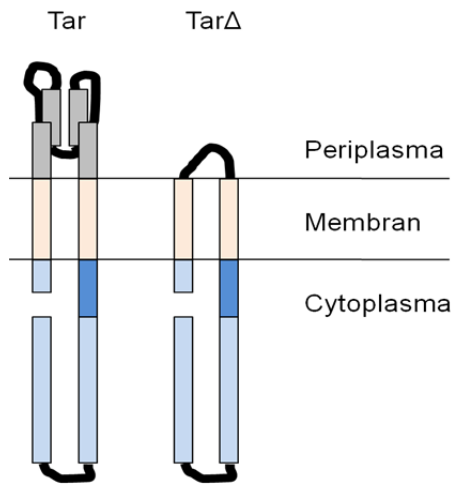
Für die Untersuchungen der Signaltransduktion und der Signalamplifikation wurden zunächst die benötigten Proteinkonstrukte hergestellt. Darauf folgten Gelfiltrationsanalysen zur Charakterisierung des Oligomerisierungszustandes des Aspartatrezeptors, sowie Fluoreszenzpolarisationsmessungen und SAXS Untersuchungen. Zur Untersuchung der Signaltransduktion und Signalverstärkung wurden Methylierungsexperimente und ESR Messungen durchgeführt. Es folgten Untersuchungen mittels Thermophorese an Tar und HsHtrII sowie FTIR und ssNMR Messungen an NpSRII um diese Methoden auf Anwendbarkeit bei diesen Membranproteinen zu prüfen.

### 4.1 Klonierung, Expression, Aufreinigung und Nachweis der Proteine

Alle Proteinkonstrukte lagen zunächst im pET27bmod Vektor vor. Die Genexpression steht unter Kontrolle des T7 Promotors. Für die Aufreinigung der Proteinkonstrukte wurde ein sechsfacher Histidin Tag verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verkürzte Konstrukte und Proteine mit Cysteinmutationen kloniert. Im Folgenden wird die Klonierungsstrategie der verwendeten Konstrukte erläutert.

#### 4.1.1 Klonierung des Aspartatrezeptors aus *E. coli*

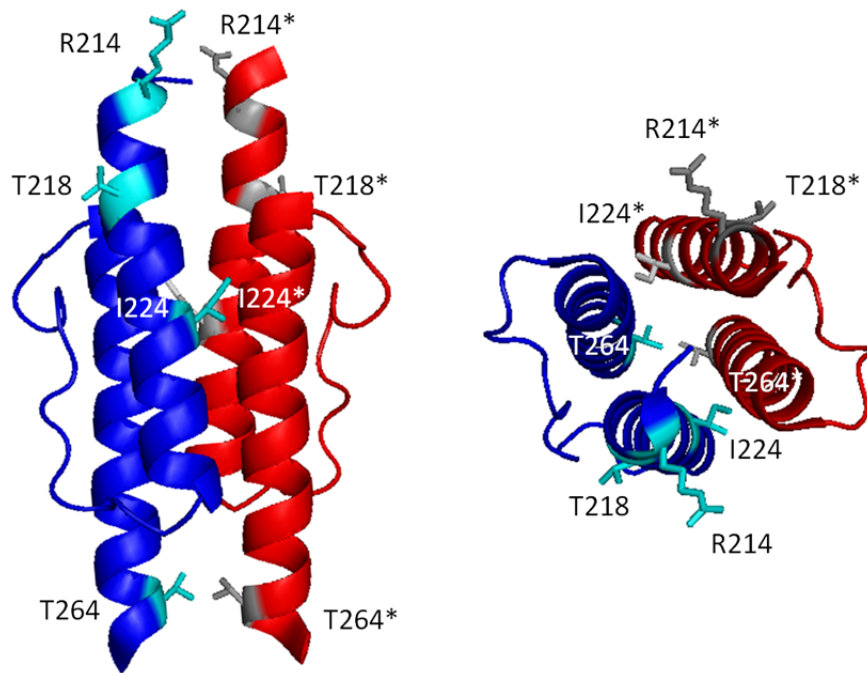
Der Aspartatrezeptor lag als Vollängenkonstrukt im pET27bmod Vektor mit C-terminalem Histidin-Anker vor. Für die Klonierung des Aspartatrezeptors, welchem die Ligandenbindedomäne (LBD) fehlt (Tar $\Delta$ ), wurden die Fragmente Tar1-33 und Tar191-553 mit der Linkersequenz (VTAAAATGDAAAVQEA) aus dem Protein NpHtrII verbunden (Abbildung 11). Dies sollte die richtige Einlagerung und Faltung in die Membran sicherstellen. Der Histidin-Tag wurde durch einen StrepII Tag und eine vorgelagerte TEV-Schnittstelle ersetzt. Die durch PCR amplifizierten Fragmente wurden mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen am 5' Ende (NcoI) und am 3' Ende (HindIII) in den pET27bmod Vektor wieder einkloniert.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Proteinkonstrukte Tar und Tar $\Delta$  (ohne LBD). Die cytoplasmatischen Domänen sind in hellblau, die membrandurchspannende Domäne in orange, die im Periplasma liegende Ligandenbindedomäne in grau und die HAMP Domäne in dunkelblau dargestellt.

Ein weiteres Konstrukt wurde vom pET27bmod Vektor in den pTXB3 Vektor kloniert. Das Protein Tar bzw. Tar $\Delta$  wird als Fusionsprotein mit einem Mxe Intein und einer chitinbindenden Domäne zur Aufreinigung exprimiert. Das Protein kann mit Hilfe von Thiolen von dem Intein abgespalten werden und liegt mit freiem C-Terminus vor. Der C-Terminus des Proteins ist somit frei zugänglich und wird nicht durch eine Affinitätssequenz blockiert.

Um gezielt Marker und Sonden in das Protein einführen zu können, wurden ausgewählte Positionen zu Cysteinen mutiert. Dies ermöglicht die Kopplung von beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffen über eine Maleimidfunktion an die Seitenkette des Proteins. Für die Einführung von Cysteinen in die HAMP Domäne des Tar Rezeptors (Tar und Tar $\Delta$ ), wurde die *overlap extension* Methode verwendet (Ho et al., 1989). Die Bezeichnung der Aminosäurepositionen wurde auf den Vollängenrezeptor bezogen. Im Anhang sind die entsprechenden Positionen in Tar $\Delta$  tabellarisch aufgeführt.



**Abbildung 12:** Struktur der HAMP Domäne aus Af1503 von *A. fulgidus* (PDB2L7H, modifiziert). Dargestellt sind das Dimer und die korrespondierenden Aminosäuren der HAMP Domäne des Aspartatrezeptors, welche zu Cysteinen mutiert wurden. Die HAMP Domäne eines Monomers ist blau bzw. rot gekennzeichnet. Die Seitenansicht auf die HAMP Domäne ist links und die Aufsicht rechts dargestellt.

Die Struktur der HAMP Domäne aus dem Protein Af1503 aus *A. fulgidus* wurde zu Grunde gelegt, da in einer Studie von Swain und Falke (2007) nachgewiesen werden konnte, dass die Domäne aus Af1503 analog zu HAMP aus *Tar* aufgebaut ist.

Einige Aminosäurepositionen, die an der Kontaktfläche liegen, sind nicht zur Einführung von Cysteinen geeignet, da die Funktionalität der HAMP Domäne stark beeinträchtigt oder auch völlig unterbunden wird (Zhou et al., 2009). Daher bleiben einige Cysteinmutanten im Aspartatrezeptor bei dieser Arbeit unberücksichtigt.

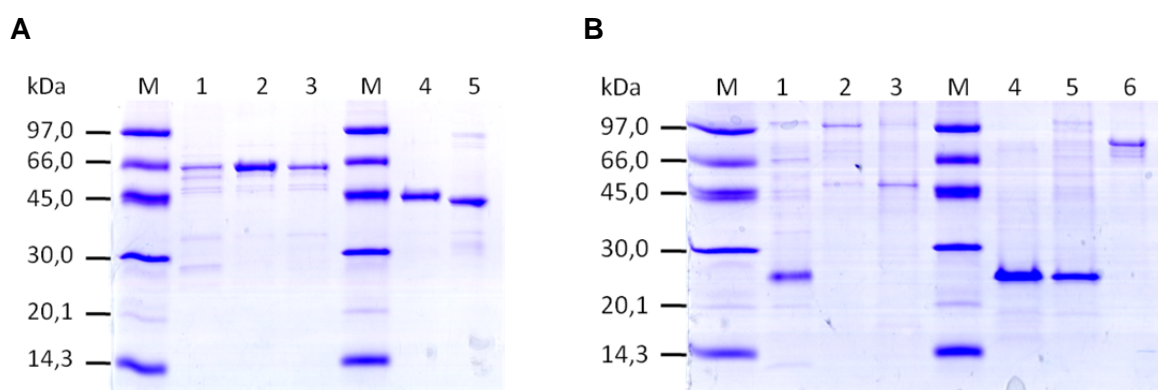
Die Position von Arginin 214 liegt am N-Terminus der HAMP Domäne (Abbildung 12). Der Aminosäurerest liegt aussen, in der Nähe der Periplasmamembran. Auch die Aminosäureseitenkette von Threonin 218 zeigt nach außen und liegt etwas weiter von der Membran entfernt im Cytoplasma. Die Aminosäure Isoleucin 224 ist in das Innere des Proteins gerichtet und liegt an der Kontaktfläche des Bündels aus vier Helizes. Threonin 264 befindet sich am C-terminalen Ende der HAMP Sequenz. Die Aminosäureseitenketten zeigen zueinander, liegen jedoch nicht in der Berührungsfäche der vier Helizes.

#### 4.1.2 Klonierung des Transducers aus *H. salinarum*

Für die Untersuchungen am Protein HsHtrII wurde ein Vollängenkonstrukt und ein verkürzter Rezeptor verwendet. Untersuchungen von Kim (2010) ergaben, dass HsHtrII398 eine dem Vollängenrezeptor sehr ähnliche Bindungskonstante zu seinem sensorischen Protein HsSRII aufweist. Da der verkürzte Rezeptor höhere Ausbeuten bei Expression und Aufreinigung aufwies, wurde der verkürzte Rezeptor gewählt, um Cysteine an den Positionen I298 und V302 einzuführen. An die Seitenketten soll zur Aufklärung der Signalweiterleitung in HsHtrII eine Spinsonde eingebracht werden. Die Positionen I298 und V302 in HsHtrII sind analog zu den Positionen V78 und L82 in NpHtrII, an denen schon Untersuchungen zur Signalweiterleitung erfolgten (Wegener et al., 2001). Sowohl der Vollängenrezeptor (HsHtrII) und ein verkürztes Konstrukt (HsHtrII398) lagen im Vektor pET27bmod vor. Es wurde die *overlap extension* Methode verwendet, um die Mutationen I298C und V302C einzuführen (Ho et al., 1989).

#### 4.1.3 Aufreinigung des Aspartatrezeptors, Transducers und der sensorischen Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden wie in 3.2.1 beschrieben exprimiert und, wie in 3.2.3 dargestellt, aufgereinigt. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels SDS PAGE überprüft.



**Abbildung 13:** 12%iges SDS-Polyacrylamid Gel (Coomassie gefärbt) der verwendeten Proteinkonstrukte. (A) Aufgereinigte Tar-Konstrukte aus *E. coli* (M: LMW Marker, 1: Tar-His, 2: Tar-StrepII, 3: Tar, 4: Tar $\Delta$ -StrepII und 5: Tar $\Delta$ ). (B) Aufgereinigte SRII und HtrII Konstrukte aus *N. pharaonis* und *H. salinarum* (M: LMW Marker, 1: HsSRII-His, 2: HsHtrII-His, 3: HsHtrII398-His, 4: NpSRII-His, 5: [ $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-NpSRII-His und 6: NpHtrII-His).

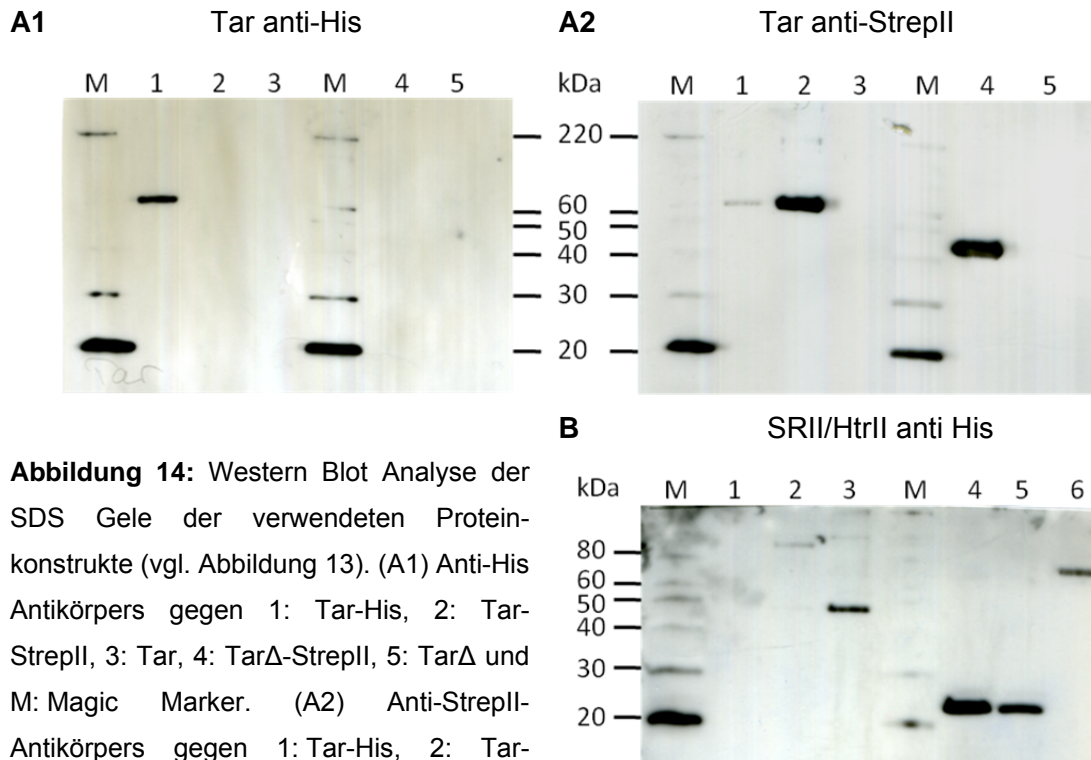
Abbildung 13 A zeigt in Spur 1 Tar-His, in Spur 2 ist Tar-StrepII abgebildet und in Spur 3 läuft Tar, welches über ein Intein mit CBD aufgereinigt wurde. Die Proteine laufen alle etwas unter

der 66 kDa Markerbande und lassen sich den Zielproteinen Tar-His (61 kDa), Tar-StrepII (62 kDa) und Tar (60 kDa) zuordnen.

Abbildung 13B zeigt die aufgereinigten Proteinkonstrukte der sensorischen Rhodopsine und der Transducer. In Spur 1 wurde HsSRII-His aufgetragen. Die Proteinbande befindet sich etwas unter der 30 kDa Markerbande und kann dem Zielprotein (29 kDa) zugeordnet werden. In Spur 2 wurde HsHtrII-His aufgetragen und eine Proteinbande in der Höhe von ca. 97 kDa ist zu erkennen. Die theoretische Masse von HsHtrII-His beträgt 80 kDa und somit läuft das Protein sehr viel höher als erwartet. In Spur 3 wurde das Konstrukt HsHtrII398-His aufgetragen, welches bei 45 kDa läuft (berechnete Masse: 43 kDa). Zusätzlich wurde für die sensorischen Rhodopsine ein UV/Vis Spektrum zur Bestimmung der Reinheit aufgenommen (vgl. 3.3.1). Die Reinheit der sensorischen Proteine lag bei über 90%. In Spur 4 und 5 wurden NpSRII-His und [ $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-NpSRII-His aufgetragen, welche bei ca. 25 kDa laufen. Die berechneten Massen betragen 27 kDa und 30 kDa. Die Proteine laufen bei etwas niedrigeren Größen als erwartet. Der Transducer NpHtrII-His läuft in Spur 6 bei ca. 80 kDa. Die theoretische Masse beträgt 58 kDa, womit der Transducer höher als erwartet läuft. Die Ausbeuten der Aufreinigung sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

#### 4.1.4 Nachweis des Aspartatrezeptors, Transducers und der sensorischen Proteine

In Spur 1 ist Tar-His aufgetragen und mittels Western Blot Analyse nachweisbar (Abbildung 14 A1). Die Western Blot Analyse, welche in A2 dargestellt ist, wurde gegen den StrepII Tag mittels Anti-StrepII-Antikörper durchgeführt. In Spur 2 und Spur 4 ist deutlich der Nachweis von Tar-StrepII und Tar $\Delta$ -StrepII auf der Höhe von 60 bzw. 45 kDa zu erkennen. Die in B gezeigte Analyse gegen den Histidin-Tag lässt deutlich Banden in Spur 2, 3, 4, 5 und 6 erkennen. In Spur 2 ist eine eher schwache Bande auf der Höhe von 100 kDa erkennbar, welche HsHtrII-His zu zuordnen ist. In Spur 3 ist eine Bande bei einer Größe von 50 kDa sichtbar, welche HsHtrII398-His entspricht. In Spur 4 und 5 laufen NpSRII und isotopen markiertes NpSRII bei ca. 25 kDa. In Spur 6 ist NpHtrII-His bei einer Größe von ca. 80 kDa nachweisbar. HsSRII-His (Spur 1) ist mittels Anti-His Antikörper nicht zu detektieren. Da die Aufreinigung über eine Nickel-funktionalisierte Säule erfolgt, welche mit Poly-Histidinen interagiert, ist es nicht erklärbar, warum kein Nachweis möglich ist. Die Übertragung auf die Blotmembran wurde mit Ponceau Rot geprüft. Es lässt sich festhalten, dass alle anderen Proteine in ausreichender Reinheit aufgereinigt und nachgewiesen wurden.



**Abbildung 14:** Western Blot Analyse der SDS Gele der verwendeten Protein-konstrukte (vgl. Abbildung 13). (A1) Anti-His Antikörpers gegen 1: Tar-His, 2: Tar-StrepII, 3: Tar, 4: Tar $\Delta$ -StrepII, 5: Tar $\Delta$  und M: Magic Marker. (A2) Anti-StrepII-Antikörpers gegen 1: Tar-His, 2: Tar-StrepII, 3: Tar, 4: Tar $\Delta$ -StrepII, 5: Tar $\Delta$  und M: Magic Marker. (B) Anti-His Antikörpers gegen 1: HsSRII-His, 2: HsHtrII-His, 3: HsHtrII398-His, 4: NpSRII-His, 5: [ $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-NpSRII-His, 6: NpHtrII-His und M: Magic Marker.

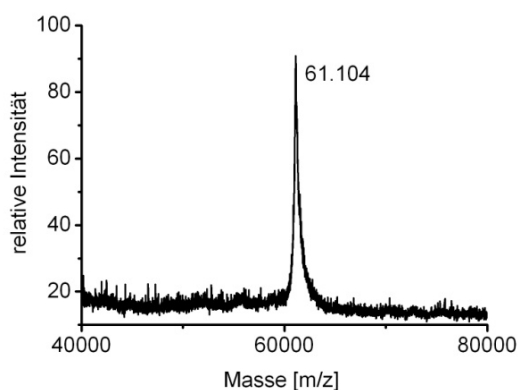
Gezeigt sind die Proteinausbeuten bezogen auf einen Liter Expressionskultur (Tabelle 1). Im Durchschnitt liegt die Ausbeute zwischen 1 und 2 mg /L Kultur. Für Membranproteine, die oft schwieriger zu exprimieren und aufzureinigen sind als lösliche Proteine, ist dies ein zu erwartender Wert. Auffällig ist, dass durch die Verwendung eines anderen Vektors (pTXB3) mit Intein eine Steigerung der Ausbeute von Tar um den Faktor 3 erzielt werden konnte. Tar-His liefert eine Ausbeute von 1,5 mg/L Kultur wohin gegen die Ausbeute von Tar bei 5,2 mg/L liegt. Auffällig ist des Weiteren, dass die Ausbeuten von Tar $\Delta$  mit 20 mg/L deutlich über dem Durchschnitt liegen. Zur Übersicht wurden das Molekulargewicht und der Extinktionskoeffizient ebenfalls aufgelistet. Die Werte wurden zur Konzentrationsberechnung nach Lambert Beer verwendet.



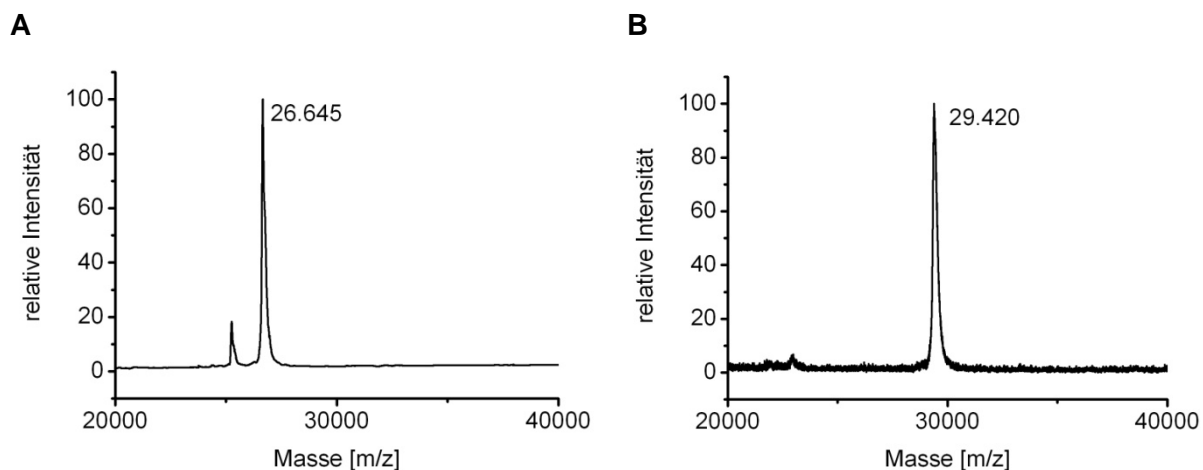
**Tabelle 1:** Proteinausbeuten der verwendeten Proteinkonstrukte.

Protein	Expressionsausbeute [mg/L Kultur]	Molekulargewicht [Da]	Extinktionskoeffizient [L x mol <sup>-1</sup> x cm <sup>-1</sup> ]
Tar-His	1,5	61.057	39.880 (280 nm)
Tar-StreptII	1,9	62.247	46.870 (280 nm)
Tar	5,2	59.930	39.880 (280 nm)
Tar $\Delta$ -StreptII	20	45.221	26.470 (280 nm)
Tar $\Delta$	22	42.816	19.480 (280 nm)
HsSRII-His	0,7	28.805	48.000 (478 nm)
HsHtrII-His	1,8	80.609	29.910 (280 nm)
HsHtrII <sub>398</sub> -His	1,1	43.113	26.930 (280 nm)
NpSRII-His	1,4	26.645	40.000 (498 nm)
[ <sup>2</sup> H, <sup>13</sup> C]-NpSRII-His	3,2	29.881	40.000 (498 nm)
NpHtrII-His	1,0	57.897	4.470 (280 nm)

Zum Nachweis von Tar-His wurde ein MALDI-MS Spektrum aufgenommen.

**Abbildung 15:** MALDI-MS Spektrum von aufgereinigtem Tar-His.

Gezeigt ist ein MALDI-MS Spektrum mit einem Peak bei einer Masse von 61.104 Da (Abbildung 15). Die theoretische Masse von Tar-His beträgt 61.057 Da, so dass ein Massenunterschied von 47 Da besteht. Dieser kann durch die Addition von 2 Natrium (je 22) reduziert werden. Die restliche Abweichung kann einer Messungenauigkeit zugeschrieben werden.



**Abbildung 16:** MALDI-MS Spektrum von aufgereinigtem NpSRII-His (A) und [ $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-NpSRII-His (B).

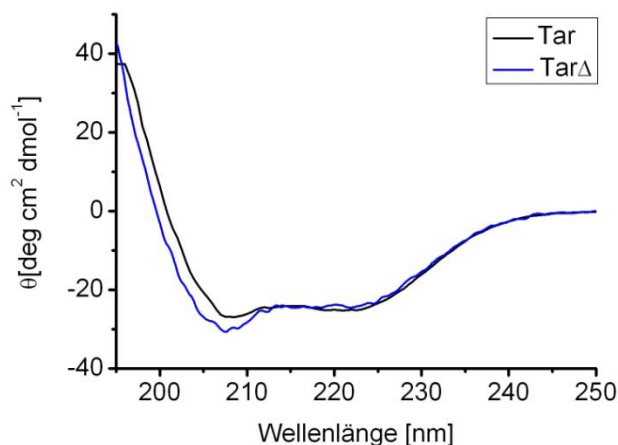
In A ist in dem MALDI-MS Spektrum ein Peak von 26.645 Da zu erkennen (Abbildung 16). Die theoretische Masse beträgt ebenfalls 26.645 Da. Der Nachweis von NpSRII mittels MALDI konnte somit erbracht werden. Es ist jedoch noch ein weiterer kleiner Peak (25.249 kDa) mit relativer Intensität von 15 % zu erkennen. Dies lässt auf eine leicht verunreinigte Probe schließen oder auf ein Proteolyseprodukt. In B ist das MALDI-MS Spektrum von isotopen markiertem NpSRII zu erkennen. Die gefundene Masse beträgt 29.420 Da. Bei einem vollständigen Einbau der Isotope  $^2\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  beträgt die theoretische Masse 29.811 Da. Die Effizienz der Isotopenmarkierung liegt somit bei 88 %. Der Einbau des Isotops  $^2\text{H}$  ist nicht zu 100% zu gewährleisten, da ein Austausch mit unmarkierten Protonen aus Wasser stattfinden kann.

## 4.2 Charakterisierung der Chemorezeptoren

Trimere von Dimeren an Tar können mit der Histidin-Kinase CheA interagieren (Boldog et al., 2006). Zunächst wurden die Oligomere in detergenzhaltigen Tar bzw. Tar $\Delta$  Lösung charakterisiert. Die weitere Charakterisierung der Tar und Tar $\Delta$  Oligomere erfolgte mit Fluoreszenzanisotropie Messungen und SAXS Untersuchungen.

### 4.2.1 Untersuchungen zur Struktur des Aspartatrezeptors

Um zu überprüfen, wie sich die fehlende Ligandenbindedomäne auf die Struktur des verkürzten Rezeptors Tar $\Delta$  auswirkt, wurden die Sekundärstruktur untersucht. Zum Vergleich der Strukturanteile von Tar und Tar $\Delta$ , wurde ein CD-Spektrum von Tar $\Delta$  aufgenommen. Als Referenz diente ein Spektrum von Tar.



**Abbildung 17:** CD Spektrum von Tar-His und Tar $\Delta$ -StreptII.

Beide Spektren zeigen einen  $\alpha$ -helikalen Verlauf mit den typischen beiden Minima bei 208 nm und 222 nm und ein Maximum bei 195 nm (Abbildung 17). Das Minimum bei 222 nm ist weniger stark ausgeprägt als bei 208 nm. Um den Sekundärstrukturanteil zu berechnen, wurden die Daten in die Jasco Software eingegeben und eine Auswertung nach Yang durchgeführt (Tabelle 2). Für Tar wurde ein  $\alpha$ -helikaler Anteil von ca. 40 % berechnet, ein  $\beta$ -Faltblatt Anteil an der Struktur von 33 % und etwa 30 % ungefaltete Struktur. Diese Berechnungen stimmen mit der qualitativen Auswertung des Spektrums nicht vollständig überein. Der Anteil einer  $\alpha$ -Helix an der Struktur sollte größer sein, da aus röntgenkristallographischen Untersuchungen (Kim et al., 1999) bekannt ist, dass der strukturell eng verwandte Serinrezeptor vorwiegend aus  $\alpha$ -Helizes besteht. Der Vergleich mit dem CD-Spektrum von Tar $\Delta$  zeigt, dass hier ebenfalls ein großer  $\alpha$ -helikaler Anteil zu erwarten ist. Es sind die typischen Minima bei 208 nm und 222 nm zu finden, sowie ein Maximum bei 195 nm. Die berechneten Strukturanteile weichen jedoch von der qualitativen Auswertung deutlich ab. So wurde der  $\alpha$ -helikale Anteil nur zu etwa 30% berechnet und der Anteil an einer  $\beta$ -Faltblattstruktur zu 40%. Die ungeordneten Strukturen liegen bei einem Anteil von 30 %.

**Tabelle 2:** Berechneter Sekundärstrukturanteil nach Yang von Tar-His und Tar $\Delta$ -StreptII.

	Sekundärstrukturanteil [%]			
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Turn-Struktur	ungefaltet
Tar	39.3	33	0	27.7
Tar $\Delta$	28.6	39.6	0	31.8

Die quantitative Auswertung nach Yang soll nicht zu stark ins Gewicht fallen, da die berechneten Werte mit der qualitativen Auswertung nicht übereinstimmen. Tar $\Delta$  ist um die Ligandenbindedomäne verkürzt und trägt nur eine Loopsequenz an dieser Stelle. Der

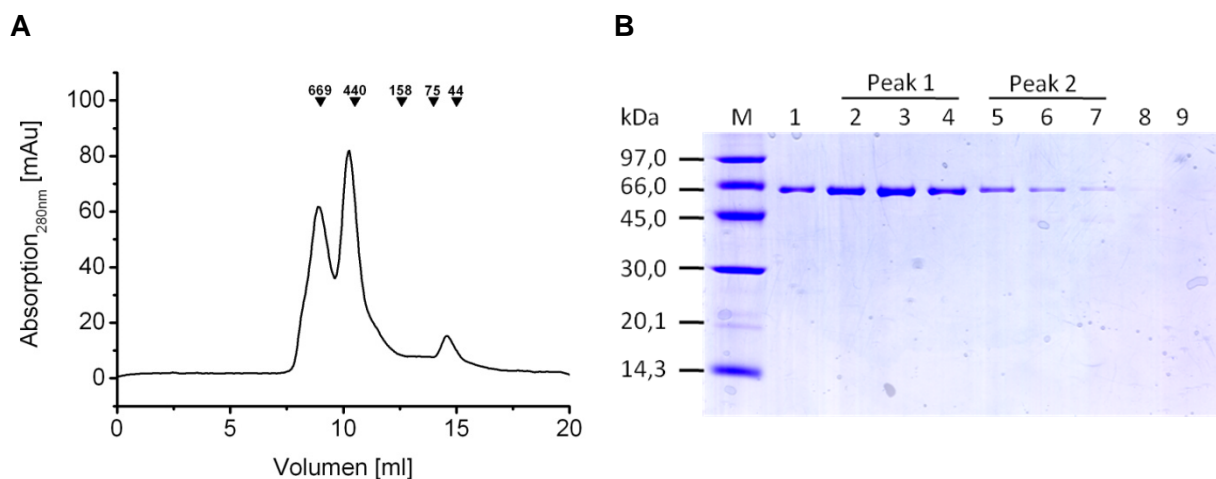
Rezeptor zeigt ein typisch  $\alpha$ -helikales CD-Spektrum. Kleine Abweichungen zwischen Tar und Tar $\Delta$  in dem CD-Spektrum lassen sich durch die Unterschiede in der Primärsequenz erklären. Zum Einen fehlt Tar $\Delta$  die LBD und zum Anderen ist der C-terminale Histidin-Anker von Tar durch eine TEV-Schnittstelle und einen StrepII Anker in Tar $\Delta$  ersetzt worden.

Die  $\alpha$ -helikale Faltung von HsHtrII, HsHtrII398 und HsSRII bei pH-Werten von 6 und 8 wurde von Bothe (2011) und Greifenberg (2011) mittels CD-Messungen gezeigt. Bei den Messungen wurde deutlich, dass HsHtrII bei niedrigen pH-Werten weniger  $\alpha$ -helikale Strukturanteile aufweist als bei höheren pH-Werten um 8. Die  $\alpha$ -helikale Struktur wird jedoch durch die Komplexbildung mit dem sensorischen Rhodopsin HsSRII bei niedrigen pH-Werten stabilisiert.

## 4.2.2 Charakterisierung von Stabilität und Oligomerisierung des Aspartatrezeptors

### 4.2.2.1 Analyse mittels analytischer Gelfiltration

Tar liegt als kleinste funktionelle Einheit als Dimer vor und ist als Trimer von Dimeren fähig CheA zu aktivieren (Amin und Hazelbauer, 2010). Zur Aufklärung der Oligomerisierung von Tar und Tar $\Delta$  in detergenzhaltigen Puffern wurde die Größenausschlusschromatographie verwendet.



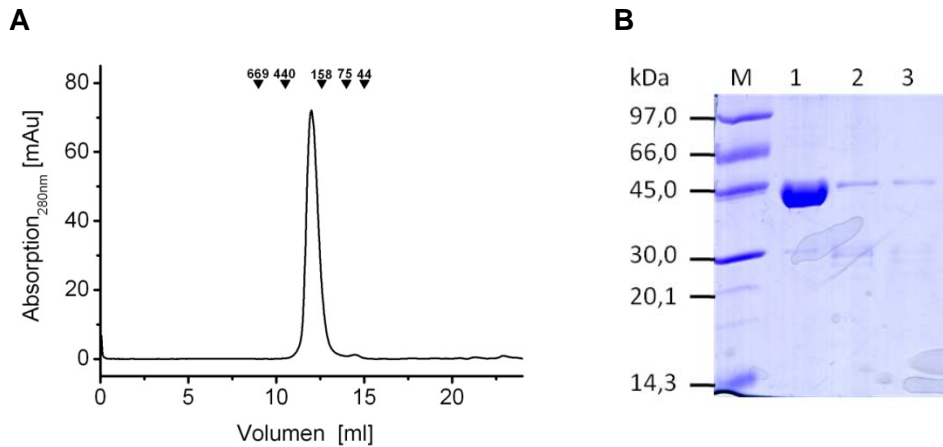
**Abbildung 18:** (A) Chromatogramm der analytischen Gelfiltration von Tar-His nach Ni-NTA Aufreinigung in 300 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,05 % DDM, pH 7,2. (B) Analyse der Fraktionen der Gelfiltration mittels 12%igem SDS Polyacrylamid Gel. M: LMW Marker, 1-9: gesammelte Fraktionen ab 7,5 ml.

Es sind zwei Peaks (keine Basislinien Trennung) bei einem Retentionsvolumen von 8,9 ml und 10,3 ml zu erkennen (Abbildung 18A). Ein kleinerer Peak bei einem Retentionsvolumen von 14,5 ml weist auf eine Verunreinigung hin. Das Auftragen eines Standards auf die Säule

ermöglicht die Abschätzung des Molekulargewichts der zu analysierenden Proteine. Da das Molekulargewicht der Proteine im Standard bekannt ist und das Retentionsvolumen experimentell ermittelt wurde, kann eine Eichgerade erstellt werden, mit dessen Hilfe das Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine aus dem Elutionsvolumen berechnet werden kann. Die Gleichung der Geraden lautet  $y = -106,45x + 1576,9$ . Der erste Peak bei einem Retentionsvolumen von 8 ml enthält Proteine mit einer Größe von ca. 700 kDa. Im zweiten Peak bei 10,3 ml sind Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 450 kDa enthalten. Es wurden 0,5 ml Fraktionen der Peaks gesammelt. Die Analyse der Fraktionen auf einem denaturierenden SDS Gel zeigt in B für beide Peaks ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Dies kann dem monomeren Tar Protein zugeordnet werden (berechnete Masse 61.057 Da). Es ist deutlich zu erkennen, dass beide Peaks dem Tar Protein zugeordnet werden können. Die Proteinlösung, die nach der Aufreinigung vorliegt, enthält das Protein in unterschiedlichen oligomeren Formen. Es ist bekannt, dass der Aspartatrezeptor nicht als Monomer, sondern mindestens als Dimer vorliegt. Ein Dimer hat ein molekulares Gewicht von ca. 120 kDa. Drei Dimere haben somit eine Größe von 360 kDa. Bei der Abschätzung muss die Größe einer Detergenzmizelle aus DDM berücksichtigt werden, da diese das Membranprotein umgibt. Kunji et al. (2008) berechneten die Detergenzmizelle aus DDM zu 60 kDa. Die Größe eines Trimers von Dimeren beträgt 420 kDa. Das abgeschätzte Molekulargewicht aus der analytischen Gelfiltration für den zweiten Peak bei 10,3 ml liegt bei ca. 450 kDa, was mit den Berechnungen für ein Trimer von Dimeren gut übereinstimmt. Der erste Peak bei 8,9 ml kann höheren Oligomeren ( $n > 6$ ) zugeordnet werden.

Die Analyse der Oligomerisierung von Tar mittels analytischer Gelfiltration zeigt zwei verschiedene Spezies. Zum Einen können höhere Oligomere gefunden werden und zum Anderen Trimere von Dimeren.

Der Aspartatrezeptor ohne Ligandenbindedomäne (Tar $\Delta$ ) wurde ebenfalls mittels analytischer Gelfiltration und anschließendem SDS Gel untersucht und charakterisiert.

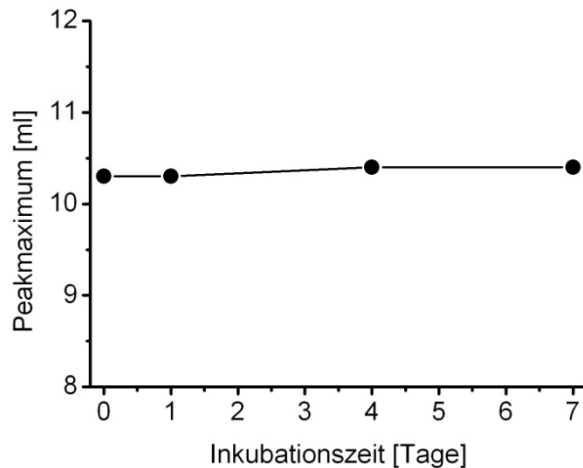


**Abbildung 19:** (A) Chromatogramm der analytischen Gelfiltration von Tar $\Delta$ -StrepII in 300 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,05% DDM bei pH 7,2. (B) Analyse der Fraktionen der Gelfiltration mittels 12%igem SDS Polyacrylamid Gel. M: LMW Marker, 1-3 gesammelte Fraktionen ab 11,5 ml.

Im Chromatogramm ist deutlich ein Peak bei 12 ml Elutionsvolumen zu erkennen (Abbildung 19A). Mittels der oben genannten Gleichung kann das Molekulargewicht anhand der Standardproteine berechnet werden. Die Größe der im Peak eluierenden Proteine beträgt 300 kDa. Zur weiteren Analyse wird ein Aliquot der gesammelten Fraktionen auf ein denaturierendes SDS Gel aufgetragen (Abbildung 19B). Es sind deutlich Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 45 kDa in Spur 1 bis 3 zu erkennen. Diese können dem Zielprotein Tar $\Delta$ -StrepII (berechnete Masse: 45.221 Da) zugeordnet werden. Bei ca. 30 kDa sind leichte Verunreinigungen zu sehen, welche mit dem Zielprotein von der Säule eluieren und nicht von diesem mittels Gelfiltration getrennt werden können.

Ein Tar $\Delta$  Monomer hat eine molekulare Masse von 45 kDa. Die Masse eines Dimer beträgt 90 kDa. Ein Trimer von Dimeren mit Mizelle (60 kDa) hätte ein theoretisches Molekulargewicht von 330 kDa. Dies stimmt mit der Abschätzung über den Proteinstandard von 300 kDa gut überein und lässt darauf schließen, dass Tar $\Delta$  als Trimer von Dimeren in DDM-haltiger Lösung vorliegt.

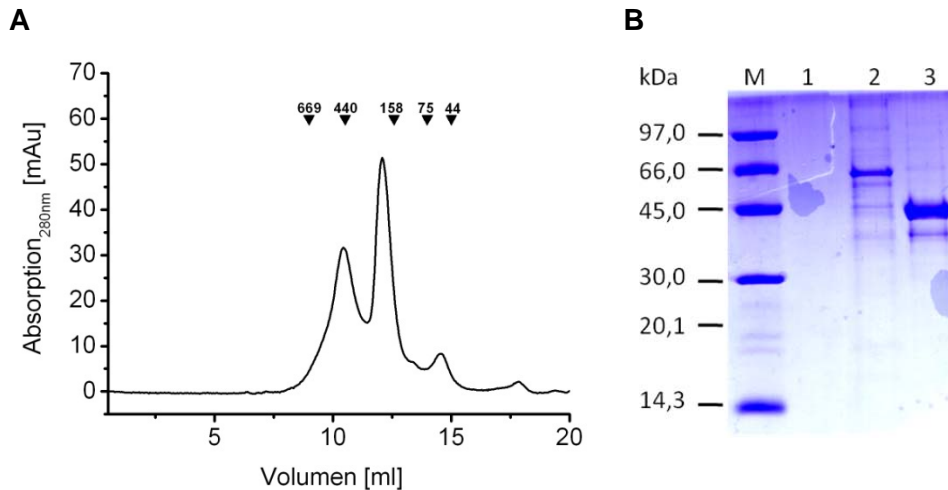
Um die Stabilität des Trimer von Dimer Komplexes von Tar zu untersuchen, wurde eine 5 mM Lösung bei 8 °C über eine Woche gelagert und nach 1, 4 und 7 Tagen je ein Aliquot entnommen und mittels analytischer Gelfiltration und anschließender Analyse auf einem SDS-Gel untersucht.



**Abbildung 20:** Darstellung der Peakmaxima nach analytischer Gelfiltration von Tar Trimeren von Dimeren.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Peakmaxima nicht signifikant verschieben (Abbildung 20). Beim Start der Inkubation liegt das Elutionsmaximum bei 10,3 ml. Nach eintägiger Inkubationszeit eluiert das Protein immer noch bei 10,3 ml. Die Gelfiltration nach 4 Tagen Inkubation bei 8°C zeigt einen Peak mit einem Maximum bei 10,4 ml Elutionsvolumen. Nach Inkubation für 7 Tage liegt das Peakmaximum ebenfalls bei 10,4 ml Retentionsvolumen. Aus diesem Experiment lässt sich folgern, dass die Tar Proteinlösung bei 8°C für mindestens eine Woche stabil ist. Zudem bestätigt das Experiment, dass die Oligomere (Trimere von Dimeren) ebenfalls stabil sind und nicht in Dimere oder andere Oligomere zerfallen bzw. sich zu höheren Oligomeren oder Aggregaten zusammenlagern.

Zur Untersuchung der Stabilität und des möglichen Austauschs der Dimere untereinander wurde eine 15 µM Tar Proteinlösung zusammen mit einer TarΔ Lösung für 24 Stunden bei 8°C unter leichtem Rühren inkubiert. Hierfür wurden äquimolare Mengen an Protein gewählt.

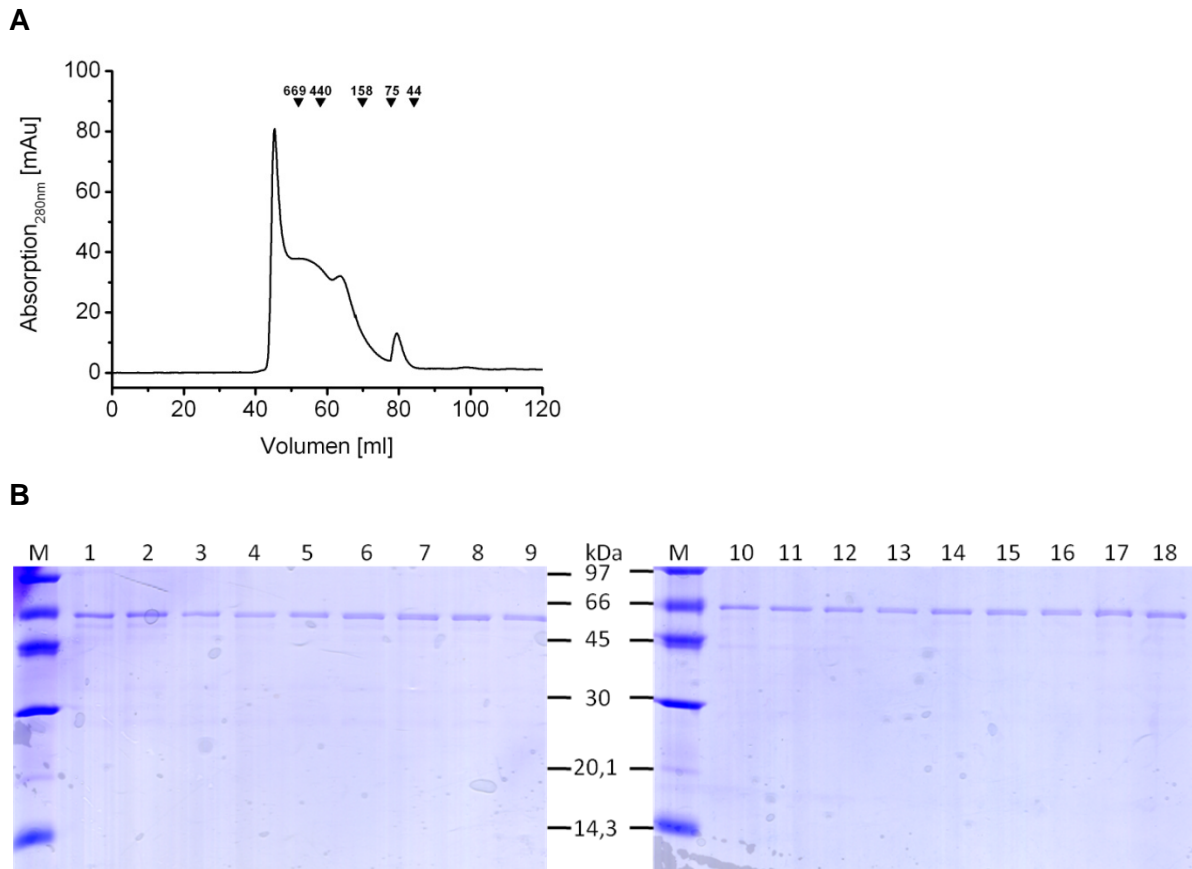


**Abbildung 21:** (A) Chromatogramm der analytischen Gelfiltration von Tar-His und Tar $\Delta$ -StrepII nach 1h Inkubationszeit in 300 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,05 % DDM, pH 7,2. (B) Analyse der Fraktionen der Gelfiltration mittels 12%igem SDS Polyacrylamid Gel. M: LMW Marker, 1: Fraktion bei 8 ml, 2: Fraktion bei 10 ml, 3: Fraktion bei 12 ml.

Das Chromatogramm zeigt zwei Peaks bei 10,4 ml und bei 12,1 ml (Abbildung 21A). Diese lassen sich aus den vorherigen Experimenten Tar und Tar $\Delta$  zuordnen. Die Analyse der Fraktionen auf einem SDS-Gel ist in B abgebildet. In Spur 2 ist eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 60 kDa zu erkennen. Diese kann dem Tar Protein zugeordnet werden (61 kDa). In Spur 3 läuft Tar $\Delta$  bei einer Größe von ca. 45 kDa, was mit der theoretischen Masse gut übereinstimmt. Ein Austausch der Proteine in den beiden vorgebildeten Komplex-Spezies ist nicht zu beobachten, was mit den Daten der Gelfiltration übereinstimmt. Die Elutionsmaxima befinden sich im gleichen Bereich wie die Einzelanalysen der Proteine per Gelfiltration. Es kann daher gefolgert werden, dass die Trimere von Dimeren der beiden Spezies bei 8°C unter den obigen Pufferbedingungen für 24 Stunden stabil sind und nicht miteinander austauschen.

In der Literatur sind Aufreinigungsprotokolle für den Aspartatrezeptor zu finden, in welchen das Detergenz  $\beta$ -Octylglycosid (OG) zur Solubilisierung des Proteins aus der Membran verwendet wird (Boldog et al., 2006). Da in dieser Arbeit das Detergenz DDM verwendet wurde, soll ein Austausch gegen OG durchgeführt werden und der Einfluss des Detergenz auf die Oligomerausbildung untersucht werden. Hierzu wurde eine präparative Gelfiltrationssäule mit OG haltigem Puffer äquilibriert und eine Probe von gereinigten Tar Trimeren von Dimeren aufgetragen, wobei der Äquilibrierungspuffer ebenfalls als Laufpuffer diente.



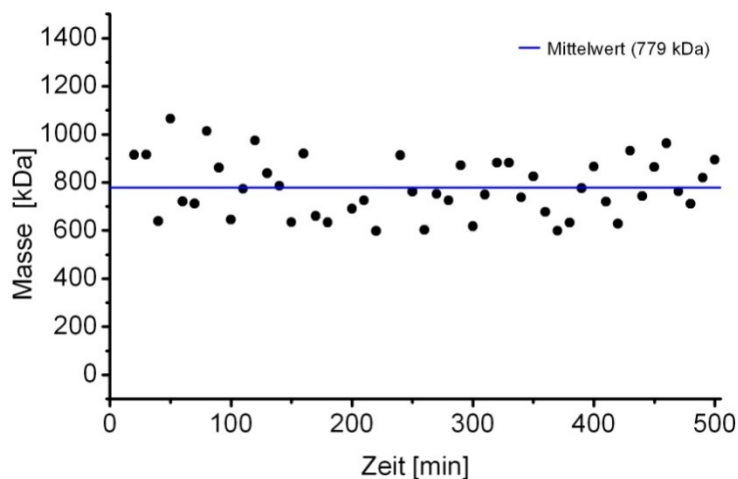


**Abbildung 22:** (A) Chromatogramm der präparativen Gelfiltration von Tar-His in 300 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,05 % OG, pH 7,2. (B) Analyse der Fraktionen der Gelfiltration mittels 12%igem SDS Polyacrylamid Gel. M: LMW Marker, 1-18 gesammelte Fraktionen ab 42 ml.

Das Chromatogramm (Abbildung 22A) der Größenausschlusschromatographie zeigt einen Peak bei 45 ml, der nicht auf die Grundlinie zurück fällt, sondern in einen sehr breiten Hügel übergeht, der auf Grund seiner Breite nicht klar als Peak abgegrenzt ist. Die Analyse der Fraktionen auf einem SDS-Gel B zeigt, dass in allen aufgetragenen Spuren (1-18) ein Protein mit einer Größe von 60 kDa beobachtet werden kann, was sich dem Tar Protein (61 kDa) zuordnen lässt. Somit kann aus der Gelfiltrationsanalyse geschlossen werden, dass das Protein in OG-haltigem Puffer keine definierten Oligomere ausbildet. Auch bei Aufreinigung des Proteins in OG-haltigem Puffer (nicht gezeigt) bildet Tar keine definierten Oligomere. Es finden sich Hügel, aber keine definierten Peaks in dem Chromatogramm. Peakmaxima lassen sich zwar bei 10,4 ml (Trimere von Dimeren, ca. 450 kDa (berechnet: 420 kDa) und 13,6 ml (Dimere, ca. 130 kDa (berechnet: 180 kDa)) zuordnen, aber nicht auftrennen. Das Detergenz OG sollte daher nicht ohne weitere Optimierung zur Aufreinigung von definierten Tar Oligomeren verwendet werden.

#### 4.2.2.2 Analyse mittels dynamischer Lichtstreuung

Um die Stabilität der Tar Oligomere über die Zeit zu beobachten, wurde eine DLS Messung über einen Zeitraum von 500 min (ca. 8 Stunden) durchgeführt.

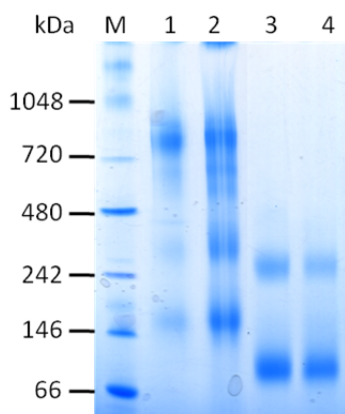


**Abbildung 23:** Messung der dynamischen Lichtstreuung von Tar-His über 500 h.

Die Größe der mittels dynamischer Lichtstreuung gemessenen Moleküle, liegt zwischen 600 kDa und 1100 kDa (Abbildung 23). Der daraus bestimmte Mittelwert beträgt 780 kDa. Die durchschnittliche Größe der Moleküle ändert sich über die Zeit nicht. Die Schwankungen von 600 bis 1100 kDa sind gleichbleibend. Daraus lässt sich folgern, dass die Moleküle nicht weiter aggregieren, sondern in einem oligomeren Zustand bleiben. Der Vergleich mit Analysen durch Größenausschlusschromatographie zeigt, dass die durch DLS ermittelte durchschnittliche Masse der Tar Oligomere höher ist (780 kDa). In der Gelfiltrationsanalyse sind zwei deutlich unterscheidbare oligomere Spezies nachzuweisen. Zum einen Oligomere mit einer Größe von ca. 450 kDa, zum anderen größere Oligomere mit Größen über 700 kDa. Die ermittelten Größen der Tar Oligomere aus dem DLS Experiment sind höher, bleiben aber über den beobachteten Zeitraum stabil und lagern sich nicht weiter zu Aggregaten zusammen.

#### 4.2.2.3 Analyse mittels blue native PAGE

Die Proteine Tar und Tar $\Delta$  wurden nach Ni-NTA Aufreinigung auf ein *blue native* Gel aufgetragen. Die Proteine werden bei dieser Methode nicht denaturiert, sondern in ihrem nativen Zustand analysiert. Dies ermöglicht die Untersuchung unterschiedlicher oligomerer Spezies in einer Proteinlösung (Abbildung 24).



**Abbildung 24:** *Blue native* Polyacrylamid Gel von Tar-His und Tar $\Delta$ -StreptII in 300 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,05 % DDM, pH 7. M: Native Mark, 1+2: Tar, 3+4: Tar $\Delta$ .

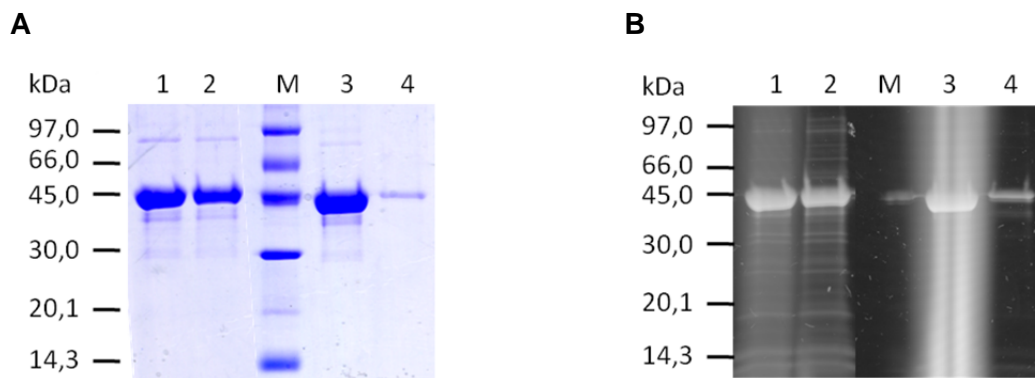
In Spur 1 und 2 läuft Tar in unterschiedlichen Konzentrationen (5  $\mu$ g und 10  $\mu$ g) und auf Spur 3 und 4 Tar $\Delta$  (6  $\mu$ g und 9  $\mu$ g). Für Tar sind in Spur 1 hauptsächlich drei Banden auf der Höhe von ca. 180 kDa, 350 kDa und 900 kDa zu erkennen. Diese Banden lassen sich dem dimeren Protein (120 kDa + 60 kDa Mizelle), dem Trimer von Dimeren (3 x 120 kDa + 60 kDa Mizelle) und höheren Oligomeren zuordnen. In Spur 2 ist eine höhere Konzentration an Protein aufgetragen und die Zuordnung der Banden nicht ganz eindeutig. Banden, welche schon auf Spur 1 zu sehen waren, sind auch hier zu erkennen. Zusätzlich läuft eine Bande bei 650 kDa, die ebenfalls höheren Oligomeren zugeordnet werden kann. Für Tar $\Delta$  lassen sich in Spur 3 und 4 je zwei Banden erkennen. Diese laufen auf der Markerhöhe von ca. 120 kDa und 300 kDa und können dem dimeren Protein und einem Trimer von Dimeren zugeordnet werden.

Die Analyse des *blue native* Gels weist darauf hin, dass in den Proteinlösungen von Tar und Tar $\Delta$  unterschiedliche oligomere Formen zu finden sind, nämlich Dimere, Trimere von Dimeren und höhere Oligomere (6 x Dimere). Die Untersuchungen zum Oligomerisierungszustand von Tar und Tar $\Delta$  mittels Größenausschlusschromatographie lassen darauf schließen, dass die Proteine in Lösung ausschließlich als Trimer von Dimeren vorliegen. Ein Hinweis auf Dimere konnte nicht gefunden werden. Die Proteinlösung, die zur Analyse per Gelfiltration verwendet wurde, ist höher konzentriert als die einer Lösung, die mittels PAGE untersucht wird. Es könnte sein, dass Tar und Tar $\Delta$  in hohen Konzentrationen als Trimer von Dimeren vorliegt und bei niedrigeren Konzentrationen auch Dimere in Lösung zu finden sind. Dies weist darauf hin, dass sich das Gleichgewicht von Dimeren und Trimeren von Dimeren bei niedriger Konzentration zu Trimeren von Dimeren bei höheren Konzentrationen verschiebt.

#### 4.2.2.4 Analyse mittels Fluoreszenzanisotropie

Die Fluoreszenzanisotropie Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Winter an der TU Dortmund von Alexander Werkmüller durchgeführt.

Um das Protein mittels Fluoreszenzanisotropie zu untersuchen, muss dieses zunächst mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Hierfür wurde Bodipy als Fluorophor ausgewählt. Über ein Maleimid kann der Farbstoff an eine Cysteinseitenkette gekoppelt werden. Die Aufreinigung nach der Kopplungsreaktion erfolgte über eine Größenausschlusschromatographie mittels Superdex 200 oder Sephadex G-25 Säule. Der Erfolg der Reaktion wurde auf einem SDS Gel analysiert (Abbildung 25).

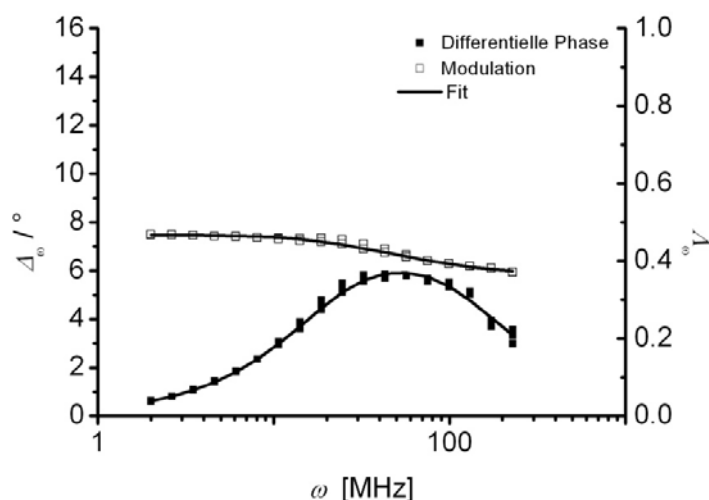


**Abbildung 25:** (A) 12%iges SDS Polyacrylamid Gel der Fluoreszenzmarkierung und Aufreinigung von Tar $\Delta$ T218-Bodipy. M: LMW Marker, 1: Tar $\Delta$ T218-Bodipy vor Aufreinigung, 2: Tar $\Delta$ T218-Bodipy nach Aufreinigung über eine Entsalzungssäule, 3: Tar $\Delta$ T218-Bodipy vor Aufreinigung, 4: Tar $\Delta$ T218-Bodipy nach Aufreinigung per Gelfiltration. (B) Fluoreszenzscan des in A dargestellten Gels.

In Spur 1 und 3 wurden Proben aus der Kopplungsreaktion aufgetragen. Im Fluoreszenzscan ist deutlich zu erkennen, dass die Kopplung funktioniert hat, da die Bande, welche Tar $\Delta$ T218 zugeordnet werden kann, hell fluoresziert. Die gesamte Spur zeigt eine Hintergrundfluoreszenz, was auf einen Überschuss an freiem Fluorophor in der Lösung hinweist. Zur Abtrennung des freien Fluorophors wurde eine Gelfiltration verwendet, die kleine Moleküle wie das freie, ungekoppelte Bodipy Molekül länger zurückhält als große Proteinmoleküle, und zum Anderen eine Gelfiltrationssäule mit Superdex 200 Material. Die Aufreinigung mittels Entsalzungssäule ist in Spur 2 aufgetragen. Im SDS Gel erkennt man einen geringen Konzentrationsunterschied zur Probe auf Spur 2. Im Fluoreszenzscan ist die Hintergrundfluoreszenz weniger intensiv, aber noch leicht zu erkennen. Ebenfalls lassen sich einige Verunreinigungen darstellen, die in der Coomassie Färbung nicht sichtbar sind. In Spur 4 ist die Aufreinigung über eine Superdex Säule gezeigt. Die Bandenintensität ist sehr viel geringer, da nach der Aufreinigung eine verdünnte Lösung vorliegt. Der Fluoreszenzscan

zeigt keine Hintergrundfluoreszenz und sehr viel weniger Verunreinigungen. Dies könnte in der geringeren Auftragsmenge begründet sein oder es konnten noch einige Verunreinigungen abgetrennt werden. Da die Aufreinigung über eine Superdex 200 Säule effektiver war, wurde diese für weitere Experimente verwendet. Zur Ermittlung der Effizienz der Markierung wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen und die in 3.2.9.1 beschriebene Formel verwendet. Die Markierungseffizienz lag zwischen 30% und 50%.

Das Protein Tar $\Delta$ T218-Bodipy wurde mittels Fluoreszenzanisotropie-Messung untersucht. Die Probe wurde zu einer Bodipy Konzentration von 1  $\mu$ M verdünnt und vermessen. Zunächst wurde die Fluoreszenzlebenszeit ( $\tau$ ) des Fluorophors Bodipy-FL zu 6,23 ns bestimmt. Daraufhin wurde die Zeitabhängigkeit der Anisotropie in der Frequenzdomäne für Tar $\Delta$ T218-Bodipy FL untersucht und die Rotationskorrelationszeiten bestimmt (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Differenzielle Phase ( $\Delta_{\omega}$ ) und Demodulationsgrad ( $\Lambda_{\omega}$ ) von Tar $\Delta$ T218-Bodipy in Abhängigkeit der Modulationsfrequenz. Die Daten wurden durch einen biexponentiellen Fit mit zwei Rotationskorrelationszeiten angepasst.

Die Werte für die Rotationskorrelationszeiten  $\Theta_1$  und  $\Theta_2$  betragen  $2,29 \pm 0,2$  und  $36,3 \pm 2$ . Die Rotationskorrelationszeit  $\Theta_1$  kann der Eigenrotation des Fluorophors Bodipy FL zugeordnet werden, da dieser Wert für ein großes Molekül wie ein Protein zu gering ist, wohingegen  $\Theta_2$  der Proteinrotation zugeschrieben werden kann.

Mit Hilfe von Tabelle 3 kann von der Rotationskorrelationszeit (36,3 ns) des ellipsoiden Proteins auf dessen Molekulargewicht geschlossen werden. Hierbei kann auch der Grad der Oligomerisierung identifiziert werden. Für Tar ist durch die Bestimmung der Kristallstruktur von Tsr (Kim et al., 1999) die Dimension des Proteins bekannt. Die Länge eines Dimers (Tar $\Delta$ ) beträgt 300 Å und die Breite 25 Å. Dies führt zu einem Seitenverhältnis  $\rho = 12$ . Aus der Tabelle lässt sich bei einem Molekulargewicht von 100 kDa (entspricht dem Molekulargewicht des Dimers (90 kDa)) nur  $\rho = 10$  finden, was  $\rho = 12$  am nächsten liegt. Die

gefundene Rotationskorrelationszeit  $\Theta_2$  beträgt 38,7 ns für  $\rho = 10$ . Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem Protein in der gemessenen Konzentration (2  $\mu\text{M}$  Tar $\Delta\text{T}218$ ) um ein Dimer handelt.

**Tabelle 3:** Rotationkorrelationszeiten für Ellipsoide (nach Lakowicz, 2006).

MW = 10.000								
$\rho$	$\theta_1$ (ns)		$\theta_2$ (ns)		$\theta_3$ (ns)		$\theta_H$ (ns)	
	$h = 0$	$h = 0,2$	$h = 0$	$h = 0,2$	$h = 0$	$h = 0,2$	$h = 0$	$h = 0,2$
1,5	3,46	4,38	2,94	3,72	3,68	4,66	3,27	4,14
2	4,05	5,13	2,93	3,71	4,63	5,87	3,59	4,55
3	5,31	6,72	2,97	3,77	7,18	9,11	4,21	5,34
5	7,40	9,36	3,03	3,83	14,2	18,0	5,00	6,31
10	10,03	12,67	3,06	3,88	41,7	52,1	5,69	7,24
MW = 25.000								
1,5	8,66	10,96	7,34	9,31	9,21	11,65	8,16	10,37
2	10,11	12,79	7,33	9,29	11,57	14,62	8,96	11,36
3	13,2	16,8	7,43	9,42	17,9	22,8	10,54	13,25
5	18,4	23,4	7,56	9,6	35,4	45	12,36	15,96
10	25,1	31,6	7,65	9,71	104,2	128,2	14,23	23,19
MW = 50.000								
1,5	17,4	21,8	14,7	18,5	18,5	23,1	16,3	20,6
2	20,2	25,5	14,7	18,4	23,1	29,2	17,8	22,4
3	26,7	33,3	15	18,7	36,2	45	21	26,7
5	37,3	46,1	15,2	19	72,4	87,7	24,8	31,2
10	50,2	64,1	15,3	19,4	208,3	277,8	28,5	36,2
MW = 100.000								
1,5	34,7	43,4	29,3	36,7	37	46,3	32,6	41,8
2	40,5	50,2	29,4	36,5	46,3	57,4	36,9	44,5
3	53,4	65,3	29,9	37	72,4	87,7	42,2	52,1
5	73	94,3	30,1	38,1	138,9	185,2	49,5	63,3
10	100	128,2	30,4	38,7	416,7	555,5	56,6	72,3
MW = 500.000								
1,5	173,9	217,9	147,1	185,2	185,2	231,5	163,4	205,8
2	202,4	255,1	147	184,5	231,5	292,4	177,9	225,4
3	267,4	333,3	149,7	187,3	362,3	450,5	209,6	267,7
5	373,1	460,8	152	190,1	724,6	877,2	248	332
10	502,5	641	153,4	193,8	2083,3	2777,8	285,1	375,4

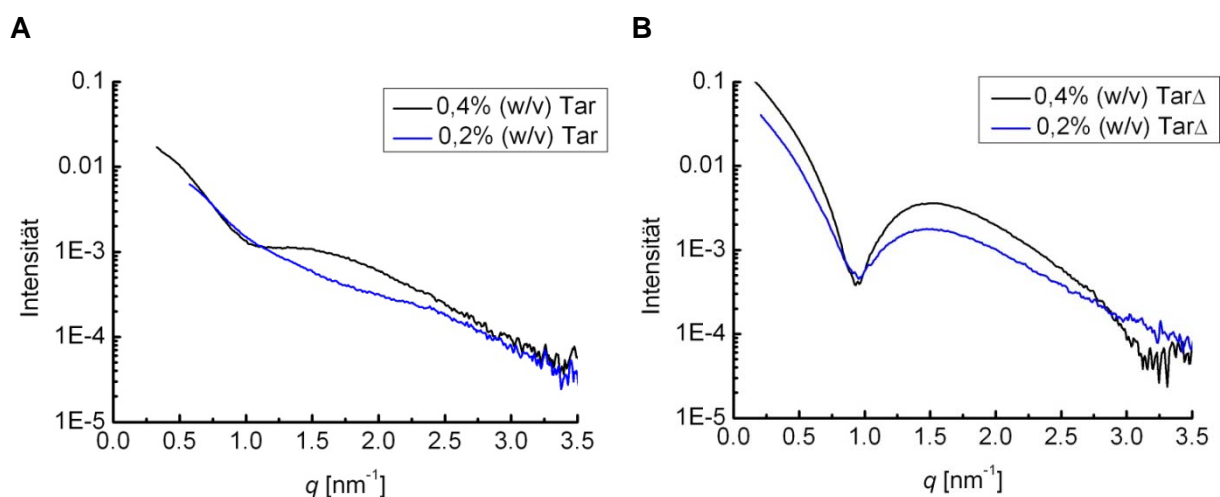
$\theta$  = Rotationskorrelationszeit,  $\theta_1 = (D_{\parallel} + 5D_{\perp})^{-1}$ ,  $\theta_2 = (4D_{\parallel} + 2D_{\perp})^{-1}$ ,  $\theta_3 = (6D_{\perp})^{-1}$ ,  $\theta_H$  = harmonische Hauptkorrelationszeit,  $D$  = Rotationsdiffusionskoeffizient,  $h$  = Hydratation [ml/g], MW = Molekulargewicht,  $\rho$  = Seitenverhältnis

Die Ergebnisse aus der Messung der Fluoreszenzanisotropie lassen darauf schließen, dass das Protein Tar $\Delta$  in niedrigen Konzentrationen in Detergenz als Dimer vorliegt. Die Untersuchung des Einflusses von höheren Konzentrationen auf die Oligomerisierung von Tar und Tar $\Delta$  ist mit dieser Technik nicht durchführbar. Bei Erhöhung der Proteinkonzentration würde auch die Konzentration des Fluorophors steigen. Bei Bodipy-FL kann es dann zu einer Depolarisation durch Resonanzenergietransfer zwischen den Bodipy Molekülen kommen, was die Ergebnisse der Messung verfälscht. Daher wurde der Einfluss der Konzentration auf den Oligomerisierungszustand mittels Kleinwinkelröntgenstreuung untersucht.

#### 4.2.2.5 Analyse mittels Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS)

Die SAXS Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Winter (TU Dortmund) von Christoph Jeworrek durchgeführt.

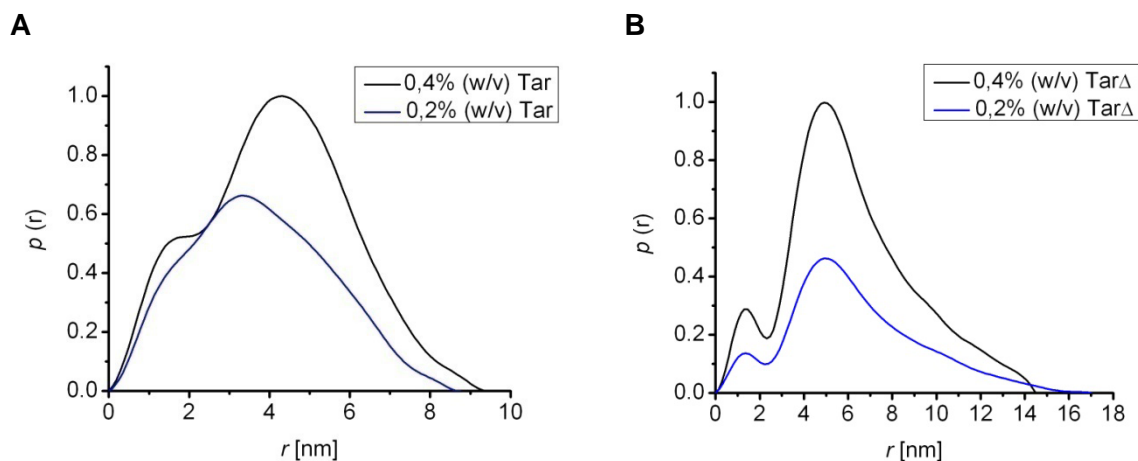
Die Proben wurden wie in 3.5.5 beschrieben vorbereitet. Es wurden Proben in drei verschiedenen Konzentrationen gemessen. Aus der Analyse mittels Gelfiltration wurden für Tar zwei Peaks beobachtet, die vermutlich Spezies mit unterschiedlichen Oligomeren enthalten (siehe 4.2.2.1). Für die SAXS Messungen wurden die Fraktionen separat voneinander untersucht (Tar<sub>Peak1</sub> und Tar<sub>Peak2</sub>). Tar $\Delta$  wurde ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen vermessen. Anhand der Daten von Tar<sub>Peak2</sub> und Tar $\Delta$  in unterschiedlichen Konzentrationen sollen die Streukurve und die Abstandsverteilungsfunktion beispielhaft für alle Messungen analysiert werden. Die gesamte Auswertung ist in Tabelle 4 zusammengefasst.



**Abbildung 27:** Streukurven von (A) Tar in den Konzentrationen 0,4% (w/v) und 0,2% (w/v) und (B) Tar $\Delta$  in den Konzentrationen 0,4% (w/v) und 0,2% (w/v). In der Streukurve ist der  $\ln(I(q))$  als Funktion des Wellenvektors  $q$  aufgetragen.

Die Streukurven aus den Kleinwinkelröntgenstreuungsexperimenten von Tar und Tar $\Delta$  wurden in den Konzentrationen 0,2% (w/v) und 0,4% (w/v) gemessen (Abbildung 27 A und B). Die Intensität wurde gegen den Streuvektor  $Q$  aufgetragen. Die Intensität der Streukurve von Tar und Tar $\Delta$  nimmt mit steigenden  $Q$ -Werten generell ab, wobei ein leichter Anstieg zwischen  $1 \text{ nm}^{-1}$  und  $2,5 \text{ nm}^{-1}$  zu erkennen ist. Die wesentlichen Informationen über Größe und Form sind im mittleren  $Q$ -Bereich enthalten (Winter und Noll, 1998). Bei kleinen  $Q$ -Werten steigt die Intensität stark an. Dies lässt auf ein gestrecktes Molekül schließen.

Aus den Streukurven lässt sich eine Abstandsverteilungsfunktion  $p(r)$  berechnen. Sie enthält Angaben über den maximalen Abstand zwischen den Elektronen im Molekül. Maxima treten auf, wenn eine Vielzahl an Abständen dieser Länge vorhanden ist.

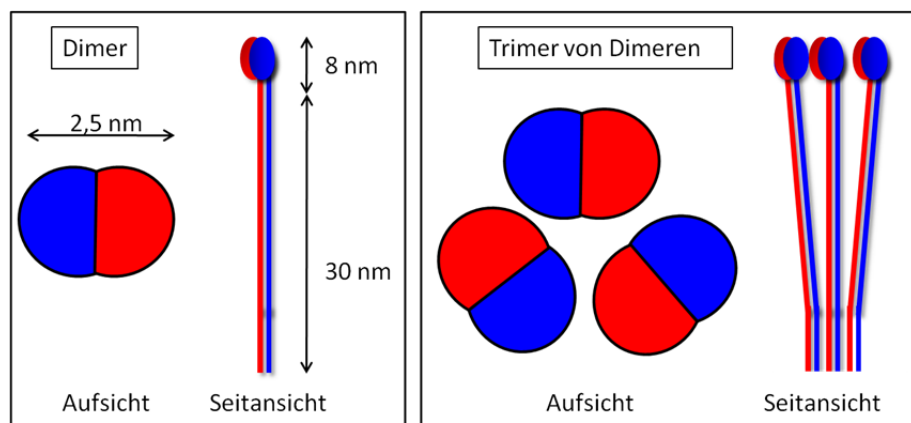


**Abbildung 28:** Abstandsverteilungsfunktion  $p(r)$  für (A) Tar in den Konzentrationen 0,4% (w/v) und 0,2% (w/v) und (B) Tar $\Delta$  in den Konzentrationen 0,4% (w/v) und 0,2% (w/v).

Die Abstandsverteilungskurven A und B für Tar und Tar $\Delta$  wurden für die Konzentrationen 0,2% (w/v) und 0,4% (w/v) dargestellt (Abbildung 28). Die Abstandsverteilungsfunktion A für Tar in hoher Konzentration (0,4% (w/v), schwarz) weist bei 1,4 nm und 4,3 nm ein Maximum auf. Diese Abstände zwischen Elektronen kommen in dem Protein besonders häufig vor. Für die niedrigere Konzentration (0,2% (w/v), blau) liegen die Maxima etwas verschoben bei 1,7 nm und 3,2 nm. Der maximale Abstand ( $D_{\max}$ ) zweier Elektronen liegt für beide Konzentrationen bei ca. 9 nm. Der Verlauf der Abstandsverteilungsfunktion B für Tar $\Delta$  ist ähnlich wie bei Tar. Es werden zwei Maxima der Elektronenabstände bei 1,3 nm und 4,9 nm bei hoher Konzentration (0,4% (w/v), schwarz) beobachtet. Bei niedrigerer Konzentration (0,2% (w/v), blau) liegen die Maxima um die gleichen Abstandswerte wie bei höherer Konzentration. Der maximale Abstand in dem Protein liegt für die höhere Konzentration bei 14 nm und bei niedrigeren Konzentrationen bei 16 nm.



Für beide Proteine lässt sich ein Kurvenverlauf mit zwei lokalen Maxima beobachten. Durch Hinzuziehen der Kristallstruktur des *E. coli* Tsr Rezeptors (Kim et al., 1999), welche dem Aspartatrezeptor strukturell sehr ähnlich ist, wird eine Interpretation der SAXS Daten möglich. Die  $\alpha$ -Helizes der Monomere sind ineinander verschlungen (*coiled-coil*) und der Durchmesser im Tsr Dimer wurde zu 2,5 nm bestimmt (Abbildung 29). Die kleinste in Lösung vorkommende Einheit des Aspartatrezeptors ist das Dimer. Einer der maximalen Abstände zwischen den Elektronen in dem Protein ist der Durchmesser des Dimers. Dieser liegt für Tar (0,4% (w/v)) bei 1,4 nm und für Tar $\Delta$  (0,4% (w/v)) bei 1,3 nm. Dies weicht geringfügig von den Abständen aus kristallographischen Daten (2,5 nm) ab. Für das zweite Maximum bei 4,3 nm (Tar) und 4,9 nm (Tar $\Delta$ ) kann es sich um den Abstand innerhalb eines Trimers von Dimeren handeln. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 29 ein Modell des Tar Proteins gezeigt, sowohl als Dimer als auch als Trimer von Dimeren in Auf- und Seitansicht. Der Abstand innerhalb eines Dimers (1,4 nm für Tar (0,4% (w/v))) kann zur Berechnung des Abstandes in einem Trimer von Dimeren grob verdreifacht werden. Für Tar bedeutet das einen Abstand von 4,2 nm. Die Abstandsverteilungsfunktion der SAXS Messung zeigt einen weiteren maximalen Abstand für Tar (0,4% (w/v)) von 4,3 nm. Dies stimmt gut mit dem erwarteten Abstand von 4,2 nm überein und stützt die These, dass die untersuchte Proteinlösung Trimere von Dimeren des Aspartatrezeptors enthält. Für Tar $\Delta$  (0,4% (w/v)) ergeben sich ähnliche Resultate. Die Dimerdistanz aus der Abstandsverteilungsfunktion liegt bei 1,3 nm. Bei einer Verdreifachung des Abstandes ergibt sich eine Distanz von etwa 4 nm. Aus den experimentellen Daten wird ein maximaler Abstand bei 4,9 nm gefunden. Dies weicht geringfügig von den erwarteten Distanzen ab, deutet aber ebenfalls auf ein Trimer von Dimeren für Tar $\Delta$  in Lösung bei einer Konzentration von (0,4% (w/v)) hin. Bei niedrigeren Konzentrationen von 0,2% (w/v) für Tar $\Delta$  zeigt die Abstandsverteilungsfunktion Maxima bei gleichen Distanzen. Auch hier kann auf ein Trimer von Dimeren in Lösung geschlossen werden. In der Abstandsverteilungsfunktion für Tar (0,2% (w/v)) sind die Maxima verschoben. Das erste Maximum ist zu höheren Werten (1,7 nm) verschoben. Der Wert stimmt gut mit dem theoretischen Durchmesser eines Dimers mit 2,5 nm Breite überein. Das zweite Maximum der Abstandsverteilungsfunktion ist zu niedrigeren Distanzen (3,2 nm) verschoben. Dies entspricht dem halben Abstand des ersten Maximums. Daraus ergibt sich die Annahme, dass die Proteine in Lösung zu geringeren Oligomeren als Trimere von Dimeren angeordnet sein können. Dies deutet auf eine konzentrationsabhängige Gleichgewichtsverschiebung hin.



**Abbildung 29:** Model eines Tar Dimers und Trimer von Dimeren, dargestellt in Aufsicht und Seitansicht.

Der theoretische maximale Abstand innerhalb des Proteins beträgt 38 nm für Tar und 30 nm für Tar $\Delta$  (Kim et al., 1999). Die Abstandsverteilungsfunktion für Tar liefert einen  $D_{\max}$  Wert von 9 nm und für Tar $\Delta$  eine maximale Distanz von 14-16 nm. Die gemessenen Werte weichen sehr stark von den Literaturwerten ab. Bei Betrachtung der Streukurven in Abbildung 27 erkennt man deutlich, dass die Intensität für kleine Q-Werten steigt. Der kleinste Q-Wert liegt bei  $0,5 \text{ nm}^{-1}$ . Je größer der Streuwinkel im experimentellen Aufbau, desto mehr Information geht im kleinen Q-Bereich verloren. Bei dem untersuchten Protein Tar handelt es sich um ein sehr lang gestrecktes stäbchenförmiges Molekül. Bei der SAXS Messung konnten nicht alle Information über das Protein gesammelt werden, da es sich um ein langes, stäbchenförmiges Protein handelt. Es war mit diesem Aufbau nicht möglich, Hinweise auf den maximalen Abstand in den untersuchten Proteinlösungen zu erhalten. Daher wird davon ausgegangen, dass die lokalen Maxima aussagekräftig sind, aber der maximale Abstand ( $D_{\max}$ ) in dem Molekül nicht korrekt ist. Die *ab initio* Berechnungen konnten somit auch nicht korrekt durchgeführt werden, da der maximale Abstand der Abstandsverteilungsfunktion nicht exakt ermittelt wurde.

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der Maxima aus den Abstandsverteilungsfunktionen von Tar und Tar $\Delta$ .

	Tar <sub>Peak1</sub>		Tar <sub>Peak2</sub>		Tar $\Delta$		
	0,6%	0,3%	0,4%	0,2%	0,4%	0,2%	0,1%
	(w/v)	(w/v)	(w/v)	(w/v)	(w/v)	(w/v)	(w/v)
Max. 1	1,5	1,5	1,4	1,7	1,3	1,3	2,8
Max. 2	4,3	4,3	4,3	3,2	4,9	4,9	4,5

Der Vergleich der beiden am häufigsten vorkommenden Abstände in den Proteinen Tar<sub>Peak1</sub> und Tar<sub>Peak2</sub> in unterschiedlichen Konzentrationen zeigt keine Unterschiede (Tabelle 4).

Sowohl das erste als auch das zweite Maximum liegen bei den Konzentrationen 0,6% (w/v), 0,4% (w/v) und 0,3% (w/v) bei einem Abstand von 1,4 nm - 1,5 nm und bei 4,3 nm. Dies deutet darauf hin, dass in beiden Proben die gleichen oligomeren Spezies vorhanden sind. Die Analyse von  $Tar_{Peak2}$  im oberen Abschnitt hat Hinweise auf ein Trimer von Dimeren in Lösung ergeben. Dies gilt auch für die  $Tar_{Peak1}$  Probe.

Bei geringeren Konzentrationen (0,2% (w/v) und 0,1% (w/v)) von Tar und  $Tar\Delta$  kommt es zu einer Verschiebung der Maxima in der Abstandsverteilungsfunktion. Bei Tar von 1,4 nm auf 1,7 nm im ersten lokalen Maximum und von 4,3 nm auf 3,2 nm im zweiten Maximum. Für  $Tar\Delta$  wird eine ähnliche Verschiebung beobachtet. Hier verschiebt sich das erste Maximum zu höheren Abständen (1,3 nm  $\rightarrow$  2,8 nm) und das zweite Maximum ebenfalls zu niedrigeren Abständen (4,9 nm  $\rightarrow$  4,5 nm). Die Veränderung der Abstandsverteilungsfunktion für Tar und  $Tar\Delta$  bei geringeren Konzentrationen deutet auf eine Verschiebung im Gleichgewicht zwischen Trimeren von Dimeren und niedrigeren Oligomeren hin.

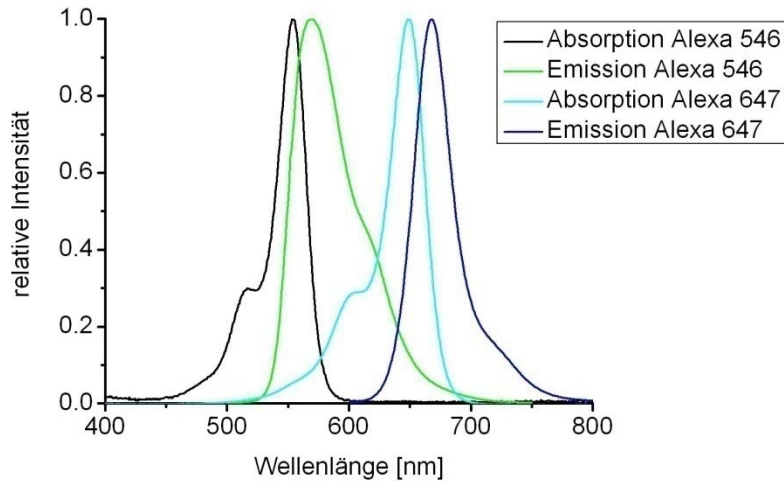
Allgemein kann festgehalten werden, dass es sich bei den vermessenen Proteinproben um ein gestrecktes Molekül handelt, welches aus drei gleichen Einheiten zusammengesetzt ist. Dies gilt für die untersuchten Proteine  $Tar_{Peak1}$ ,  $Tar_{Peak2}$  und  $Tar\Delta$  in hohen Konzentrationen. Bei niedrigeren Konzentrationen kann eine Gleichgewichtsverschiebung zu kleineren Oligomeren beobachtet werden.

### 4.3 Signaltransfer in Chemorezeptoren

Die Amplifikation in Chemo- und Photorezeptorclustern ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass sich die Rezeptoren in ihrem Zustand gegenseitig beeinflussen und stabilisieren (Bray et al., 1998). Um einen Crosstalk der Rezeptoren untereinander zu analysieren, wurden ESR und Methylierungsexperimente an Tar und HsHtrII durchgeführt. Um die Anordnung von Trimeren von Dimeren in einem Cluster darzustellen, wurden Liposomen verwendet.

#### 4.3.1 FRET Messung in Liposomen

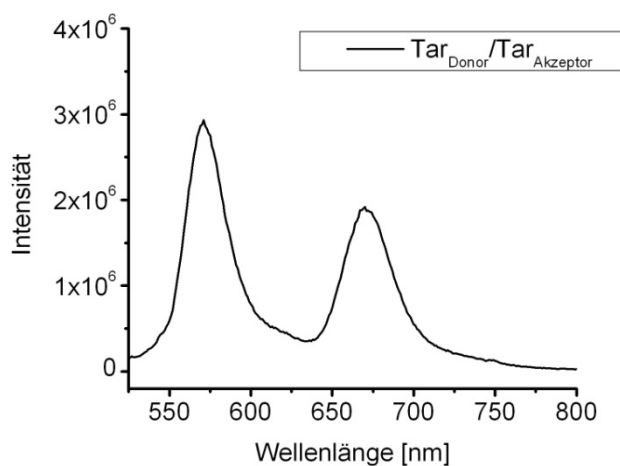
Der Aspartatrezeptor durchspannt in natürlicher Umgebung die Periplasmamembran von *E. coli*. Um Messungen in möglichst natürlicher Umgebung an Tar und  $Tar\Delta$  durchzuführen, wurden diese in Liposomen rekonstituiert. Die Liposomen waren aus einem *E. coli* Lipid Gemisch zusammengesetzt, um eine möglichst natürliche Umgebung zu schaffen. Um den Einbau der Proteine näher zu untersuchen, wurden FRET Experimente mit den Fluorophoren Alexa 546 und Alexa 647 durchgeführt.



**Abbildung 30:** Absorptions- und Emissionsspektrum von Alexa 546 und Alexa 647.

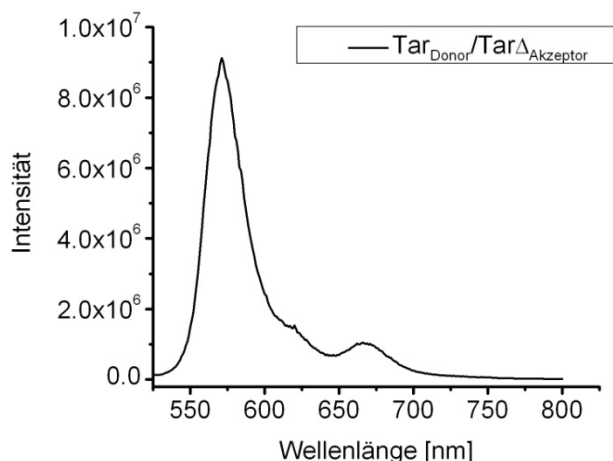
Eine Voraussetzung für den Energietransfer von zwei Fluorophoren ist das Überlappen des Emissionsspektrums (grün) des Donormoleküls Alexa 546 mit dem Absorptionsspektrum (cyan) des Akzeptorfluorophors Alexa 647. Anhand des Spektrums kann ein großer überlappendender Bereich beobachtet werden, so dass die ausgewählten Fluorophore als FRET Partner geeignet sind (Abbildung 30).

Der Aspartatrezeptor wurde wie in 3.2.9.2 beschrieben markiert und aufgereinigt. Die Rekonstitution erfolgte wie in 3.2.5 erläutert. Es wurden zwei Ansätze hergestellt. Im ersten Ansatz wurden Tar-Alexa 546 und Tar-Alexa 647 zusammen rekonstituiert und in einem zweiten Ansatz der verkürzte Rezeptor Tar $\Delta$ -Alexa 546 und Tar-Alexa 647 (Abbildung 31 und Abbildung 32).



**Abbildung 31:** Emissionsspektrum von Tar Proteoliposomen bei einer Anregungswellenlänge von 500 nm. Die Proteine liegen fluoreszenzmarkiert (Tar mit Donor (Alexa 546) oder mit Akzeptor (Alexa 647)) vor.

Das Emissionsspektrum zeigt zwei Maxima bei 570 nm und 670 nm (Abbildung 31). Das erste Maximum kann der Emission von Alexa 546 zugeordnet werden und das zweite Maximum der Emission von Alexa 647 (vgl. Abbildung 30). Da die Anregung bei 500 nm erfolgt, wird nur Alexa 546 angeregt und nicht Alexa 647 (Kontrollmessungen nicht gezeigt). In dem Emissionsspektrum kann ein Maximum bei 670 nm beobachtet werden, was auf einen Energieübertrag vom Donor (Alexa 546) auf den Akzeptor (Alexa 647) hin deutet. Ein Energieübertrag kann dann erfolgen, wenn sich die Fluorophore in einer bestimmten Distanz voneinander befinden. Für Alexa 546 und Alexa 647 ergibt sich ein Försterradius, also der Abstand zweier Fluorophore, bei dem die Effizienz des Energietransfers 50 % beträgt, von 7,4 nm. Da ein Energieübertrag zu beobachten ist, kann gefolgert werden, dass sich die Fluorophore in dichter Nähe zueinander befinden. Das gleiche gilt dementsprechend auch für die Proteine, an denen die Fluorophore kovalent gebunden sind. Zum einen lässt das Ergebnis dieser Messung darauf schließen, dass sich Tar-Alexa 546 und Tar-Alexa 647 in unmittelbarer Nähe zueinander befinden, zum anderen, dass die Orientierung der Proteine parallel zueinander ist.



**Abbildung 32:** Emissionsspektrum von Tar/Tar $\Delta$  Proteoliposomen bei einer Anregungswellenlänge von 500 nm. Die Proteine liegen fluoreszenzmarkiert (Tar mit Donor (Alexa 546) und Tar $\Delta$  mit Akzeptor (Alexa 647)) vor.

Es sind zwei Maxima bei 570 nm und 670 nm zu erkennen, die der Emission von Alexa 546 (569 nm) und Alexa 647 (668 nm) zugeordnet werden können (Abbildung 32). Die Intensität des Maximums bei 670 nm ist verglichen mit der Intensität des Maximums bei 570 nm gering. Es wurde ebenfalls in einer 1:1 molaren Stöchiometrie rekonstituiert. Die Anordnung von Tar $\Delta$  in Liposomen scheint durch das Fehlen der LBD anders zu sein, als die Anordnung von Tar. Das resultierende Tar/Tar $\Delta$  Proteoliposom ist eventuell nicht so dicht gepackt, wie das Tar Proteoliposom. Dies könnte die geringere Intensität des zweiten Maximums erklären. Dennoch konnte eine erhöhte Emission gemessen werden, was auf einen Energieübertrag

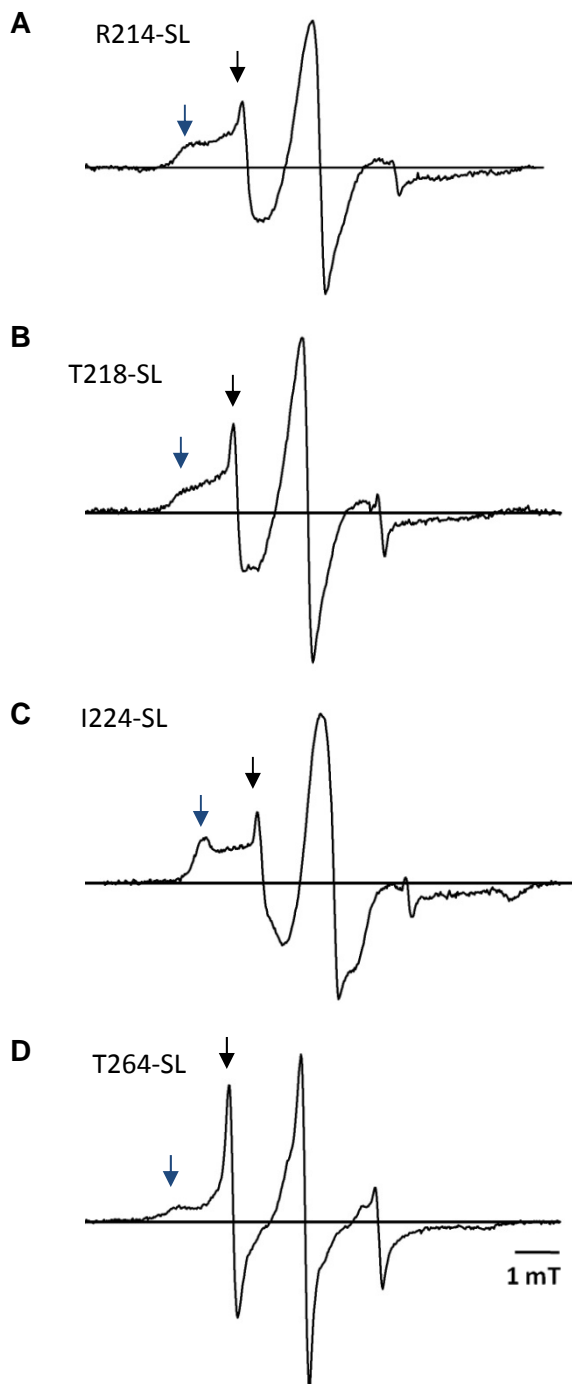
von Donor auf Akzeptor hinweist. Da nur das Donormolekül angeregt wurde, kann die Emission bei 670 nur durch einen Energietransfer erklärt werden. Wie oben beschrieben, kann ein Übertrag nur in dichter Nähe der Fluorophore zueinander erfolgen. Daher kann aus dem Experiment geschlossen werden, dass sich Tar-Alexa 546 und Tar $\Delta$ -Alexa 647 parallel zueinander in enger Nachbarschaft befinden.

Mit diesem Versuchsaufbau konnte gezeigt werden, dass sich Tar in einer Lipidumgebung in Liposomen zum Teil parallel zueinander anordnet. Dies ermöglicht die vereinfachte Darstellung eines Rezeptorarrays, um die Funktion der Proteine in einer Lipidumgebung zu untersuchen.

#### 4.3.2 ESR-Messungen von Tar

Die Signalweiterleitung innerhalb des Aspartatrezeptors ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Insbesondere die Verarbeitung des Signals von der Ligandenbindedomäne über die HAMP Domäne zur cytoplasmatischen Domäne ist von großem Interesse. Das Signal nach Ligandenbindung wird in einer Hubkolbenbewegung von der Ligandenbindedomäne über die transmembrane Domäne zur HAMP Domäne weitergeleitet (Ottemann et al., 1999, Falke und Hazelbauer, 2001). Die HAMP Domäne von Tar besteht aus einem parallelen Vier-Helix Bündel, welche in Untereinheiten aus zwei amphipathischen Helizes AS1 und AS2, die über einen Linker miteinander verbunden sind, eingeteilt ist (Hazelbauer und Lai, 2010, Hulko et al., 2006). Im Unterschied zum Aspartatrezeptor, der eine HAMP Domäne enthält, sind in dem Transducer HsHtrII zwei HAMP Domänen hintereinander geschaltet. Hier soll die Funktion der ersten HAMP Domäne näher untersucht werden (vgl. 4.3.4).

Für die Aufklärung der Signalweiterleitung innerhalb der HAMP Domäne wurden Cysteinmutanten von Tar hergestellt und mittels Elektronenspinresonanz Spektroskopie untersucht. Die Proben wurden wie in 3.2.4 und 3.2.5 beschrieben vorbereitet und vermessen. Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen und enthalten Informationen über die Beweglichkeit der Spinsonde, die an die Cysteinseitenkette des Proteins gebunden wurde. Für die Messungen wurden die Positionen R214, T218, I224 und T264 in Tar und Tar $\Delta$  ausgewählt (Abbildung 33).



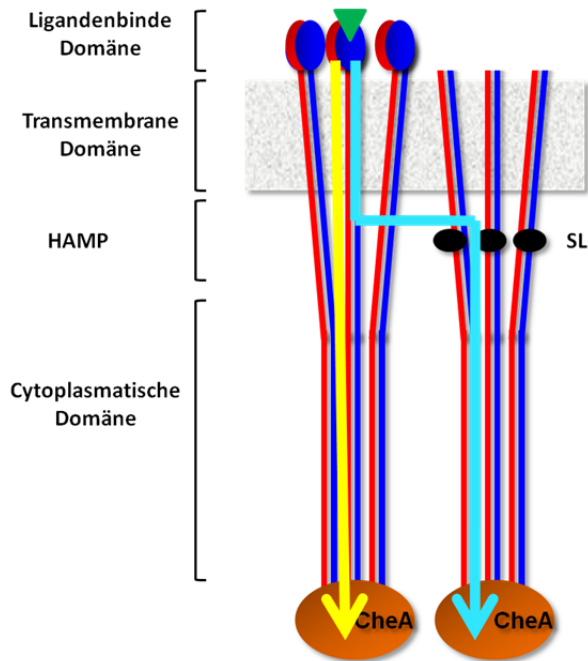
**Abbildung 33:** ESR Spektren bei RT von (A) TarR214-SL, (B) Tar $\Delta$ T218-SL, (C) TarI224-SL und (D) TarT264-SL. Die immobile Komponente ist durch einen blauen, die mobile Komponente durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

Das ESR Spektrum A für TarR214-SL ist typisch für eine immobile Spinsonde. Das Spektrum zeigt eine Linienverbreiterung, was für eine eingeschränkte Beweglichkeit der Seitenkette spricht. Die immobile Komponente (erstes lokales Maximum) ist stark ausgeprägt, wohin gegen die mobile Komponente weniger ausgebildet ist. Dies deutet darauf

hin, dass die Seitenkette R214 zur Kontaktfläche der Helizes gerichtet liegt. Beim Vergleich mit Abbildung 12 zeigt sich, dass die Seitenkette im Tar Dimer nach außen zeigt. In einem Trimer von Dimeren scheint die Aminosäureseitenkette Kontakt zu benachbarten Dimeren zu haben, da dies die Mobilität einschränken würde. Für Tar $\Delta$ T218-SL ist ein etwas mobileres Spektrum B zu erkennen. Die Linienbreite ist schmaler und die Hyperfeinaufspaltung kleiner. Die Seitenkette Threonin 218 zeigt im Protein nach außen, so dass die Spinmarkierung eine hohe Beweglichkeit aufweisen sollte. Dies kann durch das ESR Spektrum jedoch nur teilweise belegt werden. Das ESR Spektrum C für TarI224-SL ist charakteristisch für eine immobile Seitenkette. Die immobile Komponente ist stark ausgeprägt. Isoleucin 224 zeigt ins Innere der HAMP Domäne, was der Grund für die geringe Beweglichkeit der Seitenkette ist. Für TarT264-SL kann eine hohe Beweglichkeit der Spinsonde aus dem Spektrum D abgelesen werden. Die Linienbreite ist schmal und die Hyperfeinaufspaltung gering. Die Seitenkette liegt im Endbereich der HAMP Domäne, wo die Vier-Helix Bündel *coiled coil* Struktur in die einfache *coiled coil* Struktur (Hulko et al., 2006) des cytoplasmatischen Bereichs übergeht.

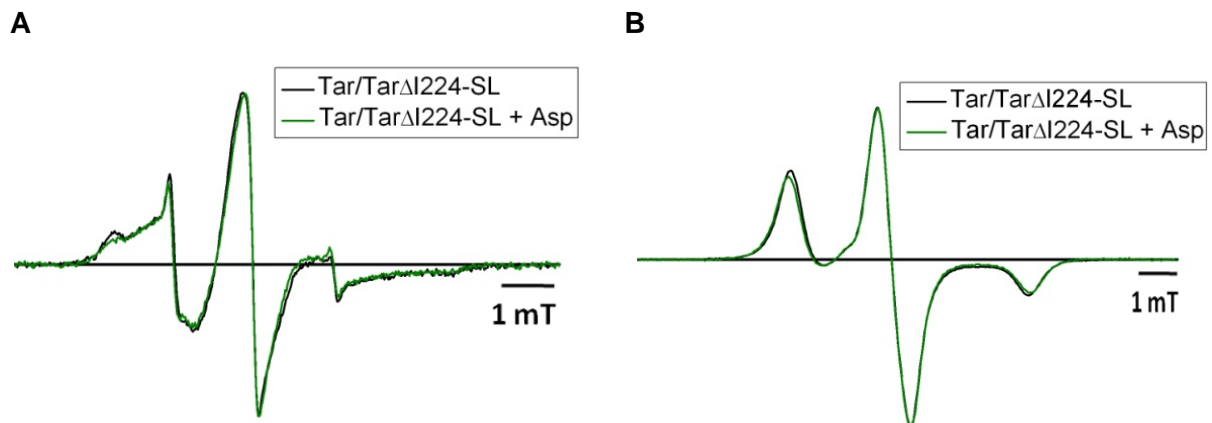
Für die Untersuchung zur Signalweiterleitung über die HAMP Domäne wurde Tar mit Tar $\Delta$ -SL zusammen rekonstituiert und der Einfluss von Aspartat auf die Beweglichkeit der Spinmarkierung betrachtet. Ein Ligand kann nur an Tar binden und hat keinen Einfluss auf Tar $\Delta$  (Daten nicht gezeigt). Eine Veränderung im ESR Spektrum würde zeigen, dass die Signalweiterleitung in der HAMP Domäne nicht nur vertikal verläuft, sondern auch horizontal über benachbarte Rezeptoren (hier Tar $\Delta$ -SL). Die Untersuchung des *Crosstalks* zwischen benachbarten Rezeptoren kann mittels ESR untersucht werden. Die Rezeptoren sind als Trimer von Dimeren in einer Membran dargestellt (Abbildung 34). Ein Hexamer trägt eine Ligandenbindedomäne (Tar) und dem benachbarten Hexamer fehlt die LBD (Tar $\Delta$ ). An Tar $\Delta$  wurde im Bereich der HAMP Domäne eine Spinmarkierung (SL) gekoppelt. Der Ligand Aspartat ist schematisch als grünes Dreieck zu sehen. Ligand kann nur an Tar binden. Der gelbe Pfeil zeigt eine vertikale Signalübertragung von der LBD des Rezeptors zur cytoplasmatischen Spitze, wo das Signal an CheA (orange) weitergeleitet wird. Der cyanfarbene Pfeil steht für eine horizontale Weitergabe des Signals. Durch die enge Nachbarschaft zu einem weiteren Rezeptor (hier Tar $\Delta$ ) kann das Signal über die HAMP Domäne übertragen werden. Der Rezeptor wird ebenfalls aktiviert und leitet das Signal an die cytoplasmatische Spitze weiter. Hier kann die Übertragung auf CheA stattfinden. Dies ist eine Möglichkeit eine Signalamplifikation zu erklären.





**Abbildung 34:** Modell einer vertikalen (gelb) und horizontalen (cyan) Signalweiterleitung in Chemorezeptoren.

Die ESR Messungen zur Untersuchung der Signalweiterleitung wurden mit Tar/Tar $\Delta$ -SL an den Positionen R214, T218, I224 und T264 durchgeführt. Die Zugabe von Aspartat führte zu einer Veränderung des ESR Spektrums von Tar/Tar $\Delta$ I224-SL (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** (A) ESR Spektren bei RT von Tar/Tar $\Delta$ I224-SL ohne und mit Ligandzugabe. (B) Tieftemperatur ESR Spektren bei 170 K von Tar/Tar $\Delta$ I224-SL ohne und mit Ligandzugabe.

Das ESR Spektrum A zeigt die schon beobachteten Charakteristika einer immobilen Seitenkette (schwarz). Nach Ligandzugabe (grün) sinkt der Anteil an immobilter Komponente. Die Spinsonde wird somit mobiler. Dies könnte auf eine Veränderung der Umgebung der Seitenkette hinweisen und ein Indiz für eine Signalweitergabe von Tar auf Tar $\Delta$ -SL sein. Durch die Messung bei tiefen Temperaturen können die Abstände der Spinmarkierungen

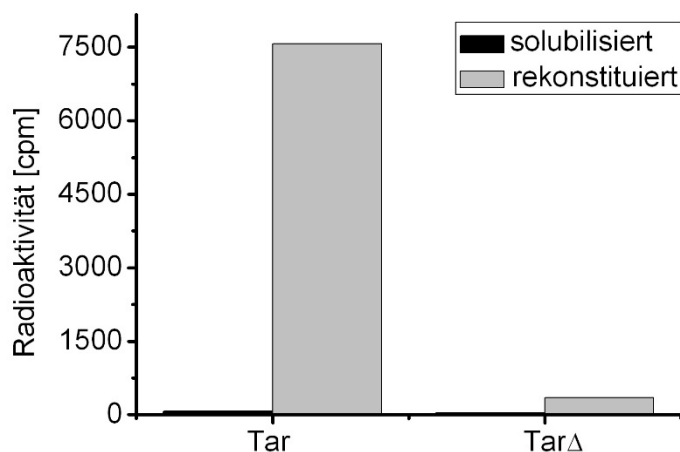
zueinander bestimmt werden. Wenn sich die Linienbreite verändert, so ist dies auch ein Hinweis auf Distanzänderungen zwischen den Spinsonden. Das Tieftemperaturspektrum B zeigt jedoch keine Verbreiterung nach Aspartat Zugabe (grün). Die ESR Messung bei 170 K weist nicht auf eine Veränderung der Position der Seitenkette I224 nach Ligandenzugabe hin. Diese Ergebnisse müssen durch weitere Experimente verifiziert werden, so dass sich noch keine Aussage aus diesen Untersuchungen ableiten lässt.

### 4.3.3 Methylierungsexperimente zum Nachweis des *Crosstalks*

Die Demethylierung und die Methylierung des Aspartatrezeptors erfolgen durch das Protein CheB und das konstitutiv aktive Enzym CheR. Die Methyltransferase CheR bindet an die C-terminale Pentapeptid Sequenz NWETF von Tar und methyliert die Aminosäuren E302, E491, Q295 und Q309 (die Glutamine können durch die Methylesterase CheB deaminiert werden). Die Methylierungsexperimente von Tar und Tar $\Delta$  wurden in Proteoliposomen durchgeführt (vgl. 3.2.8). Die Analyse der Reaktionslösung erfolgte mittels SDS Gel, wobei entweder die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die enthaltene Radioaktivität über eine Szintillationsmessung quantifiziert wurden oder die Radioaktivität als Lichtenergie umgewandelt (Fluorographie) auf einen Film übertragen wurde.

#### 4.3.3.1 Methylierung in Detergenzien und Liposomen

In einem ersten Experiment sollte geklärt werden, ob die Methylierung des Aspartatrezeptors in Detergenzien und Lipiden möglich ist. Hierzu wurden sowohl solubilisierete als auch rekonstituierte Tar und Tar $\Delta$  Proben für die Reaktion mit CheR (Zelllysat CheR überexprimierender Zellen) verwendet.  $^3\text{H}$  markiertes SAM konnte zur Markierung eingesetzt werden, um die Methyl-Gruppenübertragung auf das Protein zu verfolgen.



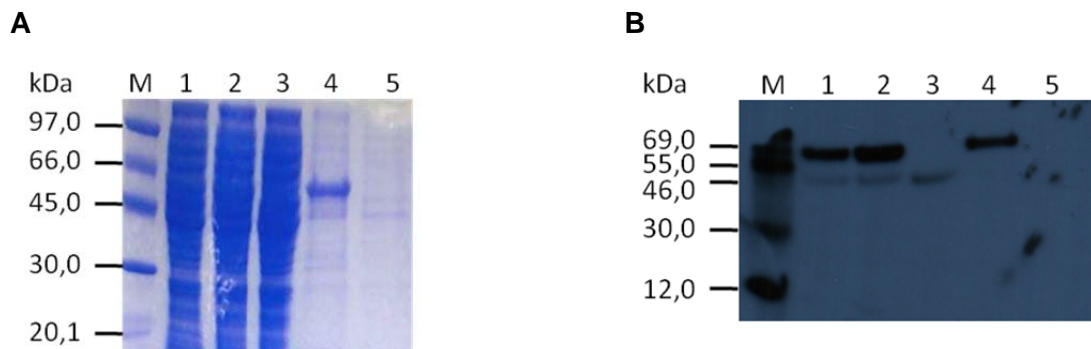
**Abbildung 36:** Diagramm zur Szintillationsmessung von Tar und Tar $\Delta$  zum Vergleich der Methylierungseffizienz in rekonstituierter (grau) und solubilisierter (schwarz) Probe.

Die gemessene Radioaktivität von methyliertem Tar und methyliertem Tar $\Delta$  in Liposomen ist deutlich höher als die Radioaktivität im solubilisierten Ansatz (Abbildung 36). Es wurde weniger als 80 cpm Radioaktivität für die solubilisierten Proben detektiert. Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass die Radioaktivität für rekonstituiertes, methyliertes Tar sehr viel höher ist als für rekonstituiertes, methyliertes Tar $\Delta$ .

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde Proteoliposomen in den Methylierungsansätzen verwendet, da die Methylierung unter den gewählten Bedingungen nur in Lipidumgebung möglich war.

#### 4.3.3.2 Aufreinigung des methylierten Proteins

Die Aufreinigung der methylierten Proteine erfolgte durch Zentrifugation der Liposomen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Puffer wieder aufgenommen und resuspendiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Die Überprüfung der Aufreinigungseffizienz erfolgte auf einem SDS Polyacrylamid Gel und es wurde ein Fluorogramm des Gels angefertigt, um  $^3\text{H}$  markierte Proteine zu verfolgen.



**Abbildung 37:** (A) 12%iges SDS Polyacrylamid Gel der Methylierungsreaktion von Tar und Tar $\Delta$ . (B) Fluorogramm des in A dargestellten Gels. M: LMW/  $^{14}\text{C}$ -Marker, 1: Tar, 2: TarR214C, 3: Tar $\Delta$ , 4: Tar nach Aufreinigung, 5: Tar $\Delta$ R214C nach Aufreinigung (entnommen und modifiziert nach Ulbrich, 2011).

In den Spuren 1 bis 3 ist die Methylierungsreaktion von Tar, TarR214C und Tar $\Delta$ R214C vor Aufreinigung aufgetragen (Abbildung 37). Im Coomassie gefärbten Gel A sind keine klaren Banden zu erkennen, da viele Proteine aus dem CheR Lysat in dem Ansatz vorhanden sind. Im Fluorogramm B sind in Spur 1 und 2 zwei Banden und in Spur 3 eine Bande erkennbar. Anhand des Markers lassen sich die Größen der Proteine abschätzen. Die obere Bande (Spur 1 und 2) läuft bei einer ungefähren Größe von 70 kDa und die untere Bande (Spur 1-3) liegt bei ca. 50 kDa. Die obere Bande kann dem Aspartatrezeptor zugeordnet werden. Bei der unteren Bande handelt es sich wahrscheinlich um Verunreinigungen. Da in Spur 3 nur eine Bande zu erkennen ist, besteht die Möglichkeit, dass das Protein und die

Verunreinigung auf gleicher Höhe laufen. In Spur 4 und 5 wurden die aufgereinigten Methylierungsansätze aufgetragen. Das Coomassie gefärbte Gel A zeigt in Spur 4 die Tar-Bande bei 60 kDa (theoretische Masse: 59,9 kDa). In Spur 5 ist der Ansatz mit Tar $\Delta$  in Liposomen aufgetragen, es ist jedoch keine eindeutige Bande sichtbar. Das Fluorogramm B zeigt in Spur 4 eine Bande auf der Höhe von 70 kDa, wohingegen in Spur 5 keine Bande zu erkennen ist. Die Bande in Spur 4 kann dem methylierten Aspartatrezeptor zugeordnet werden. Die tiefer laufende Bande aus Spur 1 ist nicht mehr zu erkennen. Die Verunreinigung konnte durch die Aufreinigung erfolgreich abgetrennt werden.

In Spur 3 ist eine Bande bei ca. 50 kDa zu erkennen. Diese könnte Tar $\Delta$  zugeordnet werden. Auf gleicher Höhe läuft jedoch in Spur 1 und 2 eine Verunreinigung. Nach Aufreinigung ist keine Bande (Spur 5) mehr zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass kaum methyliertes Protein (Spur 3) aufgetragen wurde und folglich kaum methyliertes Protein aufgereinigt werden konnte. Im Coomassie gefärbten Gel A ist in Spur 5 keine eindeutige Bande auf der Höhe von 45 kDa zu erkennen. Dies spricht erstens für eine geringe Effizienz der Methylierung von Tar $\Delta$  und zweitens für eine wenig erfolgreiche Aufreinigung. Die Methylierung und Aufreinigung für Tar $\Delta$  verläuft also mit deutlich weniger Ausbeute als für Tar.

#### **4.3.3.3 Nachweis der Methylierungsposition**

Die selektive Methylierung an den Positionen Glutamat 302 und Glutamat 491 soll über die Masse nachgewiesen werden, um auszuschließen, dass andere Glutamate methyliert werden und die korrekte Funktion der Methyltransferase CheR zu zeigen. Hierzu wurde zunächst die Methylierungsreaktion durchgeführt und aufgereinigt. Der Ansatz wurde über ein SDS Polyacrylamid Gel gegeben und aufgetrennt. Die Tar Bande wurde nach Färben ausgeschnitten, mit der Protease Trypsin verdaut und aufgereinigt. Der Aspartatrezeptor wurde zunächst *in silico* mittels Trypsin verdaut, wobei die molekulare Masse der relevanten Fragmente, welche die Aminosäuren Glutamat 302 und Glutamat 491 beinhalten, ermittelt wurde. Dabei konnten die Fragmente TEQQASALEETAASMEQLTATVK (Peptid<sub>292-315</sub>; 2437,65 Da) und VTQQNASLVQESAAAAALEEQASR (Peptid<sub>480-505</sub>; 2543,72 Da) identifiziert werden. Die Analyse mittels ESI MS ergab eine Sequenzabdeckung des gesamten *in silico* Verdau von 40 %. Es konnte etwa die Hälfte aller Peptide nach Verdau mit genügend hoher Intensität identifiziert werden. Für das Peptid<sub>292-315</sub> wurde eine Masse von 2451,19 Da gefunden, was der Addition einer Methylgruppe und einem Proton zur theoretischen Masse entspricht (2451.19 Da [M+CH<sub>3</sub>+H<sup>+</sup>]). Das Peptid<sub>292-315</sub> enthält vier Glutamate, die theoretisch mit einer Methylgruppe modifiziert wurden. Die Analyse mittels ESI MS ergab für die Methylierung des Glutamats an Position 302 des Fragments den

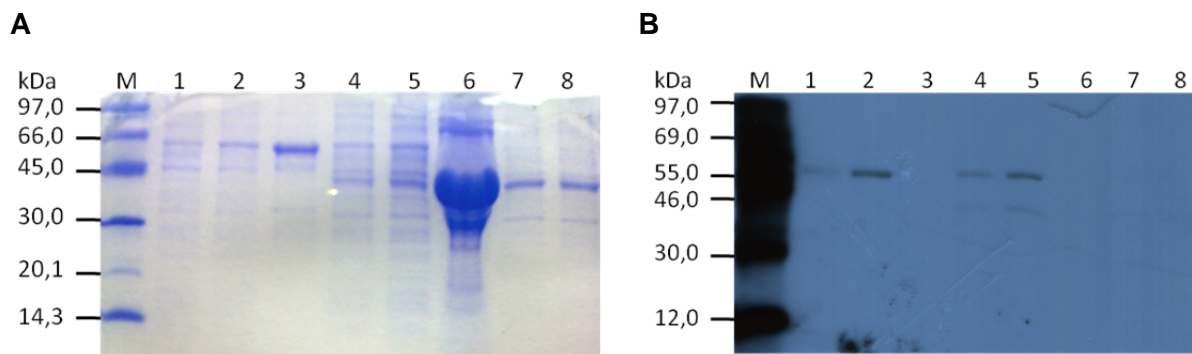
höchsten Score und die höchste Anzahl an detektierten Ionenfragmenten (25 /44). Die Ionenserie von 300 Da bis 2000 Da konnte für das Peptid<sub>292-315</sub> mit methyliertem Glutamat an Position 302 durchgehend detektiert werden, was für die Peptide mit modifiziertem Glutamat an den anderen Positionen nicht möglich war.

Durch den Nachweis des methylierten Peptids über die Masse konnte gezeigt werden, dass die Position Glutamat 302 im Rezeptor durch CheR in den Methylierungsexperimenten erfolgreich modifiziert wurde.

Die Detektion des Peptids<sub>480-505</sub> nach tryptischem Verdau und anschließender Analyse mittels ESI MS war nicht erfolgreich. Somit kann über die Methylierung an Position E491 in Tar keine Aussage getroffen werden.

#### 4.3.3.4 Einfluss des Liganden Aspartat

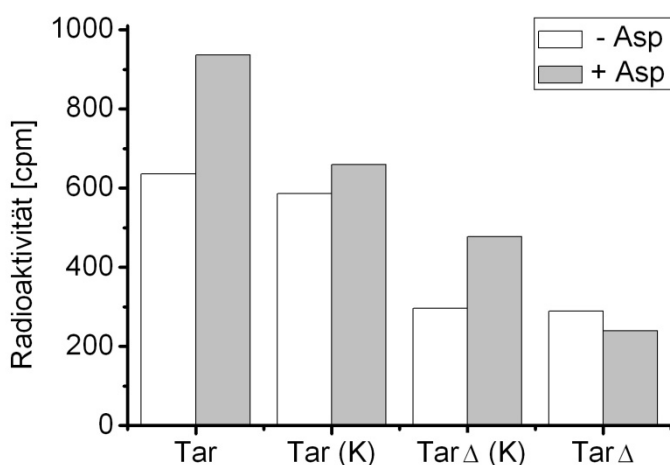
In vorherigen Experimenten konnte die Methylierung und Aufreinigung des modifizierten Proteins aus der Reaktionslösung nachgewiesen werden. In einem weiteren Versuch soll der Einfluss von Aspartat auf die Methylierungsreaktion untersucht werden. Da Aspartat ein Ligand für Tar ist, kann die Zugabe dieses Lockstoffs die Konformation des Rezeptors beeinflussen und somit auch Auswirkung auf die Modifikation des Rezeptors haben.



**Abbildung 38:** (A) 12%iges SDS Polyacrylamid Gel der Methylierungsreaktion von Tar, Tar/TarΔ und TarΔ zur Untersuchung des Aspartat Einflusses. (B) Fluorogramm des in A dargestellten Gels. M: LMW/ <sup>14</sup>C-Marker, 1: Tar, 2: Tar + Asp, 3: Tar (unmethyliert), 4: Tar/TarΔ, 5: Tar/TarΔ + Asp, 6: TarΔ (unmethyliert), 7: TarΔ, 8: TarΔ + Asp.

In Spur 1 ist die aufgereinigte Methylierung von Tar ohne Aspartat und in Spur 2 mit Asp gezeigt (Abbildung 38). In Spur 3 ist zum Vergleich nur Tar aufgetragen. Im Coomassie gefärbten Gel A ist für Tar in Spur 1-3 eine Bande bei 60 kDa und eine etwas schwächere Bande bei 45 kDa erkennbar. Die obere Bande kann dem Aspartatrezeptor (59,9 kDa) zugeordnet werden. Die weitere Bande stellt eine Verunreinigung dar. Es könnte sich hierbei um ein Fragment des Rezeptors handeln. Das Fluorogramm B zeigt in Spur 1 und 2 je eine

Bande bei 60 kDa, welche dem methylierten Rezeptor zugeordnet werden kann. Die Bande in Spur 2 (Reaktion mit Asp) ist stärker ausgeprägt als die Bande in Spur 1 (Reaktion ohne Asp). In Spur 4 und 5 wurden die Methylierungsreaktionen mit Tar und Tar $\Delta$ , welche gemeinsam in Liposomen rekonstituiert wurden, aufgetragen. In Spur 4 ist die Reaktionslösung ohne Ligand gezeigt und in Spur 5 der Reaktionsansatz nach Aufreinigung mit Ligand. Im Coomassie gefärbten Gel A ist in beiden Spuren (4 und 5) Tar bei 60 kDa und Tar $\Delta$  bei 45 kDa sichtbar. Jedoch sind auch weitere Proteinbanden zu erkennen. Die Aufreinigung der Methylierungsreaktion war nicht ausreichend und sollte um zwei Waschschrte erweitert werden. Im Fluorogramm B sind in Spur 4 und 5 deutlich die Banden für Tar und Tar $\Delta$  auf einer Höhe von 60 kDa und 40 kDa zu sehen. Die Proteine wurden beide mit einer Methylgruppe modifiziert. Die Banden in Spur 5 scheinen etwas stärker ausgeprägt zu sein als die Banden in Spur 4. In Spur 6 ist Tar $\Delta$  (unmethyliert) aufgetragen und in Spur 7 und 8 die aufgereinigten Proteoliposomen nach Methylierung ohne und mit Aspartat. Im Coomassie gefärbten Gel A sind deutlich die Banden für Tar $\Delta$  bei 40 kDa zu erkennen. In Spur 7 und 8 ist eine leichte Verunreinigung der Probe bei 30 kDa zu sehen. Spur 6 ist mit Tar $\Delta$  überladen. Im Fluorogramm B sind keine Banden in Spur 7 und 8 erkennbar, das heißt, es konnte kein  $^3\text{H}$  markiertes Protein detektiert werden. Die Methylierung in Gegenwart von Aspartat (Spur 2 und 5) ist effizienter als die Methylierung ohne Ligand. Zur quantitativen Analyse wurde die Radioaktivität nach alkalischer Hydrolyse der methylierten Proteine gemessen (Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Diagramm zur Szintillationsmessung (nach 48 h alkalischer Hydrolyse) von Tar, Tar/Tar $\Delta$  und Tar $\Delta$  zum Vergleich der Methylierungseffizienz unter Ligandeneinfluss. Für Tar/Tar $\Delta$  wurde die Bezeichnung (K) gewählt, um zu verdeutlichen, dass es sich bei der Messung Tar (K) um Tar aus Tar/Tar $\Delta$  handelt, ebenso gilt dies für Tar $\Delta$  (K).

Der Vergleich der Radioaktivitäten des Reaktionsansatzes ohne Ligand (weiß) und mit Ligand (grau) für Tar zeigt deutlich mehr Impulse pro Zeit (cpm) für die Methylierung in

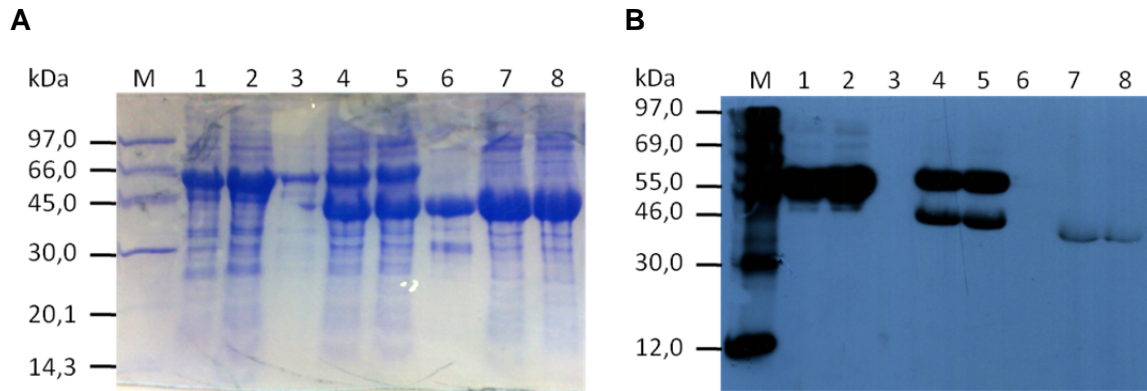
Gegenwart von Aspartat. Die Radioaktivität ist um ein Drittel erhöht. Tar (K) bezeichnet die reine Tar-Probe aus dem Ansatz, in welchem Tar und Tar $\Delta$  zusammen in Liposomen methyliert wurden. Da die Reaktionsansätze über ein Gel aufgetrennt und dann die entsprechenden Banden für Tar und Tar $\Delta$  ausgeschnitten wurden, konnten Tar und Tar $\Delta$  einzeln analysiert werden, obwohl die Methylierung zusammen rekonstituiert in Liposomen erfolgte. Die Radioaktivität für Tar (K) liegt in beiden Ansätzen (mit und ohne Aspartat) etwa bei 650 cpm. Die gemessenen Impulse pro Minute liegen für den Methylierungsansatz mit Aspartat etwas höher, aber es kann kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Für Tar $\Delta$  (K) ist die gemessene Radioaktivität im Ansatz mit Aspartat höher. In diesem Ansatz ist 30% mehr Protein mit einer Methylgruppe modifiziert worden als in der Reaktion ohne Ligand. Im Vergleich zu modifiziertem Tar liegt die Radioaktivität nur bei der Hälfte. Für Tar $\Delta$  konnte ebenfalls Radioaktivität detektiert werden. Das Fluorogramm (Abbildung 38B, Spur 8 und 9) zeigte keine deutliche Bande auf Höhe von Tar $\Delta$ , was an einer zu niedrigen Konzentration und zu geringer Belichtungszeit des Films liegen kann. Die Szintillationsmessung ergibt für Tar $\Delta$ R214C eine Radioaktivität von 300 cpm sowohl mit als auch ohne Ligand. Insgesamt liegt die Radioaktivität von Tar $\Delta$ R214C ebenfalls um die Hälfte niedriger als die von Tar.

Die Anwesenheit von Aspartat bei der Methylierung hat einen positiven Einfluss auf die Reaktion. Somit kann die Effizienz der Reaktion durch Anwesenheit von Ligand gesteigert werden.

Die Methylierungsreaktion findet in Proteoliposomen statt. Sowohl CheR als auch Aspartat liegen in der Reaktionslösung vor, nicht aber im Inneren der Liposomen. Von den Rezeptoren sind sowohl einige mit der LBD als auch einige mit der cytoplasmatischen Domäne nach aussen gerichtet. Damit ein Rezeptor sowohl methyliert werden, als auch Ligand binden kann, muss die Reaktionslösung auch ins Innere der Liposomen gelangen. Dies ist bei *leaky liposomes* möglich.

#### **4.3.3.5 Methylierung von Tar $\Delta$**

In diesem Experiment soll die Methylierung von Tar $\Delta$  genauer analysiert werden. Die Effizienz der Methylierung von Tar $\Delta$  ist insgesamt niedriger als die Methylierungseffizienz von Tar. In vorherigen Untersuchungen zeigte das Fluorogramm (Abbildung 38 B) keine Bande für Tar $\Delta$ , so dass nur von einer sehr geringen Methylierungseffizienz auszugehen ist. Um die Detektion zu erleichtern, wurden für weitere Versuche höhere Konzentrationen an Tar und Tar $\Delta$  gewählt. Dies ermöglicht den Vergleich von Tar $\Delta$  allein und Tar $\Delta$ /Tar. Es wurden äquimolare Mengen Tar und Tar $\Delta$  eingesetzt. Das Experiment erlaubte darüber hinaus die Untersuchung des Einflusses der Nähe von Tar zu Tar $\Delta$  bei der Methylierung.

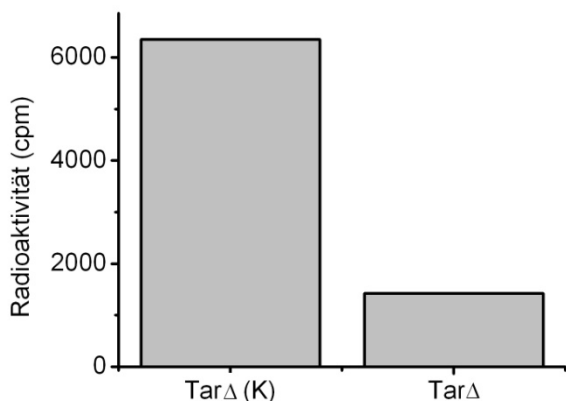


**Abbildung 40:** (A) 12%iges SDS Polyacrylamid Gel der Methylierungsreaktion von Tar, Tar/Tar $\Delta$  und Tar $\Delta$ . (B) Fluorogramm des in A dargestellten Gels. M: LMW/ <sup>14</sup>C-Marker; 1: Tar, 2: Tar + Asp, 3: Tar (unmethyliert), 4: Tar/Tar $\Delta$ , 5: Tar/Tar $\Delta$  + Asp, 6: Tar $\Delta$  (unmethyliert), 7: Tar $\Delta$ , 8: Tar $\Delta$  + Asp.

In Spur 1 und 2 des Coomassie gefärbten Gels A ist Tar nach Methylierung in Gegenwart von Asp oder in Abwesenheit von Asp aufgetragen (Abbildung 40). Die Tar Bande ist deutlich bei 60 kDa zu erkennen. Es sind auch einige Verunreinigungen auf dem Gel zu sehen. Das gleiche gilt für Tar in Spur 3, welches als Orientierungshilfe für das Ausschneiden von Banden mit aufgetragen wurde. Die Bande für das Zielprotein ist bei 60 kDa zu erkennen. In Spur 4 und 5 sind Tar/Tar $\Delta$  nach der Modifikation mit einer Methylgruppe aufgetragen. Für diese Reaktion wurden Tar und Tar $\Delta$  miteinander inkubiert, dann in Liposomen rekonstituiert und anschließend methyliert (-/+ Asp) und aufgereinigt. Es sind zwei Banden bei 60 kDa und 40 kDa auf dem Gel zu sehen, welche Tar und Tar $\Delta$  zugeordnet werden können. In Spur 6 ist Tar $\Delta$  als Kontrolle aufgetragen. In Spur 7 und 8 läuft methyliertes Tar $\Delta$ . Bei 40 kDa ist eine Bande für Tar $\Delta$  zu erkennen.

Das Fluorogramm B zeigt in Spur 1 und 2 zwei Banden bei ca. 60 kDa, welche Tar zugeordnet werden können. Da hohe Proteinkonzentrationen auf das Gel aufgetragen wurden, sind die Banden auf dem Fluorogramm sehr ausgeprägt. Der Vergleich der Intensitäten zwischen methyliertem Tar ohne und mit Aspartat gestaltet sich daher schwierig, so dass auf diesen verzichtet wird. In Spur 4 und 5 sind je zwei Banden zu erkennen. Die obere Bande läuft bei ca. 60 kDa und die untere bei 40 kDa. Die obere Bande kann dem Protein Tar zugeordnet werden und die untere Bande dem verkürzten Protein Tar $\Delta$ . In der Ausprägung der Banden sind geringfügige Unterschiede zu sehen. Die Tar Bande ist stärker ausgeprägt als die Bande von Tar $\Delta$ , welche im Vergleich schwächer ist. In Spur 7 und 8 ist Tar $\Delta$  nach Methylierung aufgetragen und es ist eine Bande (in beiden Spuren) bei 40 kDa zu erkennen, welche dem Zielprotein zugeordnet werden kann. Die Intensität der Bande ist sehr viel schwächer verglichen mit Tar $\Delta$  in Spur 4 und 5. Um den Unterschied besser abschätzen zu können, wurden die Banden für Tar  $\Delta$  von Spur 4 und Spur 7 aus dem SDS Gel ausgeschnitten und die Radioaktivität nach alkalischer Hydrolyse gemessen (Abbildung 41).





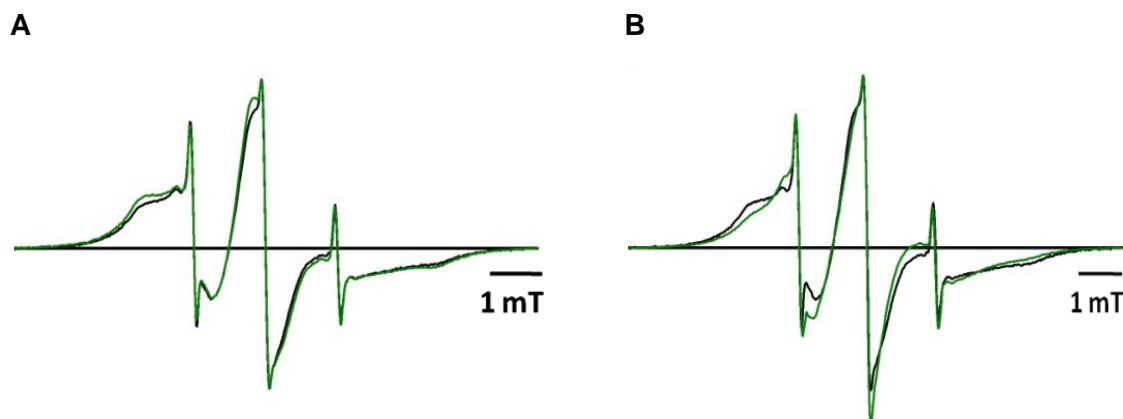
**Abbildung 41:** Diagramm zur Szintillationsmessung von Tar $\Delta$  im Komplex mit Tar (Tar $\Delta$  (K)) und Tar $\Delta$  zum Vergleich der Methylierungseffizienz nach 48 h.

Für Tar $\Delta$ , welches zusammen mit Tar in Liposomen vorlag, wurde eine Radioaktivität von 6000 cpm gemessen. Bei der Szintillationszählung von Tar $\Delta$  betrug die Radioaktivität 1500 cpm. Tar $\Delta$  (K) zeigte eine vierfach höhere Radioaktivität im Vergleich zu Tar $\Delta$ . Da beide Versuche mit gleicher Proteinkonzentration durchgeführt wurden, kann gefolgert werden, dass die Effizienz der Methylierung von Tar $\Delta$  im Ansatz mit Tar zusammen um ein Vierfaches höher ist. Die räumliche Nähe von Tar hat einen positiven Einfluss auf die Methylierungsreaktion von Tar $\Delta$ .

#### 4.3.4 ESR Messungen von SRII/HsHtrII398

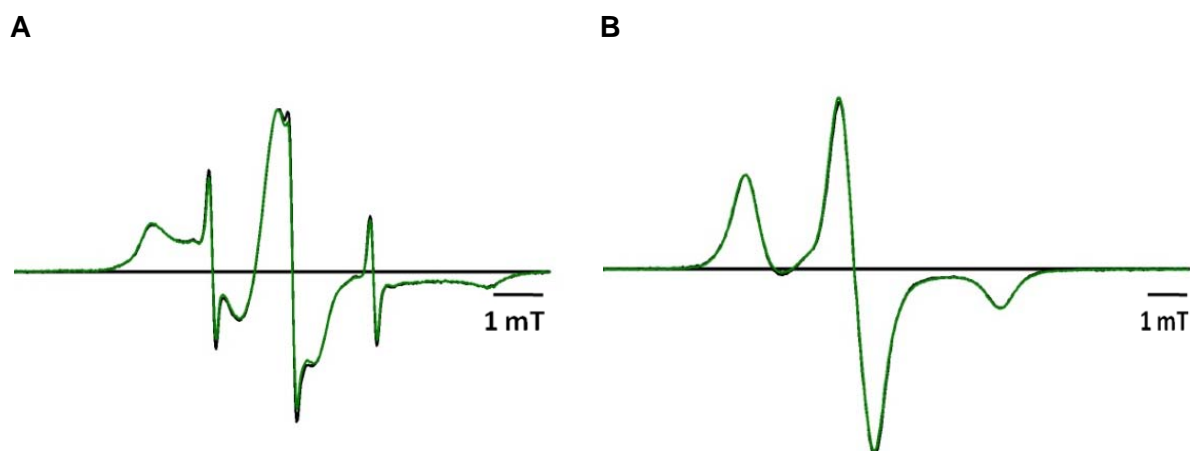
HsHtrII besitzt eine Ligandenbindedomäne und bindet den Liganden Serin. Die Signalweiterleitung erfolgt über die HAMP Domäne zur distal liegenden Histidin-Kinase CheA. Im Komplex mit dem sensorischen Rhodopsin HsSRII wird ein Lichtreiz vom Rhodopsin auf den Transducer übertragen. Mittels ESR Spektroskopie wurde untersucht, welche Auswirkungen Ligandenzugabe auf die Umgebung bestimmter Seitenketten hat und welchen Einfluss Lichteinstrahlung auf die Mobilität dieser Seitenketten hat.

Hierfür wurden die Positionen I298 und V302 ausgewählt und zu Cysteinen mutiert, um über eine Disulfidbrücke eine Spinmarkierung in das Protein einzubringen. Die ausgewählten Positionen sind analog zu Aminosäuren V78 und L82 in NpHtrII. Als sensorisches Rhodopsin wurde anstatt HsSRII das NpSRII zur Komplexbildung verwendet, da dieses Protein in höheren Ausbeuten aufgereinigt werden konnte.



**Abbildung 42:** ESR Spektren bei RT von (A) NpSRII/HsHtrII398 I298-SL ohne (schwarz) und mit Serin (grün) und (B) NpSRII/HsHtrII398 I298-SL vor (schwarz) und nach Lichtaktivierung (grün).

Das Spektrum (Abbildung 42A, schwarz) zeigt eine Linienverbreiterung, was typisch für eine immobile Seitenkette ist. Zudem ist noch wenig freier Spinlabel vorhanden. Dieser konnte trotz mehrerer Waschschriffe nicht entfernt werden. Auch der Einsatz einer anderen Spinsonde (Iodacetamid Spinmarkierung, vgl. 3.2.4) führte nicht zu besseren Spektren. Nach Ligandenzugabe (A, grün) ist ein Anstieg der immobilen Komponente zu beobachten. Durch die Bindung von Serin tritt eine Veränderung der Umgebung der Seitenkette I298 ein, indem diese weniger beweglich wird. Nach Aktivierung mit Licht der Wellenlänge 532 nm (B, grün) sinkt der Anteil der immobilen Komponente, wohingegen sich der Anteil an mobiler Komponente erhöht. Durch Lichtaktivierung wird die Seitenkette mobiler. Dies steht im Gegensatz zur Ligandenaktivierung des Transducers. Das Lichtsignal ist ein negativer und Serin ein positiver Stimulus. Es ist also schlüssig, dass die beiden unterschiedlichen Signale gegensätzliche Wirkungen hervorrufen. Ein negativer Stimulus führt zu erhöhter Beweglichkeit der Seitenkette und ein positiver Stimulus vermindert die Beweglichkeit.



**Abbildung 43:** Raumtemperatur ESR Spektren von (A) HsSRII/HsHtrII398 V302-SL ohne (schwarz) und mit Serin (grün) und Tiefentemperaturspektrum (170 K) von (B) HsSRII/HsHtrII398 V302-SL vor (schwarz) und nach Lichtaktivierung (grün).

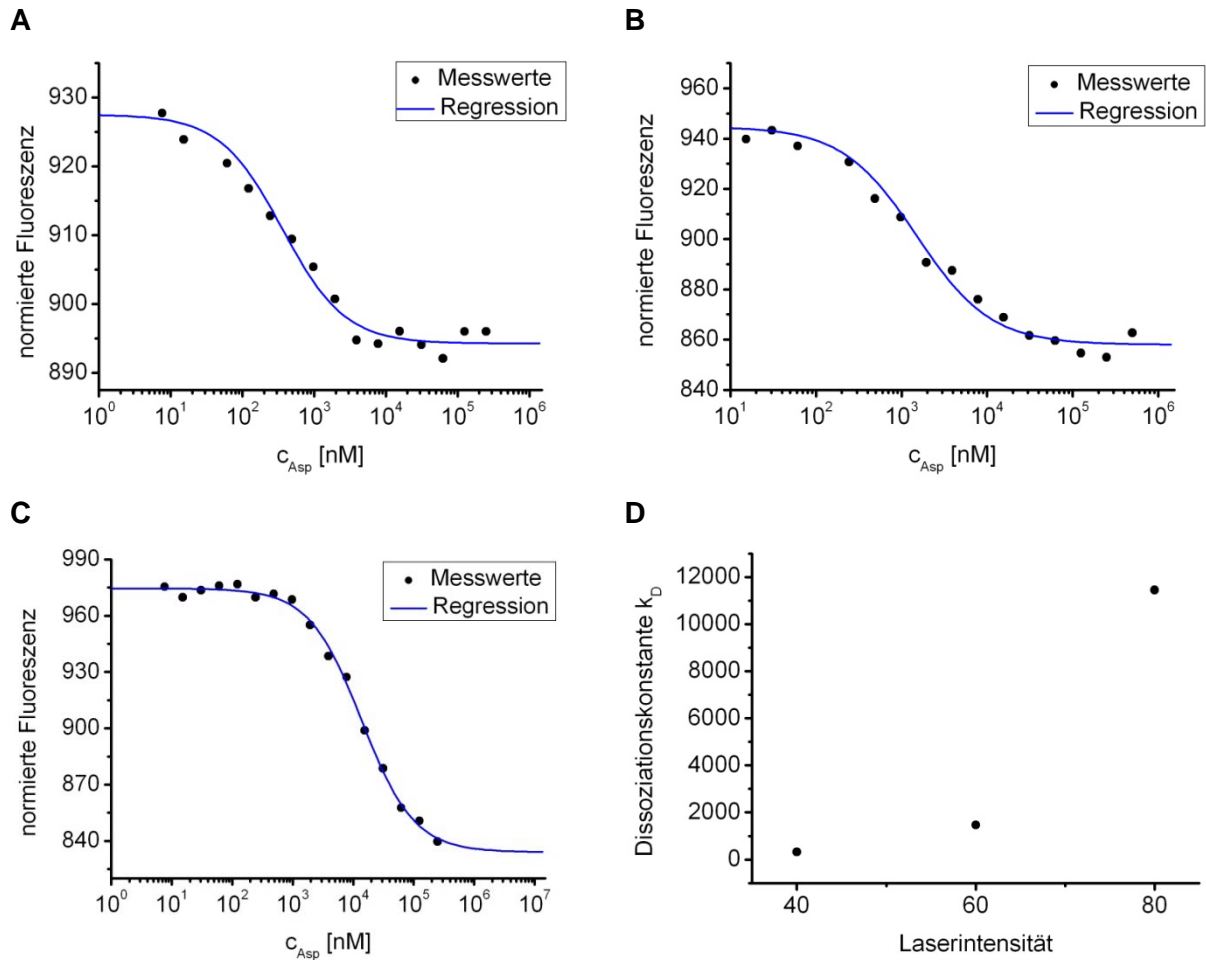
Diagramm A zeigt ein ESR Spektrum, welches typisch für eine immobile Spinsonde ist (Abbildung 43). Die immobile Komponente ist stark und die mobile Komponente weniger stark ausgeprägt. Der Vergleich zwischen dem Spektrum ohne Ligand (schwarz) und dem Spektrum mit Ligand (grün) zeigt keine Unterschiede. Nach Ligandenzugabe kann keine Änderung der Beweglichkeit der Sonde an Position 302 in HsHtrII nachgewiesen werden. Auch die Bestrahlung mit Licht (B, grün) zeigt keine Veränderung im Tieftemperaturspektrum von HsSRII/HsHtrII398 V302-SL (schwarz).

#### **4.3.5 Thermophoresemessungen**

Über das Messen der Thermophorese kann die Dissoziationskonstante  $k_D$  zweier Bindungspartner bestimmt werden. Es ist möglich verschiedene Bindungen zu charakterisieren, wie Protein-Protein Wechselwirkungen oder Protein-Ligand Wechselwirkungen. Für den Aspartatrezeptor wurde die Bindung zu dem Liganden Aspartat untersucht und für HsHtrII wurde die Bindung zu Serin betrachtet.

##### **4.3.5.1 Tar und Aspartat**

Für dieses Experiment wurde Tar N-terminal fluoreszenzmarkiert (siehe 3.2.9.2) und die Konzentration konstant gehalten. Die Konzentration des Liganden Aspartat wurde von 7 nM bis 250  $\mu$ M variiert. Es wurden je vier Messungen bei unterschiedlichen Laserintensitäten (40%, 60% und 80%) durchgeführt (Abbildung 44).



**Abbildung 44:** Thermophoresemessung von Tar mit Aspartat bei (A) 40% Laserintensität, (B) 60% Laserintensität und (C) 80% Laserintensität. (D) Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten von der Laserintensität.

In Diagramm A ist die normierte Fluoreszenz in Abhängigkeit der logarithmischen Konzentration von Aspartat bei einer Laserintensität von 40% aufgetragen. Es sind geringe Abweichungen zwischen den Messwerten und der Regression zu erkennen. Für die Untersuchungen bei höheren Laserintensitäten (B und C) kann der gleiche Verlauf der Regressionskurve beobachtet werden. Die Messwerte können nicht genau mit der Ausgleichsgeraden beschrieben werden. Es sind geringe Abweichungen in den Diagrammen zu erkennen. Aus den Ausgleichskurven wird die Dissoziationskonstante  $k_D$  berechnet (Tabelle 5).

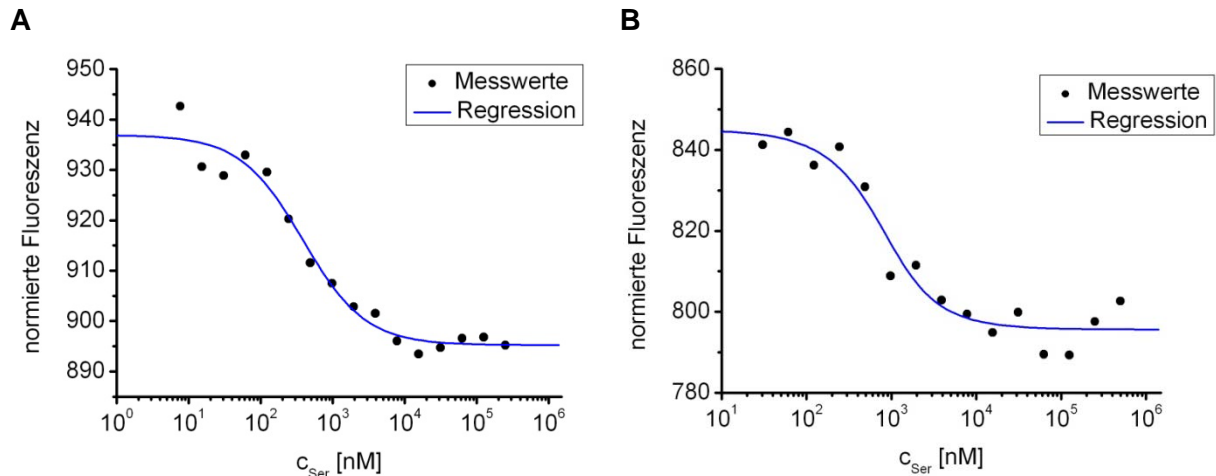
**Tabelle 5:** Zusammenfassung der Dissoziationskonstanten von Tar mit Aspartat.

Tar + Asp			
Messung	$k_D$ [nM](40%)	$k_D$ [nM](80%)	$k_D$ [nM](60%)
1	360 ± 24	10982 ± 416	1465 ± 120
2	445 ± 19	13719 ± 273	
3	118 ± 13	9780 ± 470	
4	349 ± 19	11316 ± 273	

Für Tar mit Asp bei einer Laserintensität von 40 % wurden die Dissoziationskonstanten für vier Messungen zu 360 nM, 446 nM, 118 nM und 350 nM berechnet. Die Standardabweichung betrug zwischen ± 14 nM und 25 nM. Es ergibt sich ein durchschnittlicher  $k_D$  von 319 nM für Tar und Aspartat. Bei einer Laserintensität von 60% wurde nur eine Messung durchgeführt. Der berechnete  $k_D$  betrug 1,47  $\mu\text{M} \pm 0,12$ . Die Messungen bei einer Laserintensität von 80% ergaben Dissoziationskonstanten von 10,98  $\mu\text{M}$ , 13,72  $\mu\text{M}$ , 9,78  $\mu\text{M}$  und 11,32  $\mu\text{M}$  mit Standardabweichungen zwischen ± 0,47  $\mu\text{M}$  und 0,27  $\mu\text{M}$ . Der durchschnittliche  $k_D$  -Wert liegt bei 11,45  $\mu\text{M}$ . Auffällig ist, dass die Werte für die Dissoziationskonstanten ansteigen, wenn eine höhere Laserintensität verwendet wird. Dies ist in Abbildung 44D graphisch dargestellt. Der  $k_D$  -Wert liegt für Tar und Asp bei 40 % Laserintensität um eine Zehnerpotenz niedriger als bei 80% Intensität.

#### 4.3.5.2 HsHtrII und Serin

Die Bindung von Serin zu HsHtrII wurde ebenfalls mittels Thermophoresemessung bestimmt. Die Konzentration an N-terminal markiertem HsHtrII wurde bei 80 nM konstant gehalten und die Konzentration an Serin wurde von 7 nM bis 500  $\mu\text{M}$  variiert. Es wurden Laserintensitäten von 40% und 80% eingestellt, wobei je vier Messungen durchgeführt wurden (Abbildung 45).



**Abbildung 45:** Thermophoresemessung von HsSRII mit Serin bei (A) 40% Laserintensität, (B) 80% Laserintensität.

In beiden Diagrammen ist die normierte Fluoreszenz in Abhängigkeit der Konzentration an Serin (logarithmisch) aufgetragen. Die Regressionsgerade (blau) weicht leicht von den Messwerten (schwarz) ab, so dass die Auswertung ungenau ist. Die Ausgleichskurve ermöglicht das Berechnen der Dissoziationskonstanten von HsHtrII und Serin.

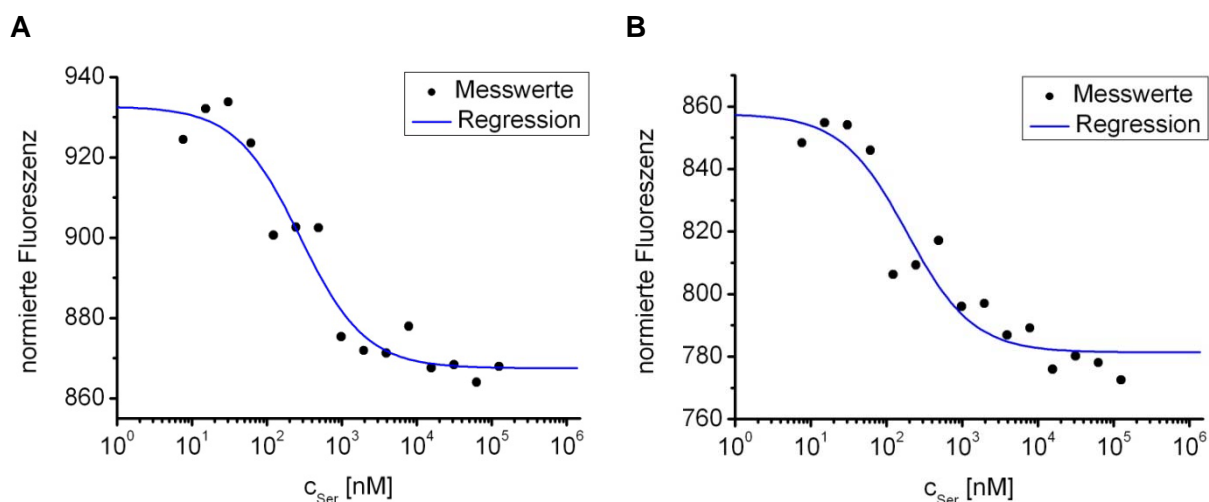
**Tabelle 6:** Zusammenfassung der Dissoziationskonstanten von HsSRII mit Serin.

HsHtrII + Ser		
Messung	$k_D$ [nM](40%)	$k_D$ [nM](80%)
1	$804 \pm 94$	$428 \pm 35$
2	$1311 \pm 124$	$163 \pm 7$
3	$692 \pm 92$	$848 \pm 113$
4	$280 \pm 24$	$281 \pm 24$

Die  $k_D$ -Werte für HsHtrII mit Ser bei einer Laserintensität von 40 % liegen bei 805 nM, 1312 nM, 692 nM und 281 nM (Tabelle 6). Daraus ergibt sich ein durchschnittlicher  $k_D$  von 773 nM. Die Messungen bei einer Laserintensität von 80% ergaben Dissoziationskonstanten von 428 nM, 164 nM, 848 nM und 281 nM mit Standardabweichungen zwischen  $\pm 114$  und 8 nM. Es ergibt sich ein durchschnittlicher  $k_D$  -Wert von 430 nM. Die berechneten Dissoziationskonstanten für HsHtrII mit Serin liegen in der gleichen Größenordnung (773 nM (40%) und 430 nM (80%)).

### 4.3.5.3 HsHtrII398 und Serin

Zur Bestimmung der Thermophorese von HsHtrII398 wurde das Protein N-terminal mit einem Fluorophor markiert und die Konzentration konstant bei 148 nM gehalten. Die Konzentration des Liganden Serin wurde zwischen 500  $\mu$ M bis 7 nM verändert.



**Abbildung 46:** Thermophoresemessung von HsSRII398 mit Serin bei (A) 40% Laserintensität und (B) 80% Laserintensität.

Es sind geringe Abweichungen zwischen den Messwerten und der Regression zu erkennen (Abbildung 46A und B). Aus den Ausgleichskurven wurde die Dissoziationskonstante berechnet (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Zusammenfassung der Dissoziationskonstanten von HsSRII398 mit Serin.

HsHtrII398 + Ser		
Messung	$k_D$ [nM](40%)	$k_D$ [nM] (80%)
1	$277 \pm 26$	$187 \pm 18$
2	$251 \pm 33$	$125 \pm 20$
3	$111 \pm 27$	$679 \pm 124$
4	$88 \pm 17$	$548 \pm 68$

Für HsHtrII398 und Ser wurden die Dissoziationskonstanten der vier Messungen bei einer Laserintensität von 40 % zu 278 nM, 252 nM, 111 nM und 89 nM berechnet. Die Standardabweichung betrug zwischen  $\pm 18$  nM und 34 nM. Es ergibt sich ein durchschnittlicher  $k_D$  -Wert von 183 nM für den verkürzten Transducer und Serin. Bei einer Laserintensität von 80 % betrug die gemessene Dissoziationskonstante 188 nM, 125 nM, 680 nM und 548 nM. Der durchschnittliche  $k_D$  -Wert wurde zu 385 nM berechnet.

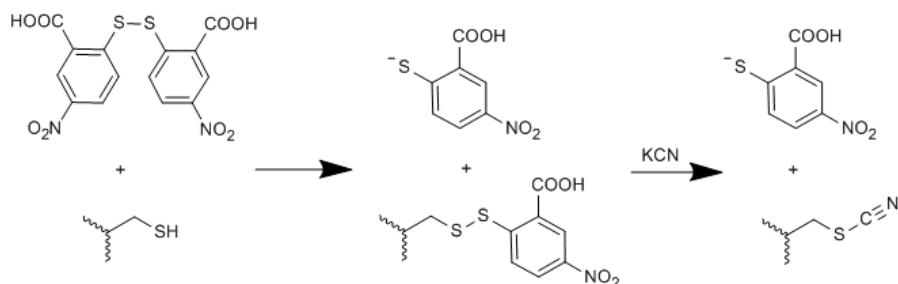
Auffällig ist, dass die Werte für die Dissoziationskonstanten ansteigen, wenn eine höhere Laserintensität verwendet wird, wie es auch bei Tar mit Aspartat beobachtet wurde. Die  $k_D$ -Werte für HsHtrII398 und Serin liegen jedoch in einer Größenordnung und weichen nicht so stark voneinander ab wie die  $k_D$ -Werte von Tar und Aspartat bei unterschiedlichen Laserintensitäten. Die Dissoziationskonstanten für HsHtrII und Serin sind größer (430 nM und 773 nM) als die  $k_D$ -Werte für den verkürzten Transducer (183 nM und 385 nM).

#### 4.4 Signaltransfer in Photorezeptoren

Untersuchungen zum Signaltransfer in Photorezeptoren wurden am Beispiel von NpSRII mittels NMR und FTIR Messungen durchgeführt.

##### 4.4.1 FTIR Messungen in NpSRII

Für FTIR Messungen wurde ein Thiocyanat als IR-Sonde verwendet. Hierzu wurde eine Thiocyanidgruppe kovalent an eine Cysteinseitenkette gebunden (vgl. 3.2.10 und 3.4.1).



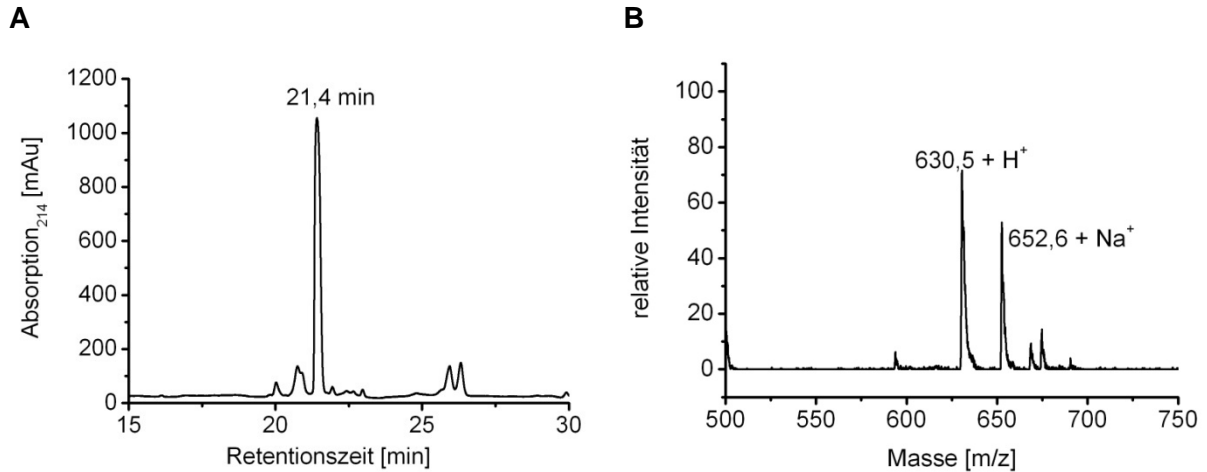
**Abbildung 47:** Reaktionsschema der Cyanylierung von Cystein (nach Fafarman et al., 2006).

Bei der Reaktion der Cysteinseitenkette mit Ellman's Reagenz entsteht ein Protein-Thionitrobenzoesäure-Disulfid als Intermediat. Dieses wird durch ein Cyanid ausgetauscht, wobei ein Protein-Thiocyanat entsteht (Abbildung 47) (Fafarman et al., 2006).

##### 4.4.1.1 FTIR Messungen Peptid

Zunächst wurde die Kopplung einer Thiocyanidgruppe an einem Peptid der Sequenz SVCAIL durchgeführt. Die Reaktion wurde über HPLC kontrolliert, wobei der Nachweis des Reaktionsprodukts über die Masse erfolgte.

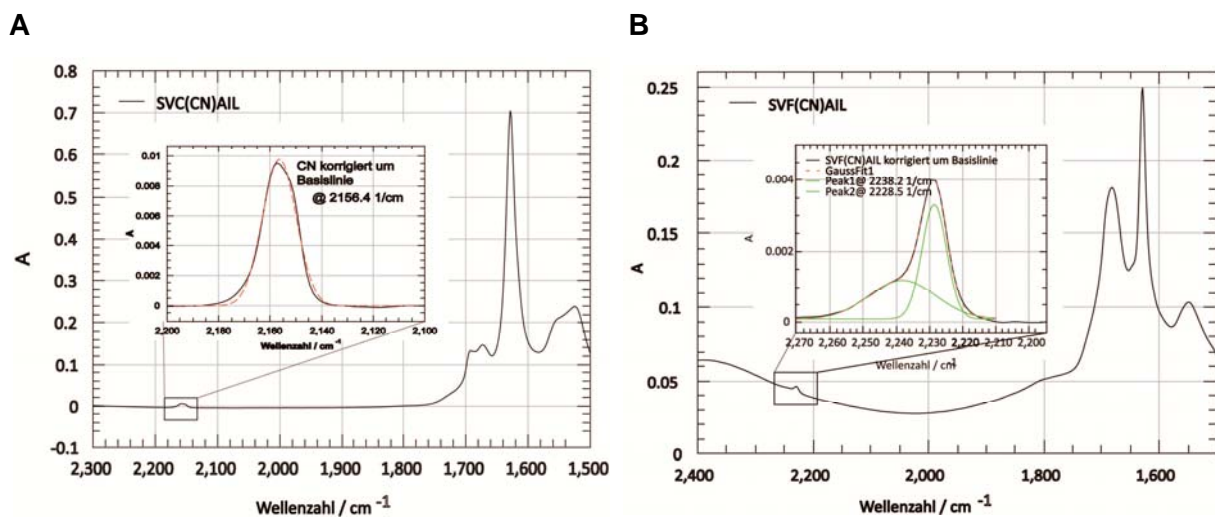




**Abbildung 48:** (A) HPLC-Chromatogramm der Cyanylierung von SVCAIL und (B) ESI-MS Spektrum von SVC<sub>(CN)</sub>AIL (Peak 21,4 min).

In dem HPLC Chromatogramm der Cyanylierung von SVCAIL ist die Retentionszeit des Reaktionsprodukts SVC<sub>(CN)</sub>AIL bei 21,4 min gezeigt (Abbildung 48A). Der Peak wurde gesammelt und mittels ESI-MS untersucht (Abbildung 48B). Die mittels ESI-MS ermittelte Masse von 630,5 g/mol [ $M + H^+$ ] stimmt mit der theoretischen Masse des cyanylierten Peptids von 629,8 g/mol überein. Ferner wurde das Natriumaddukt [ $M + Na^+$ ] detektiert (652,6 g/mol). Die Cyanylierung des Peptids SVCAIL konnte erfolgreich durchgeführt werden.

Die Absorptionsspektren und FTIR Messungen wurden von Hendrik Mohrmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Heberle (FU Berlin) aufgenommen.

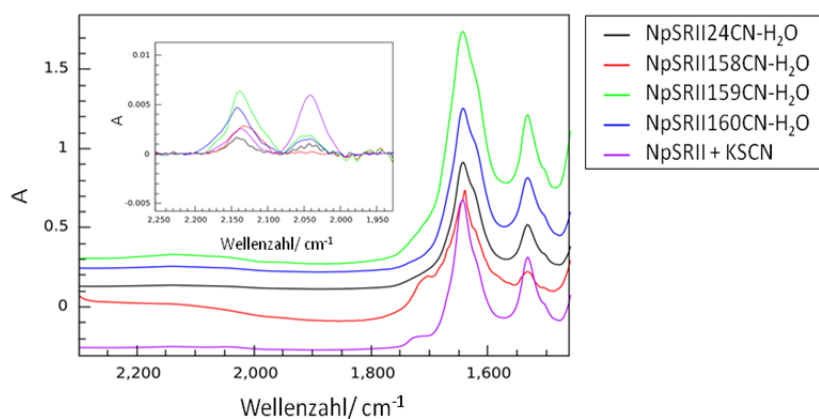


**Abbildung 49:** (A) Absorptionsspektrum des aufgetrockneten Films von SVC<sub>(CN)</sub>AIL und (B) SVF<sub>(CN)</sub>AIL.

Die Absorptionskoeffizienten von p-Cyano-Phenylalanin (p-Toluidin bei  $2227,2 \text{ cm}^{-1}$ ) und Cyano-Cystein (Methylthiocyanate bei  $2153,6 \text{ cm}^{-1}$ ) liegen beide bei  $300 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (Suydam und Boxer, 2003). Die Absorption der Cyano-Bande von  $\text{SVC}_{(\text{CN})}\text{SAIL}$  liegt bei 9 mOD bei  $2156,4 \text{ cm}^{-1}$  (Lit.:  $2153,6 \text{ cm}^{-1}$ , (Suydam und Boxer, 2003)), was in der eingeschobenen Vergrößerung deutlicher zu erkennen ist (Abbildung 49A). Im aufgetrockneten Film für  $\text{SVF}_{(\text{CN})}\text{AIL}$  ist eine doppelte Absorptionsbande bei  $2228 \text{ cm}^{-1}$  und bei  $2238 \text{ cm}^{-1}$  zu erkennen (Vergrößerung in Abbildung 49B). Dies stimmt mit den Literaturwerten für p-Toluidin überein (Suydam und Boxer, 2003). Die Amid I ( $1680 \text{ cm}^{-1}$  und  $1627 \text{ cm}^{-1}$ ) und Amid II ( $1546 \text{ cm}^{-1}$ ) Banden lassen vermuten, dass sich das Peptid  $\text{SVF}_{(\text{CN})}\text{AIL}$  zu einem  $\beta$ -Faltblatt faltet (Goormaghtigh et al., 1994). Die relative Absorption (in Relation zur Amid I Bande des Peptids  $\text{SVC}_{(\text{CN})}\text{AIL}$ ) liegt bei 80% derer des Peptids mit eingebautem p-Phenylalanin-Cyanid (B). Es kann von einem 80% igem Einbau ausgegangen werden, da die Absorptionen bei gleichem Extinktionskoeffizienten in der gleichen Größenordnung liegen.

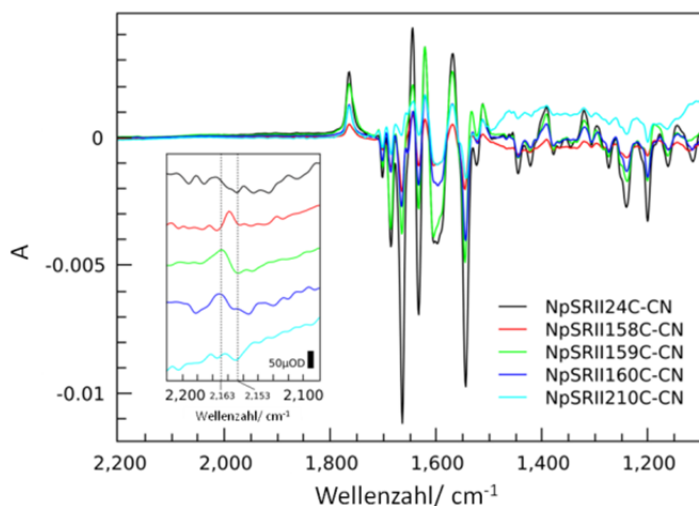
#### 4.4.1.2 FTIR Messungen NpSRII

Es wurden vier unterschiedliche Positionen in NpSRII ausgewählt, um eine Thiocyanidgruppe als IR-Sonde einzuführen. In Helix A wurde Position W24, in Helix F die Positionen S158, L159 und Y160 zu Cysteinen mutiert und für FTIR Messungen cyanyliert.



**Abbildung 50:** (A) FTIR Absorptionsspektren von NpSRII Mutanten (W24C, S158C, L159C, Y160C) und Wildtyp.

Im Absorptionsspektrum (Abbildung 50) ist in der Vergrößerung (Einschub von  $2250 \text{ cm}^{-1}$  bis  $1950 \text{ cm}^{-1}$ ) eine deutliche Absorption bei  $2150 \text{ cm}^{-1}$  für alle Proteine erkennbar, welche für die  $\text{C}\equiv\text{N}$  Streckschwingung der IR Sonde steht. Die Peakmaxima liegen bei  $2140 \text{ cm}^{-1}$  (NpSRII24C-CN, schwarz),  $2135 \text{ cm}^{-1}$  (NpSRII + KSCN, violett),  $2130 \text{ cm}^{-1}$  (NpSRII158C-CN, rot),  $2150 \text{ cm}^{-1}$  (NpSRII159C-CN, grün) und  $2150 \text{ cm}^{-1}$  (NpSRII160C-CN, blau).



**Abbildung 51:** Licht-Dunkel Differenzspektren von NpSR II Mutanten (W24C, S158C, L159C, Y160C und F210).

Es wurde ein FTIR Absorptionsspektrum unter Lichtausschluss aufgenommen und ein Spektrum nach Lichtaktivierung des sensorischen Rhodopsins und daraus die Differenz gebildet (Abbildung 51). In der Vergrößerung (Einschub) ist der Bereich von  $2200\text{ cm}^{-1}$  und  $2100\text{ cm}^{-1}$  dargestellt. Für NpSR II 24C-CN (schwarz) ist die Absorption der  $\text{C}\equiv\text{N}$  Streckschwingung der IR Sonde kaum sichtbar. Für NpSR II 158C-CN ist ein Peak bei  $2160\text{ cm}^{-1}$ , für NpSR II 159C-CN (grün) ist eine Absorption bei  $2163\text{ cm}^{-1}$  und für NpSR II 160C-CN ist eine Absorption bei  $2163\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. Zudem ist ein FTIR Spektrum von NpSR II 210C-CN aufgenommen worden, bei dem keine Absorption der  $\text{C}\equiv\text{N}$  Streckschwingung zu erkennen ist. Die Frequenz der  $\text{C}\equiv\text{N}$  Streckschwingung kann durch das äußere elektromagnetische Feld beeinflusst werden, was sich in einer Verschiebung des Absorptionsspektrums zu höheren oder niedrigeren Frequenzen bemerkbar macht (Stark Effekt). Die Absorption der  $\text{C}\equiv\text{N}$  Streckschwingung für NpSR II 158C-CN, 159C-CN und 160C-CN ist zu höheren Wellenzahlen verschoben. Dies spricht für eine Veränderung der Konformation des Proteins bei Lichtaktivierung an den Positionen 158, 159 und 160.

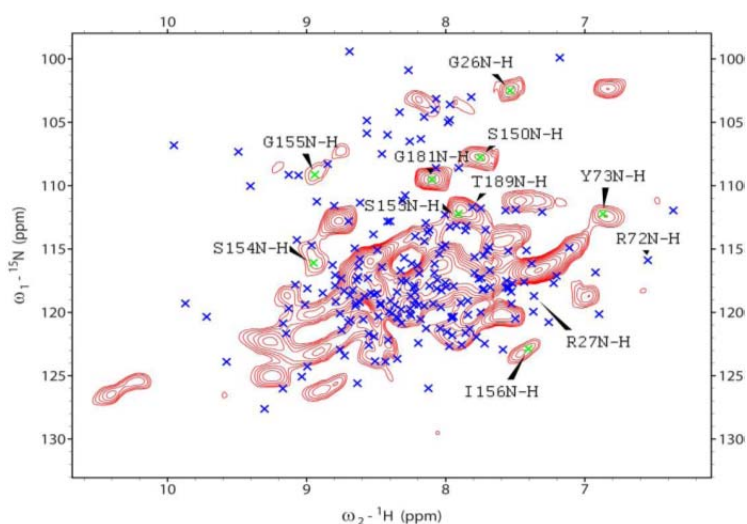
#### 4.4.2 Festkörper NMR von NpSR II

Strukturelle Untersuchungen an Membranproteinen stellen nach wie vor eine Herausforderung dar. Für NpSR II konnte die Röntgenkristallstruktur gelöst werden (Luecke et al., 2001 und Royant et al., 2001). Zudem wurden schon einige ssNMR Messungen an NpSR II zur Aufklärung von Struktur und Dynamik durchgeführt (Etzkorn et al., 2007). In diesem Abschnitt werden Messungen an ganzen Zellen, welche NpSR II exprimiert haben und an isoliertem, deuteriertem NpSR II beschrieben. Dies erfolgt um die generelle

Durchführbarkeit zu prüfen. Die ssNMR Messungen wurden von Sabine Gradmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Baldus (Universität Utrecht) durchgeführt.

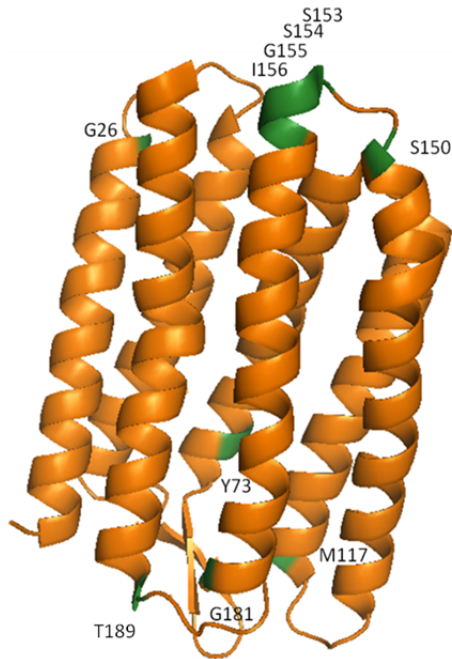
#### 4.4.2.1 Deutertes $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ NpSRII

Die Herstellung der Proben erfolgte wie in 3.2.1, 3.2.3.1 und 3.2.5 beschrieben. Für die Expression von NpSRII wurde  $\text{D}_2\text{O}$  anstelle von  $\text{H}_2\text{O}$  verwendet. Die Aufreinigung erfolgte in wässrigen Puffern. Das aufgereinigte Protein wurde in DMPC Liposomen rekonstituiert. Die Markierungseffizienz konnte mittels MALDI-MS bestimmt werden und lag bei ca. 80 %, da es zum Austausch von Deuterium mit Wasserstoff an der Proteinhülle kommt. Es können so Experimente zur Zugänglichkeit von Wasser ins Proteininnere durchgeführt werden.



**Abbildung 52:** 2D NH Experiment von deuteriertem NpSRII. Es wurden die Stickstoffe des Protein Rückgrats und direkt gebundene Protonen detektiert. Die Voraussagen der chemischen Verschiebungen, welche aufgrund von Flüssigkeits-NMR und ssNMR Messungen gemacht wurden, sind blau dargestellt. Es konnten einige Peaks identifiziert werden (grüne Kreuze).

Die Vorhersagen der chemischen Verschiebungen wurden aufgrund der Untersuchungen von Flüssigkeits-NMR Spektroskopie (Gautier et al., 2010) und ssNMR (Etzkorn et al., 2007) Experimenten gemacht. Bei der Analyse der Spektren (Abbildung 52) fällt auf, dass eine Übereinstimmung zwischen den experimentellen Daten (rot) und Vorhersagen (blau) im Bereich von 120 ppm vorliegt. Dieser Bereich repräsentiert die zentrale,  $\alpha$ -helikale Region des Proteins. Nicht alle vorhergesagten Korrelationen sind im experimentell ermittelten Spektrum zu finden. Dies ist in der Unzugänglichkeit einiger Seitenketten begründet, die deuteriert vorliegen, aber nicht mit Wasser austauschen können. Dies führt zu einem reduzierten NMR Spektrum, was die Interpretation der Daten vereinfacht. Die identifizierten Reste liegen hauptsächlich in den Loop-Regionen von NpSRII (Abbildung 53).

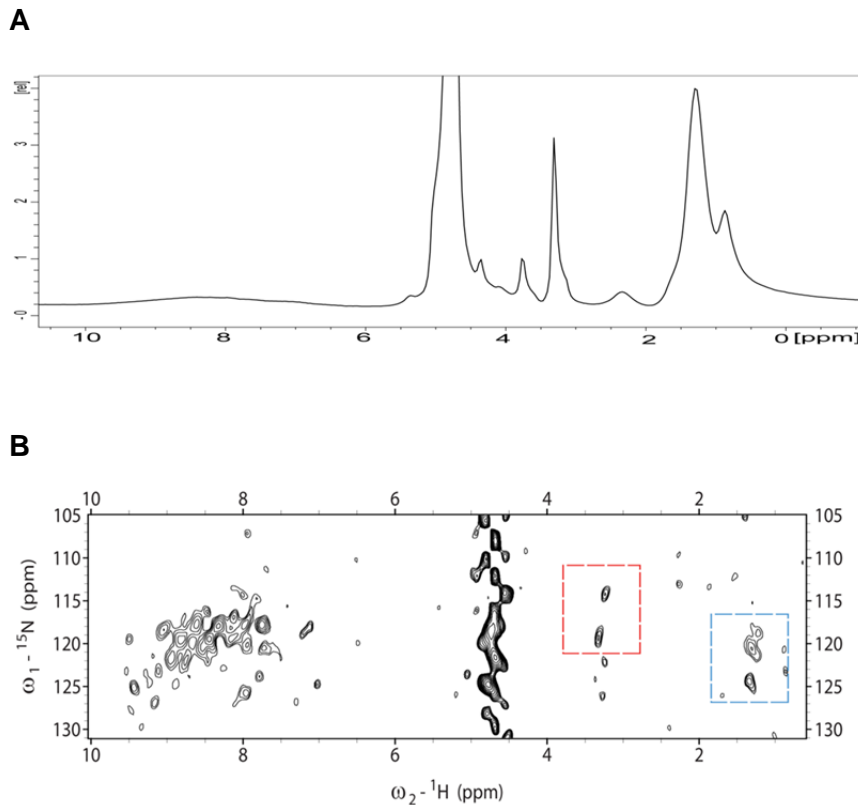


**Abbildung 53:** Struktur von NpSR II (PDB1GU8). Aus NMR Daten identifizierte Aminosäuren sind grün dargestellt.

In Helix A wurde Position G26 identifiziert, wobei der Rest nahe der Loop-Region liegt. Des Weiteren konnte Y73 aus den NMR Daten bestimmt werden. Diese Aminosäure liegt in Helix C, ebenfalls nahe der Loop-Region. Methionin 117 liegt am C-terminalen Ende von Helix D und die Positionen S150, S153, S154, G155 und I156 sind im Loop positioniert, der Helix E mit Helix F verbindet. Die Positionen G181 und T189 liegen im Loop-Bereich von Helix F und Helix G.

Die identifizierten Aminosäuren liegen alle nahe der Loop-Region des Proteins und sind somit für den Austausch mit Wasser zugänglich.

Von derselben Probe wurde ein 1D  $^1\text{H}$  Spektrum aufgenommen, um Protein-Lipid Kontakte zu untersuchen. Hierzu wurde ein  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Mischschritt (50 ms) eingefügt.



**Abbildung 54:** (A) 1D Proton Spektrum und (B) 2D NHH Spektrum mit 50 ms Mischschritt von deuteriertem NpSRII. Die gestrichelten Linien weisen auf Korrelationen zwischen Stickstoff und nicht direkt gebundene Protonen hin. Die Signale rühren entweder von Protein-Lipid Kontakten (rote und blaue Boxen) oder anderen Intra-Seitenkettenübertragungen her (blaue Box).

Die höchste Intensität kann dem Wasser (5 ppm) und der breite Peak in der Region von 7-10 ppm den Amid Protonen zugeordnet werden (Abbildung 54A). Die anderen Peaks stammen vermutlich von den Protonen der Lipide. In der Region von 0-2 ppm könnten Signale von protonierten Methylgruppen der Aminosäuren Val, Leu und Ile sichtbar sein.

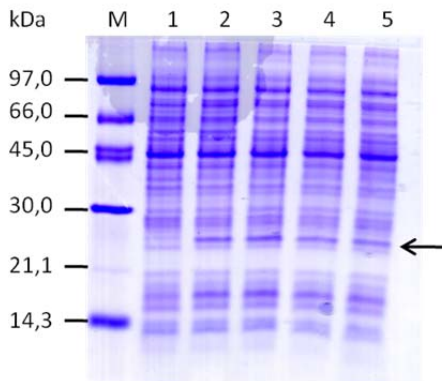
Bei Betrachtung des 2D NHH Spektrums von NpSRII ist in der Region von 7-10 ppm das NH Spektrum zu erkennen (Abbildung 54B). Der intensive Peak bei 5 ppm kann Wasser zugeordnet werden. In den gestrichelten Boxen sind Korrelationen zwischen <sup>15</sup>N und nicht direkt gebundenen Protonen zu erkennen. Die rot eingekästelten Signale stammen vom magnetischen Übertrag von <sup>15</sup>N auf Protonen der Lipide. Blau markierte Signale können entweder von Protein-Lipid Kontakten oder vom Transfer innerhalb der Seitenkette auf Methylgruppen stammen.

#### 4.4.2.2 <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N NpSRII in *E. coli* Zellen

Die Untersuchung von Membranproteinen in zellulärer Umgebung mittels ssNMR wurde 2012 von Renault et al. gezeigt. Es können Informationen über Komponenten aus der Zellmembran und auch über das Membranprotein an sich gewonnen werden (Renault et al., 2012).

Für dieses Experiment wurden *E. coli* Zellen angezogen, welche ein Plasmid zur Expression von NpSRII trugen. Das Nährmedium enthielt <sup>13</sup>C Glukose und <sup>15</sup>N Ammoniumchlorid, was in

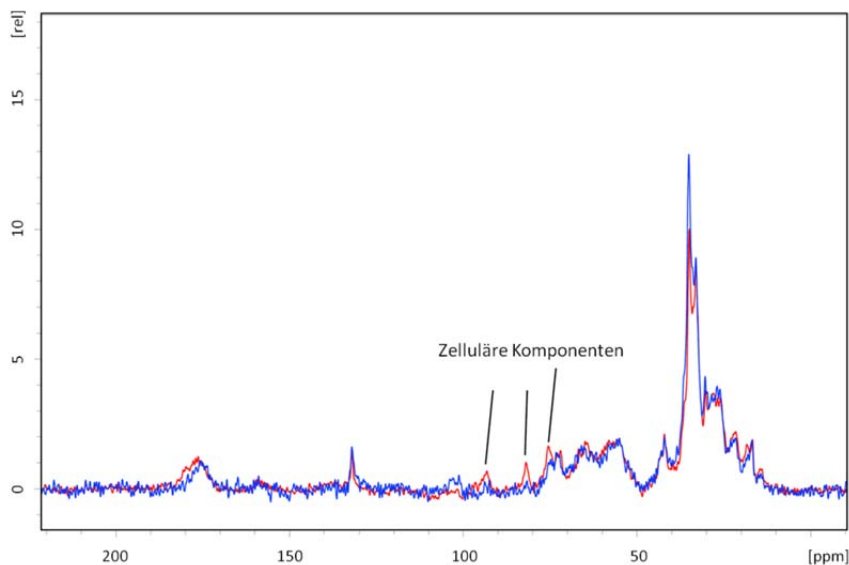
der Expression von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  markiertem NpSRII resultierte. In einem Ansatz wurden die Zellen in markiertem Medium angezogen und induziert, in einem zweiten Ansatz wurden die Zellen in nicht-markiertem Medium hochgezogen und erst bei Induktion in markiertes Nährmedium überführt.



**Abbildung 55:** 12%iges SDS Polyacrylamid Gel zur Expressionskontrolle von NpSRII in *E. coli* Zellen. M: LMW Marker, 1: 0 h, 2: 1 h nach Induktion, 3: 2 h nach Induktion, 4: 3 h nach Induktion, 5: 4 h nach Induktion. Der Pfeil markiert die NpSRII Bande.

Das SDS Gel stellt die Expressionskontrolle von NpSRII dar (Abbildung 55). Proben (nach 0 h bis 4 h) zu 0,05 OD wurden aufgetragen. Beim Vergleich des Bandenmusters von Spur 1 und 2 fällt auf, dass bei ca. 25 kDa eine neue Proteinbande erscheint. Das Molekulargewicht von NpSRII beträgt 26,6 kDa, so dass die neue Proteinbande NpSRII zugeordnet werden kann. Auch in Spur 3 bis 5 ist die Bande zu beobachten. Des Weiteren sind viele Banden von zellulären Komponenten zu erkennen.

Es wurden 1D dipolar-basierte  $^{13}\text{C}$  Spektren von beiden Ansätzen aufgenommen und miteinander verglichen (Abbildung 56).

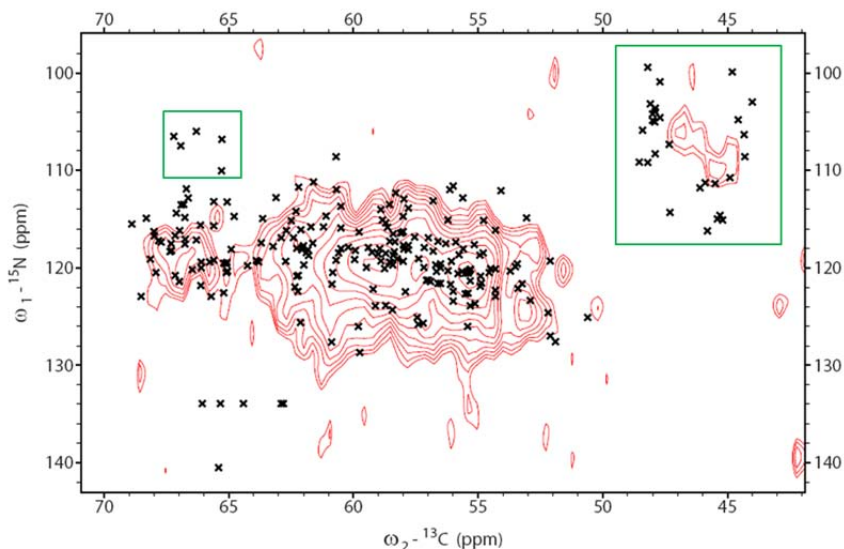


**Abbildung 56:** Vergleich der 1D dipolar-basierten  $^{13}\text{C}$  Spektren von zellulärem NpSR II, wobei die verschiedenen Ansätze in rot (Zellen wurden in markiertem Medium angezogen und induziert) und blau (Zellen wurden in nicht-markiertem Medium angezogen und bei Induktion in markiertes Medium überführt) dargestellt sind.

Bei Vergleich der Spektren fällt auf, dass der Ansatz, in welchen die Zellen von Beginn an auf markiertem Medium angezogen wurden (rot), ausgeprägtere Signale zeigt, welche ausschließlich von zellulären Komponenten stammen. Dies lässt sich damit erklären, dass der Einbau von Isotopen im zweiten Ansatz, wo das Wachstum in isotopenfreiem Medium erfolgte und erst bei Induktion ein Austausch gegen markiertes Medium durchgeführt wurde (blau), favorisiert ist.

In das 2D NCA Spektrum von zellulärem NpSR II wurden die chemischen Verschiebungen von NpSR II aus Vorhersagen von Flüssigkeits-NMR und ssNMR Experimenten eingefügt (Abbildung 57).





**Abbildung 57:** 2D NCA Spektrum von zellulärem NpSR II (rot). Voraussagen zur chemischen Verschiebung wurden auf Grund von Flüssigkeits-NMR und ssNMR Messungen von NpSR II gemacht (schwarze Kreuze).

In den markierten Regionen (grüne Kästchen) können keine intensiven Signale beobachtet werden, wobei die vorhergesagten chemischen Verschiebungen für NpSR II zum Teil in diesem Bereich liegen. Es müssen weitere Experimente durchgeführt werden, um eindeutige Signale in dieser Region von NpSR II zu erhalten.

Die geringe Sensitivität der Festkörper-NMR Untersuchung in ganzen Zellen limitiert die Anzahl weitere Untersuchungen. Die Signale von NpSR II sind nur schwach und die Signale, welche von den zellulären Komponenten stammen, dominieren das Spektrum. Die Untersuchungen sind jedoch eine Basis für weitere Experimente. Die Technik erlaubt die Untersuchung von NpSR II in einer Lipidumgebung und so könnten Unterschiede zur Präparation von Proteoliposomen aufgezeigt werden (Gradmann, 2013).

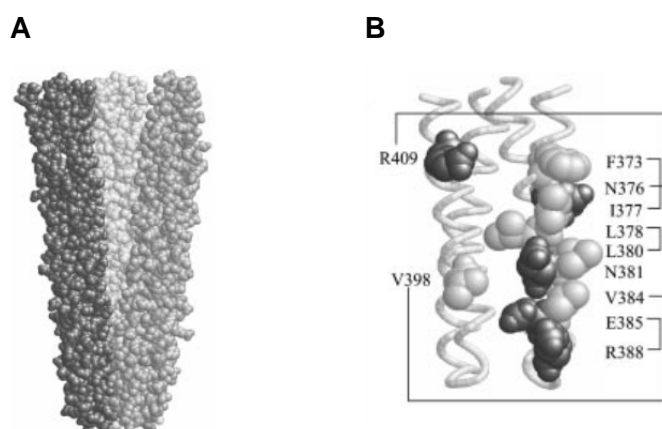
## 5 Diskussion

Die Diskussion ist in drei Unterpunkte aufgeteilt, welche die Analyse der Trimere von Dimeren, die Signalweiterleitung und Amplifikation in Chemo- und Photorezeptoren sowie die Methodenanwendung umfassen.

### 5.1 Oligomerisierung und Stabilität von Tar

Die Analyse des Oligomerisierungszustandes des Aspartatrezeptors (Tar) mittels Größenausschlusschromatographie zeigte, dass Tar höhere Oligomere/Aggregate und Hexamere ausbildet. Trimere von Dimeren (Hexameren) sind die Einheit des Rezeptors, die benötigt wird, um mit der Histidin-Kinase CheA in Interaktion zu treten (Boldog et al., 2006). Diese Untersuchungen geben Hinweise auf die Zusammenlagerung zu Trimeren von Dimeren in DDM-haltiger Lösung. Da der Aspartatrezeptor ein stäbchenförmiges Protein ist, sind die Berechnungen zur Größe der Oligomere über die Methode der Größenausschlusschromatographie nicht exakt. Proteine mit globulärer Struktur wurden als Proteinmarker verwendet, der die Grundlage zur Berechnung der molekularen Masse des zu untersuchenden Proteins darstellt.

Für den verkürzten Aspartatrezeptor ohne Ligandenbindedomäne (Tar $\Delta$ ) konnte mittels Größenausschlusschromatographie gezeigt werden, dass Tar $\Delta$  in DDM-haltiger Lösung ebenfalls als Trimer von Dimeren vorliegt. Die Kontaktflächen der Homodimere liegen im cytoplasmatischen Bereich und sind für alle chemotaktischen Rezeptoren konserviert (Kim et al., 1999). Durch hydrophobe Interaktionen, Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen treten drei Homodimere miteinander in Wechselwirkung (Kim et al., 1999) (Abbildung 58).

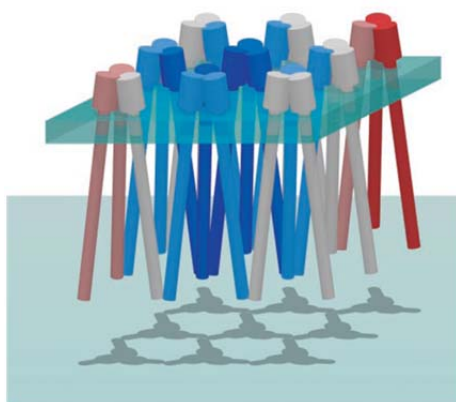


**Abbildung 58:** Strukturelle Merkmale eines Trimers von Dimeren des Serinrezeptors. (A) Signaldomäne von Tsr (AS 350 – 430) als Trimer von Dimeren (die Dimere sind in unterschiedlichen Grautönen gezeigt). (B) Peptidrückgrat eines Dimers mit Darstellung der Reste, welche mit den anderen Dimeren eines Trimers von Dimeren in Kontakt treten (Ames et al., 2002).

Untersuchungen zur Stabilität in detergenzhaltiger Lösung zeigten nach siebentägiger Lagerung bei 8°C definierte Trimere von Dimeren. Ein Austausch von Homodimeren in einem Gemisch von Tar Trimeren von Dimeren und Tar $\Delta$  Trimeren von Dimeren nach einer Stunde konnte mittels Gelfiltration nicht beobachtet werden, so dass davon ausgegangen wurde, dass die Dimere in den Trimeren in Lösung nicht innerhalb kurzer Zeit mit anderen Dimeren aus Trimeren austauschen.

In *E. coli* gibt es fünf Chemotaxisproteine (Tar, Tsr, Tap, Trg und Aer), von denen zwei (Tar und Tsr) in hoher Zahl vorkommen und drei (Tap, Trg und Aer) nur in geringer Zahl vertreten sind (etwa im 10-fachen Unterschuss) (Li und Hazelbauer, 2004). Alle fünf Rezeptoren besitzen jedoch identische Aminosäuren, um Trimerkontakte im cytoplasmatischen Bereich auszubilden, was zu der Annahme führt, dass in Chemorezeptorclustern gemischte Trimere von Dimeren anwesend sind, wobei die Grundeinheit aus einem Homodimer besteht (Studdert und Parkinson, 2005). Durch eine Vielzahl von *in vivo* Experimenten konnte dies bestätigt werden (Ames et al., 2002, Homma et al., 2004, Studdert und Parkinson, 2004, Studdert und Parkinson, 2005).

Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen der Gelfiltrationsexperimente in dieser Arbeit. Vermutlich würde eine längere Inkubationszeit den Austausch von Homodimeren innerhalb der Trimere von Dimeren ermöglichen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Zusammenlagerung von Trimeren von Tar $\Delta$  Homodimeren aufgrund der fehlenden Ligandenbindedomäne zu einer etwas anderen Geometrie führt. Durch die Ligandenbindedomäne in Tar und die Zusammenlagerung der Dimere am cytoplasmatischen Ende des Rezeptors entsteht eine kegelförmige Anordnung (Abbildung 59). Für Tar $\Delta$  könnte ein kompaktere Anordnung erwartet werden, da die LBD fehlt und keine sterische Hinderung entsteht.



**Abbildung 59:** Modell eines Clusters von chemotaktischen Rezeptoren (Kim et al., 2002).

Bei Analyse der Chemorezeptoren Tar und Tar $\Delta$  mittels *blue native* PAGE konnte sowohl die dimere Spezies, als auch die hexamere Spezies (Trimer von Dimeren) nachgewiesen

werden, wobei ebenfalls Aggregate gefunden wurden. Auch die Untersuchungen durch Kleinwinkelröntgenstreuung weisen auf die Existenz von Dimeren und Trimeren von Dimeren hin. Bei hohen Konzentrationen liegt das Gleichgewicht auf der Seite der Trimere von Dimeren und bei niedrigen Konzentrationen verschiebt es sich zu Dimeren. Fluoreszenzanisotropie Messungen zeigten, dass Tar $\Delta$  in geringen Konzentrationen ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ) als Dimer vorliegt. Dies stimmt mit der Theorie überein, dass Tar in Lösung in einem Gleichgewicht von Dimeren und Trimeren von Dimeren vorliegt, wobei sich das Gleichgewicht je nach Konzentration der Lösung verschiebt. Auffällig an den Chromatogrammen der separaten Gelfiltration von Tar und Tar $\Delta$  war, dass keine Rezeptor Dimere detektiert wurden, da diese die kleinste Einheit des Rezeptors darstellen (Milligan und Koshland, 1988). Die Probenaufgabe erfolgt bei der Gelfiltration in hohen Konzentrationen. Mit Hilfe des Laufpuffers wird die Probe auf die Säule aufgebracht und während des Auftrags verdünnt. Es sollten daher ebenfalls Homodimere von der Säule eluieren. Da keine Detektion einer dimeren Spezies erfolgte, kann der Anteil an Dimer nur sehr gering sein und das Gleichgewicht scheint zu großem Anteil zu der hexameren Spezies verschoben.

## 5.2 Die Amplifikation und Signalweiterleitung in Chemo-und Photorezeptoren

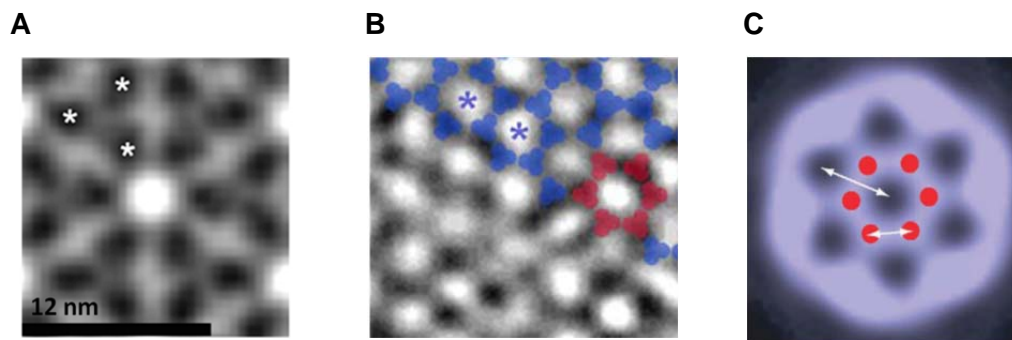
Man geht davon aus, dass sich Rezeptoren gegenseitig in ihrem Zustand (CheA Kinase aktiv/CheA Kinase inaktiv) stabilisieren und so kooperative Einheiten an Rezeptoren gemeinsam „geschaltet“ werden können (Bray et al., 1998, Kentner und Sourjik, 2008). Es besteht eine Signalamplifikation auf der Ebene der Rezeptor-Kinase Komplexe (Kentner und Sourjik, 2008). Die Anordnung der Rezeptoren in Clustern ermöglicht eine Kommunikation zwischen den MCPs und kann so zur kooperativen Signalverarbeitung beitragen. Die Kommunikation zwischen den Rezeptoren könnte über die HAMP Domäne stattfinden.

### 5.2.1 Intermolekulare Signalweiterleitung in Tar

Die Untersuchung des Aspartatrezeptors sollte in möglichst natürlicher Umgebung erfolgen. Daher bietet sich die Rekonstitution in Liposomen an. Es können Lipidzusammenstellungen gewählt werden, welche der Membranzusammensetzung des Bakteriums sehr ähnlich sind. In dieser Arbeit wurde zum einen ein *E. coli total lipid* Extrakt verwendet und zum anderen eine Lipidmischung aus PE:PG:PC (2:1:1) (Geertsma et al., 2008). Es wurden aufgereinigte Trimer von Dimer Tar Lösungen für die Rekonstitution in Liposomen verwendet. Durch Markierung der Rezeptoren mit fluoreszenten FRET Paaren, konnte ein Energieübertrag von einem Rezeptor auf den benachbarten Rezeptor gemessen werden. Der Übertrag kann nur

in einem definierten Abstand erfolgen, der durch die Eigenschaften der Fluorophore gegeben ist. Für die verwendeten Fluorophore beträgt der Försterradius, also der Abstand zweier Fluorophore bei dem die Effizienz des Energietransfers 50% beträgt, 7,4 nm. Die Beobachtung einer Energieübertragung spricht dafür, dass sich die fluoreszenzmarkierten Proteine in dichter Nähe zueinander befanden.

Briegel und Mitarbeiter, sowie Khursigara und Mitarbeiter zeigten, dass Chemorezeptoren in hexagonalen Clustern angeordnet sind und bestimmten die Abstände zwischen benachbarten Rezeptoren (Briegel et al., 2009, Khursigara et al., 2011), (Abbildung 60).



**Abbildung 60:** (A) Subtomogramm (gemittelt) eines *E. coli* Chemorezeptorarrays nach Anwendung einer sechsfach Symmetrie. Die Rezeptor Dimere sind klar definiert (weiße Sternchen), wobei ein Paar von Dimeren einem anderen an der Grenzfläche des Ringes gegenüberliegt (Briegel et al., 2012). (B) Fit von Trimeren von Dimeren (blau) in die Ecken eines hexagonalen Gitters in einem Chemorezeptorarray. Sechs Trimere von Dimeren (rot) umschließen ein Hexagon. Der Abstand vom Zentrum eines Hexagons zu einem angrenzenden beträgt einheitlich 12 nm (blaue Sternchen) (Briegel et al., 2009). (C) Der Abstand einer Trimer von Dimer Einheit zu einer benachbarten beträgt 7 nm (Khursigara et al., 2011).

Die Untersuchung der Proteoliposomen, welche fluoreszenzmarkierte Rezeptor Trimere von Dimeren enthielten, zeigte, dass auch die Rekonstitution der Trimere von Dimeren zu einem Cluster-ähnlichen Anordnung führt. Der Abstand der Rezeptoreinheiten zu einander in einem Rezeptorarray in *E. coli* beträgt ca. 7 nm (Khursigara et al., 2011). Der Abstand von Rezeptoreinheiten in Liposomen ist in der gleichen Größenordnung, da sonst kein Energieübertrag messbar wäre. Der Austausch von Dimeren zwischen den Rezeptoreinheiten aus Trimeren von Dimeren wäre ebenfalls denkbar, Gelfiltrationsexperimente zeigten jedoch stabile Rezeptor Trimere von Dimeren, die über einen kurzen Zeitraum nicht miteinander austauschen.

Für das sensorische Rhodopsin II und den Transducer HtrII aus *N. pharaonis* liegt, durch die Homologie des Transducers zu den Chemorezeptoren, die Vermutung nahe, dass sich diese Proteine ebenfalls zu Trimeren von Dimeren anordnen. Die Existenz von Trimeren von Dimeren konnte erstmals mittels Elektronenmikroskopie gezeigt werden (Bothe, 2014).

Die verwendeten Proteoliposomen mit Rezeptor Trimeren von Dimeren sind eine Möglichkeit den Aspartatrezeptor in natürlicher Umgebung zu untersuchen und ein künstliches Rezeptorcluster zu erstellen. So können Untersuchungen zu den Eigenschaften der Rezeptoren in Bezug auf ihre Nähe zu anderen Rezeptoren erfolgen und geprüft werden, ob eine Kommunikation zwischen den Rezeptoreinheiten besteht.

Die Untersuchung des Signaltransfers von einem Rezeptor Trimer von Dimeren auf ein benachbartes erfolgte neben Methylierungsexperimenten mittels Elektronenspinresonanz Spektroskopie. Der Volllängenrezeptor (Tar) wurde unmarkiert mit spinmarkiertem verkürzten Rezeptor (Tar $\Delta$ ) in Proteoliposomen vermessen. Die Markierung mit einer Spinsonde erfolgte im Bereich der HAMP Domäne, einer Signalumwandlungsdomäne. Die ESR Messungen an Position R214, T218 und T264 zeigten keine Veränderung der Raumtemperaturspektren nach Ligandenzugabe. An diesen Positionen tritt keine Veränderung der Umgebung auf, die den Spinlabel beeinflusst. Für Tar/Tar $\Delta$ I224 Proteoliposomen konnte eine Veränderung im ESR Raumtemperaturspektrum nach Ligandenzugabe beobachtet werden. Die Spinsonde wird mobiler, so dass von einer Veränderung der Umgebung in diesem Bereich ausgegangen werden kann. Dies bedeutet, dass der verkürzte Rezeptor ohne LBD das Signal der Ligandenbindung vom Volllängenrezeptor detektieren konnte. Das ESR Spektrum, welches bei tiefen Temperaturen aufgenommen wurde, zeigte jedoch keine Veränderungen nach Ligandenzugabe. Hier muss eine weitere Überprüfung der ESR Daten erfolgen.

Das Signal könnte über die HAMP Domäne übertragen worden sein. Das Gleichgewicht der HAMP Domäne zwischen einer dynamischen und kompakten Form könnte dabei der Weg der Übertragung sein. Durch die Nähe der HAMP Domäne zu der des benachbarten Rezeptors könnte der Wechsel zwischen kompaktem und dynamischem Zustand wichtig für die Signalübertragung sein. Wie genau eine transversale Signalweiterleitung über die HAMP Domäne aussehen könnte, ist jedoch rein spekulativ.

Eine weitere Möglichkeit die Signalübertragung zu untersuchen, sind Methylierungsexperimente. Das Chemotaxisprotein CheR ist Teil des Adaptationssystems in *E. coli*, welches dafür sorgt, dass Chemorezeptoren auf geringe Konzentrationsänderungen an Ligand reagieren können. Die Methyltransferase CheR bindet an die C-terminale Pentapeptid Sequenz NWETF des Aspartatrezeptors und methyliert diesen an vier Glutamaten (295, 302, 309 und 491), wobei die Positionen Q295 und Q309 posttranslational von der Methylesterase CheB deaminiert werden (Barnakov et al., 1999). Die Methylierung kann intramolekular erfolgen oder CheR modifiziert intermolekular benachbarte Rezeptoren. Die Erkennungssequenz für die Bindung von CheR an den Chemorezeptor liegt auf einem flexiblen Arm am C-Terminus (~ 30 Aminosäuren). Dadurch kann die Methyltransferase

sowohl an die Methylierungsstellen des gebundenen Rezeptors binden als auch an Methylierungsstellen benachbarter Rezeptoren (Muppirala et al., 2009).

Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Methylierung von Tar an Position E302 stattfindet. Ulbrich zeigte, dass auch die Position E492 selektiv methyliert wird. In der Tar Mutante TarQ295E/Q309E gelang ebenfalls der Nachweis einer selektiven Modifikation mit einer Methylgruppe (Ulbrich, 2014).

Die Modifikation des Rezeptors mit einer Methylgruppe wurde gewählt, um den Einfluss von benachbarten Rezeptoren und von Ligand innerhalb der Cluster zu beobachten. Es wurden Vollängenrezeptor und verkürzter Rezeptor untersucht. Die Methylierung solubilisierter Rezeptoren war nicht möglich. Die Methylierung des Aspartatrezeptors in Liposomen konnte sowohl über Szintillationsmessungen als auch über Fluorographie gezeigt werden. Die Abtrennung der Reaktionslösung, welche das CheR Lysat und SAM enthielt, wurde durch Zentrifugation erreicht. Nach zwei weiteren Waschschritten lagen die Proteoliposomen aufgereinigt vor.

Die Methylierung des Vollängenrezeptors verlief unproblematisch, wohingegen der verkürzte Rezeptor nur eine sehr niedrige Methylierungseffizienz zeigte (etwa 95 % weniger als Tar). Erst nachdem Tar und Tar $\Delta$  zusammen in Liposomen rekonstituiert wurden, konnte die Methylierungseffizienz deutlich gesteigert werden (auf etwa 50 % bezüglich Tar). Beide Rezeptoren tragen das NWETF Erkennungsmotiv für die Methyltransferase CheR. Der Unterschied der Rezeptoren liegt in der verkürzten Ligandenbindedomäne bei Tar $\Delta$ . Die LBD wurde durch einen verkürzten Loop ersetzt. Dies könnte die Struktur der Trimere von Dimeren beeinflussen (vgl. 5.1). Durch die fehlende LBD können sich die Rezeptoren näher aneinander lagern und so die Gesamtstruktur der Cluster verändern. Es könnte eine dichtere Packung der Rezeptoren erfolgen, da die Ligandenbindedomäne keine sterische Hinderung darstellt. Durch die kompaktere Packung von Tar $\Delta$  in Liposomen könnte der Zugang von CheR zum flexiblen Arm des Rezeptors eingeschränkt sein. Somit erfolgt die Methylierung nicht effizient genug. Wenn Tar und Tar $\Delta$  zusammen rekonstituiert werden, bildet sich ein gemischtes artifizielles Cluster aus Tar Trimeren von Dimeren und Tar $\Delta$  Trimeren von Dimeren. Durch die LBD von Tar nimmt der Rezeptor wie beschrieben eine kegelförmige Struktur innerhalb der Trimere ein. Dies ermöglicht eine Auflockerung der Clusterstruktur der Proteine, wodurch die Bindung von CheR sehr viel besser erfolgen kann. In den Experimenten ist dies in einer Steigerung der Methylierungseffizienz an Tar $\Delta$  in Proteoliposomen mit Tar zu beobachten. Tar kann also indirekt Einfluss auf das benachbarte Tar $\Delta$  nehmen.

Der gegenseitige Einfluss der fünf Rezeptoren in *E. coli* ist noch nicht völlig geklärt. Die zwei Hauptrezeptoren Tar und Tsr beeinflussen sich nicht gegenseitig. Zum einen wurden noch

keine Heterodimere der beiden Rezeptoren nachgewiesen und zum anderen beeinflusst die Methylierung des einen Rezeptor den Modifikationszustand des anderen nicht. Dies spricht dafür dass beide Rezeptoren autark voneinander funktionieren (Grebe und Stock, 1998). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Tsr Mutanten mit Tar interagieren und die Funktionen von mutiertem Tsr teils wiederhergestellt werden können (Ames et al., 2002).

Bei den Rezeptoren Trp, Aer und Tap, welche nur zu einem Zehntel so häufig in der Zelle vertreten sind wie Tar oder Tsr, ist eine Kommunikation mit den Hauptrezeptoren wahrscheinlich, da das Ausgangssignal der drei Rezeptoren gleichwertig zu den zwei Hauptrezeptoren ist. Zudem tragen alle drei gering vertretenden Rezeptoren keine Erkennungssequenz für die Methyltransferase CheR, werden aber dennoch methyliert (außer Aer (Gosnik et al., 2006)). Die Methylierung erfolgt dabei *in trans* durch CheR, welches an die benachbarten Hauptrezeptoren gebunden ist (Grebe und Stock, 1998).

Für den Aspartatrezeptor aus *Salmonella typhimurium* wurde der Hill Koeffizient für alle Modifikationszustände von Tar mit 1,7 -2,4 bestimmt. Dies spricht für eine Kooperativität zwischen einer kleinen Zahl eng benachbarter Rezeptoren und nicht für eine Ausweitung auf die gesamte Größe des Arrays (Bornhorst und Falke, 2000). Die Kooperativität für den methylierten Serinrezeptor war jedoch viel höher, als für den unmodifizierten (Li und Weis, 2000). Über die Messung der *in vivo* Aktivität wurde die Anzahl von gekoppelten Rezeptoren in einer Einheit, die miteinander kooperieren, auf 20-40 bestimmt (Sourjik und Berg, 2004). Diese Kooperativität nimmt jedoch ab, wenn die Rezeptoren demethyliert werden (Li und Weis, 2000, Sourjik und Berg, 2002).

Die Kooperativität konnte, wie in der Literatur beschrieben, mit den hier durchgeführten Methylierunsexperimenten gezeigt werden. Die vorhergegangenen Messungen wurden jedoch in Membranen durchgeführt, in denen eine Vielzahl an Rezeptoren vorhanden waren. Die Anzahl an Rezeptoren in Proteoliposomen ist um ein vielfaches geringer.

Der Einfluss des Liganden auf die Methylierungseffizienz wurde ebenfalls untersucht. Der Zusatz von Ligand zur Reaktionslösung, welche Proteoliposomen, ein CheR Lysat und SAM enthielt, hatte eine Erhöhung der Methylierungseffizienz zur Folge. Für den Volllängenrezeptor stieg die Methylierungseffizienz um 30 %, für Tar $\Delta$  hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Die fehlende LBD von Tar $\Delta$  lässt dieses Ergebnis erwarten, da keine Detektion des Liganden stattfinden kann. Untersucht man die Methylierungseffizienz von Tar $\Delta$  in Tar/Tar $\Delta$  Proteoliposomen, lässt sich eine Steigerung der Methylierungseffizienz von Tar $\Delta$  um 30 % erkennen. Dieser Anstieg kann nur von dem Volllängenrezeptor auf Tar ohne LBD übertragen werden. Es besteht also ein *crosstalk* zwischen den beiden Rezeptoren. Die Bindung von Ligand erhöht nicht nur den Methylierungsgrad am selben Rezeptor, sondern das Signal der Ligandenbindung kann an benachbarte Rezeptoren ohne LBD weitergeleitet werden.



Bei den Methylierungsexperimenten muss allerdings festgehalten werden, dass die Szintillationsmessungen in Einfachbestimmungen durchgeführt wurden. Für eine Bestätigung der Aussage sollten Mehrfachbestimmungen angesetzt werden. Zudem sollte bedacht werden, dass die Gesamteffizienz der Methylierung nicht ersichtlich ist.

Im Grundzustand ist das Level der Methylierung proportional zur Konzentration an Lockstoff in der Umgebung. Nur so ist eine Sensitivität bezüglich der Ligandenkonzentration gegeben (Springer et al., 1979). Zum Einfluss von Ligandenbindung auf den Methylierungszustand finden sich verschiedene Studien. Zum Einen wurden Hinweise auf einen deutlichen Einfluss von Modifikationen auf die Ligandenbindung gezeigt (Yonekawa und Hayashi, 1986), zum Anderen wurde gezeigt, dass die Rezeptormethylierung nur eine geringe Auswirkung auf die Ligandenbindung hat, woraus wiederum gefolgert werden kann, dass die Methylierung nur die Kinaseaktivität von CheA reguliert, nicht aber die Ligandenbindungskonstante beeinflusst (Dunten und Koshland, 1991, Borkovich et al., 1992). Li und Weis fanden eine Auswirkung der Ligandenbindung auf die Methylierung nur im ternären Komplex des Serinrezeptors mit CheA und CheW (Li und Weis, 2000).

Hier konnte gezeigt werden, dass das Signal der Ligandenbindung auf benachbarte Rezeptoren übertragen werden kann, ohne dass die Chemotaxisproteine CheA und CheW an den Rezeptor gebunden vorliegen.

### **5.2.2 Signalweiterleitung im transmembranen/HAMP Domänengrenzbereich**

Der Einfluss positiver und negativer Stimuli kann anhand des HsHtrII/NpSRII Modells untersucht werden. Die Ligandenbindung an die LBD des Transducer ist ein positiver Reiz, wohin gegen Licht der Wellenlänge 495 nm, welches von dem sensorischen Rhodopsin II detektiert wird, ein negativer Reiz ist. Die Veränderung der Konformation des Proteins HsHtrII wurde an den Positionen I298 und V302 beobachtet. Diese Aminosäuren liegen am Ende der transmembranen Helix 2 und dem Beginn der HAMP Domäne und sind analog zu den Positionen V78 und L82 in NpHtrII. Für NpHtrII konnte Distanzveränderungen über ESR gemessen und eine Rotation der transmembranen Helix 2 nach Lichtaktivierung des Rhodopsins gezeigt werden (Wegener et al., 2001). Durch die Homologie der Transducer liegt die Vermutung nahe, dass die Signalübertragung in HsHtrII ähnlich verläuft.

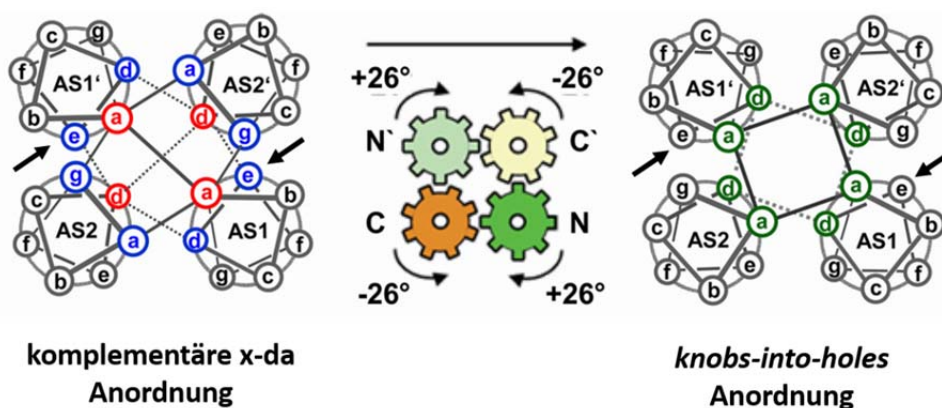
Die hier gemessenen ESR Daten zeigen, dass Ligandenbindung bei NpSRII/HsHtrII398 I298-SL zu größeren Kompaktheit und Lichtaktivierung zu höheren Mobilität der Seitenkette führt. Dies deutet darauf hin, dass sich die Umgebung des Spinlabels während der Signaltransduktion ändert. Bei positivem Stimulus ist die Bewegungsfreiheit der Spinsonde stark eingeschränkt. Das könnte bedeuten, dass sich der Rest I298 in der TM2 näher zu benachbarten Seitenketten bewegt, wohin gegen ein negativer Stimulus dazu führt, dass die

Spinsonde an Position 298 beweglicher wird, so dass der Aminosäurerest weniger durch benachbarte Reste beeinflusst wird. Was genau an dieser Position passiert, könnte durch Distanzmessungen weiter untersucht werden.

### 5.2.3 Signalweiterleitung in der HAMP Domäne

Die Untersuchung des Signaltransfers in der HAMP Domäne von Tar erfolgte mittels ESR Spektroskopie an den Positionen R214, T218, I224 und T264. Die Seitenkette der Position R214 ist in den cytoplasmatischen Raum gerichtet, weist jedoch ein typisches Spektrum für eine immobile Seitenkette auf. Dies könnte bedeuten, dass die Seitenkette zur Proteingrenzfläche eines benachbarten Dimers innerhalb des Trimers von Dimeren zeigt. Threonin 218 ragt ebenfalls in das Cytoplasma, weist aber auch eine immobile Seitenkette in ESR Messungen auf. Eine mögliche Erklärung hierfür ist ebenfalls die sterische Hinderung durch Seitenketten eines benachbarten Dimers. Das ESR Spektrum für die Position I224 ist typisch für eine immobile Seitenkette. Der Aminosäurerest liegt im Inneren der HAMP Domäne. Die Seitenkette Threonin 264 liegt zwischen HAMP Domäne und cytoplasmatischem Bereich und zeigt eine hohe Beweglichkeit. Ligandenzugabe hat nur Einfluss auf Position Isoleucin 224. Die anderen Seitenketten zeigten keine Veränderung in der Beweglichkeit. Nach Ligandenbindung wird die Seitenkette I224 mobiler.

Das Getriebemodell (*gear box*) verändert die Anordnung der Aminosäuren von der komplementären x-da Position durch eine Rotation aller 4 Helizes um  $26^\circ$  der HAMP Domäne zur *knobs-into-holes* Position (Hulko et al., 2006), (Abbildung 61).



**Abbildung 61:** Schematische Ansicht des Getriebemodells der HAMP Domäne. Das Schraubrad (mittig) zeigt die Umwandlung von der komplementären x-da Packung (links) zur knobs-into-holes Anordnung (rechts) (Mondéjar et al., 2012). Die schwarzen Pfeile markieren die Position I224.

Isoleucin 224 aus Tar (I226 in Tsr oder S288 in Af1503) ist dabei eine transiente Aminosäure, was bedeutet, dass diese vom Zentrum während der komplementären Anordnung zur *knobs-into-holes* Packung heraus dreht. Dadurch trägt diese Aminosäure eine wichtige Rolle bei der Signalumwandlung innerhalb der HAMP Domäne und ist eine geeignete Position um Veränderungen während einer Signaltransduktion zu beobachten (Mondéjar et al., 2012).

Die Beobachtungen aus den ESR Messungen lassen sich gut mit dem Getriebemodell der HAMP Domäne in Einklang bringen. Dies schließt andere Modelle der Signalübertragung nicht aus. Ein Gleichgewicht zwischen einer dynamischen und kompakten HAMP Domäne steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen. Die höhere Mobilität nach Ligandenzugabe kann ebenfalls durch die Gleichgewichtsverschiebung zu einer dynamischeren Struktur der HAMP Domäne erklärt werden.

### 5.3 Intramolekulare Signalweiterleitung in Tar, HsHtrII und NpSRII

Um die intramolekulare Signalweiterleitung in Chemo- und Photorezeptoren näher zu untersuchen, wurde die Anwendbarkeit der optischen mikroskaligen Thermophorese, FTIR Spektroskopie und Festkörper NMR Spektroskopie geprüft.

#### 5.3.1 Ligandenbindung in Tar und HsHtrII

Die Bindungsaffinität der Liganden Serin und Aspartat zu HsHtrII und Tar wurden mittels Thermophorese bestimmt. Die Experimente wurden bei unterschiedlichen Laserintensitäten (40%, 60% und 80 %) durchgeführt. Hierbei wurde für die Bindung von Aspartat zu Tar eine Abhängigkeit der Dissoziationskonstante von der Laserintensität erkennbar. Der Laser wurde zur Erzeugung eines Temperaturgradienten verwendet und es zeigte sich, dass eine erhöhte Laserintensität zu einer größeren Dissoziationskonstante führte. Für HsHtrII und das verkürzte HsHtrII398 konnte diese Abhängigkeit für die Bindungsaffinität zu Serin im geringeren Maß beobachtet werden. Es könnte sein, dass die vermessenen Proteine bei einer höheren Laserintensität, was höhere Temperatur bedeutet, eine strukturelle Veränderung erfahren. Wenn sich die Struktur der Ligandenbindedomäne geringfügig verändern würde, könnte sich dies auch in der Dissoziationskonstante  $k_D$  widerspiegeln. Der Hersteller gab für diese Beobachtungen die Empfehlung die Werte zu berücksichtigen, welche bei den niedrigsten Laserintensitäten berechnet wurden.

Für den Aspartatrezeptor und Aspartat wurden folgende  $k_D$  Werte durch thermophoretische Messungen ermittelt: 319 nM (40% Laserintensität), 1,46  $\mu$ M (60% Laserintensität) und 11,45  $\mu$ M (80% Laserintensität). Die Bestimmung der Dissoziationskonstante  $k_D$  aus

isothermaler Titrationskalorimetrie erfolgte zu 1-5  $\mu\text{M}$  (Clarke und Koshland, 1979, Foster et al., 1985). Kim bestimmte die Dissoziationskonstante von Aspartat für den löslichen Aspartatrezeptor zu 5  $\mu\text{M}$  (Kim, 2010). Die  $k_D$ -Werte, welche sich aus den thermophoretischen Messungen ergeben, zeigen eine Abweichung von mehr als einer Zehnerpotenz. Der Vergleich mit den Werten aus der Literatur ergibt, dass die gemessenen Dissoziationskonstanten im gleichen Bereich liegen.

Für den Transducer HsHtrII und ein verkürztes Konstrukt HsHtrII398 wurde die Bindungsaffinität zu Serin mittels Thermophorese bestimmt. Die Messungen erfolgten ebenfalls bei unterschiedlichen Laserintensitäten und es wurden folgende Dissoziationskonstanten für HsHtrII ermittelt: 773 nM (40 % Laserintensität) und 430 nM (80 % Laserintensität). Die Werte  $k_D$ -Werte liegen im hohen nanomolaren Bereich, weichen jedoch etwas voneinander ab. Beim Vergleich der Dissoziationskonstanten mit  $k_D$ -Werten aus ITC Messungen fällt auf, dass die  $k_D$ -Werte aus thermophoretischen Messungen um eine Zehnerpotenz geringer sind. Kim bestimmte die Dissoziationskonstante von HsHtrII zu Serin zu 5  $\mu\text{M}$  (Kim, 2010). Für den verkürzten Rezeptor HsHtrII398 wurden die  $k_D$ -Werte zu 183 nM (40% Laserintensität) und zu 385 nM (80% Laserintensität) berechnet. Hier ist die Abweichung der beiden Dissoziationskonstanten nicht so stark.

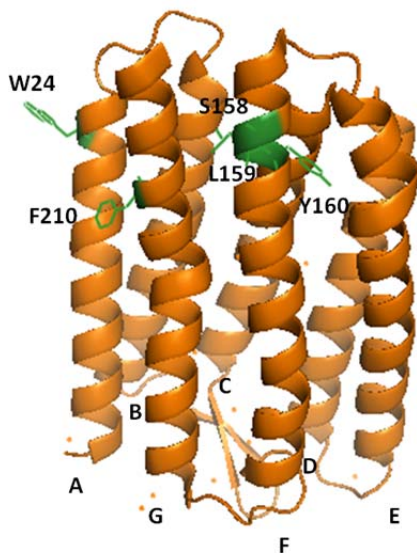
Der Vorteil bei Verwendung der Methode der Thermophorese sind die geringen Probenvolumina und die schnelle Versuchsdurchführung. Für die Messungen werden Verdünnungsreihen pipettiert und der zweite Bindungspartner wird in konstanter Menge hinzu pipettiert. Die Probe wird auf eine Kapillare gezogen und sofort vermessen. Die Verwendung von Detergenzien stellt hierbei kein Problem dar. Der Nachteil liegt in der Ungenauigkeit der Methode. Da mit kleinen Volumen gearbeitet wird, können Pipettierfehler das Messergebnis erheblich beeinflussen. Eine Automatisierung wäre hier ein Möglichkeit die Messgenauigkeit zu verbessern. Die Messungen wurden zudem mit einem Prototyp der Firma Nanotemper durchgeführt, bei dem die Temperatur im Probenraum noch nicht kontrolliert werden konnte. Bei den Nachfolgemodellen ist dies jedoch der Fall. Trotz einiger Nachteile kann die Thermophorese gut verwendet werden, um viele Proben auf mögliche Bindungspartner zu untersuchen.

### 5.3.2 Lichtaktivierung in NpSRII

Das sensorische Rhodopsin II aus *N. pharaonis* wird durch Licht der Wellenlänge 495 nm angeregt und durchläuft einen Photozyklus, welcher durch verschiedene Intermediate gekennzeichnet ist. Das M-Intermediat ist durch die Konformationsänderung des Proteins charakterisiert, bei dem eine Signalübertragung auf den assoziierten Transducer stattfindet. ESR Daten weisen auf eine Auswärtsbewegung der Helix F des NpSRII hin (Wegener et al.,

2001), Analysen der Kristallstruktur deuten auf eine Verschiebung der Helix G hin (Moukhametzianov et al., 2006).

Das Einbringen von Nitrilen als FTIR Markierungen bietet eine Möglichkeit weitere Erkenntnisse über Konformationsänderungen im Protein zu gewinnen. Es wurden die Positionen 24 (Helix A), 158 (Helix F), 159 (Helix F), 160 (Helix F) und 210 (Helix G) (vgl. Abbildung 62) markiert und Licht-Dunkel Differenzspektren aufgenommen. Für die Positionen in Helix F konnte eine Verschiebung der Absorption zu höheren Wellenzahlen beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die Absorption der Sonde durch eine Veränderung im elektrischen Feld des Proteins beeinflusst wurde. Dies weist auf eine Konformationsänderung bei Lichtaktivierung im Protein hin. Für die Position 24 und 210 konnte dies nicht beobachtet werden.



**Abbildung 62:** Struktur von NpSR II (PDB1GU8). Die Positionen W24 (Helix A), S158 (Helix F), L159 (Helix F), Y160 (Helix F) und F210 (Helix G) sind grün dargestellt.

Die Daten weisen darauf hin, dass bei Lichtaktivierung eine Veränderung im Bereich von Helix F eintritt. Als weiterführende Experimente sollen zeitaufgelöste Spektren aufgenommen werden.

Reisdorf führte ebenfalls FTIR Messungen an NpSR II durch und verwendete dabei 4-Mercaptobenzonitril (4-MBN) als Sonde (Reisdorf, 2009) und rekonstituierte das Protein in PM Lipide. Die Positionen I211C und L213C (4-MBN markiert) zeigten starke Differenzen zwischen dem lichtaktivierten Zustand und dem Dunkelzustand. Die hier durchgeführten Messungen an Position F210 zeigten keine Veränderungen, was an der Größe des Labels liegen könnte.

NpSR II L159C-4MBN zeigt ähnliche Intensitäten wie NpSR II L159C-CN, allerdings verschiebt sich in der Region das Potential der CN Schwingung zu niedrigeren Energien, bei

NpSRII L159C-CN jedoch zu höheren. Dies könnte durch den zusätzlich in der Sonde vorliegenden Benzolring erklärt werden, da sich dadurch die Position der Sonde verändert. Mit Hilfe von ESR Daten, welche die Zugänglichkeit der Markierungen mit frei diffundierenden Quenchern beschreiben, konnten nähere Informationen über die Lage der Markierungen gewonnen werden (Wegener et al., 2000). Es wurde vermutet, dass die Spinmarkierung an Position 158 Zugang zur Wasserphase hat, wohingegen die Sonden an den Positionen 159 und 160 ins Proteininnere zeigen. Die Markierung an Position 210 weist typische Zugänglichkeiten für die Lage an einer Protein/Lipidschicht Grenzfläche auf. Es wurde vermutet, dass sich die Position an einer Dimergrenzfläche befinden kann (Wegener et al., 2000, Reisdorf, 2009). Da sich die Größe der Nitril Markierung von der Größe der Spinmarkierung (MTS) jedoch unterscheidet, sind dies nur mögliche Hinweise auf die Lage der FTIR Sonde.

Festkörper NMR kann ebenfalls zur Aufklärung von Struktur und Dynamik von NpSRII beitragen. NpSRII konnte mittels ssNMR in der nativen Lipidmembran untersucht werden (Etzkorn et al., 2007). Hier wurden Messungen von NpSRII in ganzen Zellen und an isoliertem, deuteriertem NpSRII durchgeführt. Dies stellt zwei weitere Methoden dar, um ein tieferes Verständnis für die Konformationsänderungen bei Lichtaktivierung zu erhalten. Als zugängliche Aminosäure wurde unter anderem die Position T189 identifiziert. Diese Position ist essentiell für die Assoziierung mit dem Transducer NpHtrII. Threonin 189 bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu Serin 62 und zu Glutamat 43 im NpHtrII (Klare et al., 2007).

## 6 Zusammenfassung

Die gerichtete Bewegung auf einen Lockstoff zu oder von einem Schreckstoff fort ermöglicht es einem Organismus optimale Lebensbedingungen zu finden. Dies gilt ebenfalls für die Fähigkeit zur Phototaxis einiger Organismen, so dass schädliche Umwelteinflüsse gemieden und Orte mit günstigen Bedingungen aufgesucht werden können. Die Zelle bewegt sich mit Hilfe von Flagellen, die über eine Zwei-Komponenten Signalkaskade gesteuert werden. Der Eingang eines Signals wird von membranständigen Chemo- oder Photorezeptoren detektiert und über die Membran ins Zellinnere weitergeleitet.

Der Aspartatrezeptor aus *E. coli* und der Transducer HtrII im Komplex mit SRII aus *H. salinarum* und *N. pharaonis* wurden in dieser Arbeit näher untersucht. Vor allem die Signalübertragung über die HAMP Domäne von Tar und HtrII war von großem Interesse.

Die Bestimmung des oligomeren Zustandes in detergenzhaltiger Lösung war hierbei die Grundlage. Durch Größenausschlusschromatographie, Fluoreszenzanisotropie, Kleinwinkelröntgenstreuung und *blue native* PAGE wurde die Formation von Trimeren von Dimeren bei höheren Konzentrationen ( $> 40 \mu\text{M}$ ) beobachtet. Bei Konzentrationen  $< 1 \mu\text{M}$  konnte eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Dimeren für den Aspartatrezeptor gezeigt werden.

Der Aspartatrezeptor wurde als Modellrezeptor verwendet, um die transversale Signalübertragung in Chemorezeptorclustern nachzustellen. Es wurde ein verkürzter Rezeptor ohne Ligandenbindedomäne zusammen mit einem Vollängenrezeptor in Liposomen rekonstituiert. Elektronenspinresonanz Messungen an Proteoliposomen mit spinmarkiertem verkürzten Rezeptoren zusammen mit unmarkierten Vollängenrezeptoren zeigten nach Ligandenzugabe größere Mobilität der Seitenkette I224 in der HAMP Domäne. Der Crosstalk der Rezeptoren konnte durch Experimente zur Methylgruppenübertragung von Vollängenrezeptor auf verkürzten Rezeptor bestätigt werden.

Für die Untersuchung struktureller Veränderungen nach Lichtaktivierung oder nach Ligandenzugabe wurden für SRII/HtrII ebenfalls Elektronenspinresonanz Experimente durchgeführt. ESR Spektren bei Raumtemperatur weisen darauf hin, dass ein negativer Stimulus zu erhöhter Beweglichkeit der Seitenkette und ein positiver Stimulus zu erhöhter Kompaktheit führt.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Tar mit Aspartat und HsHtrII mit Serin mittels Thermophorese ergaben Werte von  $1,47 \mu\text{M}$  (Tar) und  $773 \text{ nM}$  (HsHtrII), welche mit ITC gemessenen  $K_D$ -Werten in guter Übereinstimmung liegen.

Um strukturelle Änderungen nach Lichtaktivierung in NpSRII zu beobachten, wurde eine Thiocyanidgruppe als IR-Sonde eingeführt und FTIR Experimente durchgeführt. Verschiebungen der Absorption der  $\text{C}\equiv\text{N}$  Streckschwingung zu höheren Wellenzahlen

sprechen für eine Veränderung der Struktur im Protein bei Lichtaktivierung an den Positionen 158, 159 und 160 in Helix F.

Die Untersuchung von lichtaktivierten NpSRII in ganzen Zellen konnte mittels Festkörper-NMR durchgeführt werden und bildet eine Basis für weitere Experimente. Die Vermessung von deuteriertem NpSRII lieferte ein reduziertes Spektrum, was vor allem die Regionen zeigt, in denen ein Austausch mit Wasser erfolgt, die also exponiert vorliegen.



## 7 Literaturverzeichnis

- Airola, M.V., Watts, K.J., Bilwes, A.M. und Crane, B.R. (2010) Structure of Concatenated HAMP Domains Provides a Mechanism for Signal Transduction. *Structure*, 18, 436-448.
- Alam, M. und Oesterhelt, D. (1984) Morphology, function and isolation of halobacterial flagella. *J Mol Biol.*, 176, 459-75.
- Ames, P., Studdert, C.A., Reiser, R.H. und Parkinson, J.S. (2002) Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99, 7060-7065.
- Amin, D.N. und Hazelbauer, G.L. (2010) The chemoreceptor dimer is the unit of conformational coupling and transmembrane signalling. *J Bacteriol.*, 192, 1193-1200.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, New York.
- Barnakov, A.N., Barnakova, L.A. und Hazelbauer, G.L. (1999) Efficient adaptional demethylation of chemoreceptors requires the same enzyme-docking site as efficient methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96, 10667-10672.
- Beja, O., Aravind, L., Koonin, E.V., Suzuki, M.T., Hadd, A., Nguyen, L.T., Jovanovich, S.B., Gates, C.M., Feldman, R.A., Spudich, J.L., Spudich, E.M. und DeLong, E.F. (2000) Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. *Science*, 289, 1902-1906.
- Bhatnagar, J., Borbat, P.P., Pollard, A.M., Bilwes, A.M., Freed, J.H. und Crane, B.R. (2010) Structure of the Ternary Complex Formed by a Chemotaxis Receptor Signaling Domain, the CheA Histidine Kinase, and the Coupling Protein CheW As Determined by Pulsed Dipolar ESR Spectroscopy. *Biochemistry*, 49, 3824-3841.
- Biemann, H.-P. und Koshland, D.E. (1994) Aspartate receptors of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* bind ligand with negative and half-of-the-sites cooperativity. *Biochemistry*, 33, 629-634.
- Bogomolni, R.A. und Spudich, J.L. (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 79, 6250- 6254.
- Boldog, T., Grimme, S., Li, M., Sligar, S. und Hazelbauer, G.L. (2006) Nanodiscs separate chemoreceptor oligomeric states and reveal their signaling properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103, 11509-11514.
- 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. *J Biol Chem.*, 280, 38767-38775.
- Borkovich, K.A., Alex, L.A. und Simon, M.I. (1992) Attenuation of sensory receptor signaling by covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 89, 6756-6760.
- Bornhorst, J.A. und Falke, J.J. (2000) Attractant regulation of the aspartate receptor-kinase complex: Limited cooperative interactions between receptors and effects of the receptor modification state. *Biochemistry*, 39, 9486-9493.

- Bothe, A. (2011) Charakterisierung der Wechselwirkungen der archaealen Phototaxisproteine SR11 und Htr11 durch thermophoretische Untersuchungen. *Bachelorarbeit*.
- Bothe, A. (2014) Structural and biophysical investigations on the phototaxis complex SR11/Htr11 in *Natronomonas pharaonis*. *Masterarbeit*.
- Bray, D., Levin, M.D. und Morton-Firth, C.J. (1998) Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. *Nature*, 393, 85-88.
- Briegel, A., Ortega, D.R., Tocheva, E.I., Wuichet, K., Li, Z., Chen, S., Müller, A., Iancu, C.V., Murphy, G.E., Dobro, M.J., Zhulin, I.B. und Jensen, G.J. (2009) Universal architecture of bacterial chemoreceptor arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106, 17181-17186.
- Briegel, A., Li, X., Bilwes, A.M., Hughes, K.T., Jensen, G.J. und Crane, B.R. (2012) Bacterial chemoreceptor arrays are hexagonally packed trimers of receptor dimers networked by rings of kinase and coupling proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 109, 3766-3771.
- Chelsky, D., Gutterson, N.I. und Koshland, D.E. (1984) A diffusion assay for detection and quantitation of methyl-esterified proteins on polyacrylamide gels. *Anal Biochem.*, 141, 143-148.
- Chizhov, I., Schmies, G., Seidel, R.P., Sydor, J.R., Lüttenberg, B. und Engelhard, M. (1998) The Photophobic Receptor from *Natronobacterium pharaonis*: Temperature and pH Dependencies of the Photocycle of Sensory Rhodopsin II. *Biophys J.*, 75, 999-1009.
- Clarke, S. und Koshland, D.E. Jr. (1979) Membrane receptors for aspartate and serine in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem.*, 254, 9695-9702.
- Djordjevic, S. und Stock, A.M. (1998) Chemotaxis receptor recognition by protein methyltransferase CheR. *Nat Struct Biol.*, 5, 446-450.
- Doebber, M., Bordignon, E., Klare, J.P., Holterhues, J., Martell, S., Mennes, N., Li, L., Engelhard, M. und Steinhoff, H.J. (2008) Salt-driven Equilibrium between Two Conformations in the HAMP Domain from *Natronomonas pharaonis*: THE LANGUAGE OF SIGNAL TRANSFER?. *J Biol Chem.*, 283, 28691-28701.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res.*, 16, 6127-6145.
- Dunten, P. und Koshland, D.E. Jr. (1991) Tuning the responsiveness of a sensory receptor via covalent modification. *J Biol Chem.*, 266, 1491-1496.
- Ehresmann, B., Imbault, P. und Weil, J.H. (1973) Spectrophotometric Determination of Protein Concentration in Cell Extracts Containing tRNA's and rRNA's. *Anal Biochem.*, 54, 454-463.
- Erbse, A.H. und Falke, J.J. (2009) The Core Signaling Proteins of Bacterial Chemotaxis Assemble To Form an Ultrastable Complex. *Biochemistry*, 48, 6975-6987.
- Etzkorn, M., Martell, S., Andronesi, O.C., 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 Int Ed Engl.*, 46, 459-462.

- Etzkorn, M., Seidel, K., Li, L., Martell, S., Geyer, M., Engelhard, M. und Baldus, M. (2010) Complex Formation and Light Activation in Membrane-Embedded Sensory Rhodopsin II as Seen by Solid-State NMR Spectroscopy. *Structure*, 18, 293-300.
- Fafarman, A.T., Webb, L.J., Chuang, J.I. und Boxer, S.G. (2006) Site-Specific Conversion of Cysteine Thiols into Thiocyanate Creates an IR Probe for Electric Fields in Proteins. *J Am Chem Soc.*, 128, 13356-13357.
- Falke, J.J. und Hazelbauer, G.L. (2001) Transmembrane signaling in bacterial Chemoreceptors. *Trends Biochem Sci.*, 26, 257-265.
- Foster, D.L., Mowbray, S.L., Jap, B.K. und Koshland, D.E. Jr. (1985) Purification and characterization of the aspartate chemoreceptor. *J Biol Chem.*, 260, 11706-11710.
- Gautier, A., Mott, H.R., Bostock, M.J., Kirkpatrick, J.P. und Niellispach, D. (2010) Structure determination of the seven-helix transmembrane receptor sensory rhodopsin II by solution NMR spectroscopy. *Nat Struct Mol Biol.*, 17, 768-774.
- Geertsma, E.R., Nik Mahmood, N.A.B., Schuurman-Wolters, G.K. und Poolman, B. (2008) Membrane reconstitution of ABC transporters and assays of translocator function. *Nat Protoc.*, 2, 256-266.
- Gegner, J.A., Graham, D.R., Roth, A.F. und Dahlquist, F.W. (1992) Assembly of an MCP receptor, CheW, and Kinase CheA complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Cell*, 70, 975-982.
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. und Ruysschaert, J.M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. *Subcell Biochem.*, 23, 329-362.
- Gordeliy, V.I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R., Büldt, G., Savopol, T., Scheidig, A.J., Klare, J.P. und Engelhard, M. (2002) Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex. *Nature*, 419, 484-487.
- Gosink, K.K., del Carmen Buron-Barral, M. und Parkinson, J.S. (2006) Signaling Interactions between the Aerotaxis Transducer Aer and Heterologous Chemoreceptors in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 188, 3487-3493.
- Gradmann, S. (2013) A combination of novel solid-state NMR methods and related software to study molecular assemblies and biomolecules. *Dissertation*.
- Grebe, T.W. und Stock, J. (1998) Bacterial chemotaxis: The five sensors of a bacterium. *Curr Biol.*, 8, R154-R157.
- Greifenberg, A.K. (2011) Untersuchungen zum Signalkomplex aus Sensorrhodopsin und Transducer. *Masterarbeit*.
- Gushchin, I.Y., Gordeliy, V.I. und Grudinin, S. (2011) Role of the HAMP domain region of sensory rhodopsin transducers in signal transduction. *Biochemistry*, 50, 574-580.

- Gushchin, I., Gordeliy, V. und Grudinin, S. (2013) Two Distinct States of the HAMP Domain from Sensory Rhodopsin Transducer Observed in Unbiased Molecular Dynamics Simulations. *PLoS One.*, 8, 1-8.
- Hazelbauer, G.L. und Lai, W.C. (2010) Bacterial chemoreceptors: providing enhanced features to two-component signalling. *Curr Opin Microbiol.*, 13, 1-9.
- Hazelbauer, G.L. (2012) Microbiology: Adaptation by target remodelling. *Nature*, 484,173–175.
- Hegemann, P., Fuhrmann, M. und Kateriya, S. (2001) Algal sensory photoreceptors. *J Phycol.*, 37, 668-676.
- Hildebrand, E. (1977) What does Halobacterium tell us about photoreception. *Biophys Struct Mech.*, 3, 69-77.
- 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.
- Homma, M., Shiomi, D. und Kawagishi, I. (2004) Attractant binding alters arrangement of chemoreceptor dimers within its cluster at a cell pole. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101, 3462-3467.
- 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.
- Hubbel, W.L. und Altenbach, C. (1994) Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labelling. *Curr Opin Struc Biol.*, 4, 566-573.
- Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J.U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J.E., Lupas, A.N. und Coles, M. (2006) The HAMP Domain Structure Implies Helix Rotation in Transmembrane Signaling. *Cell*, 126, 929-940.
- Jeworrek, C. (2011) The Response of Biophysical Model Systems to High Pressure Conditions: A Study of Lipids and Proteins Using Diffraction Methods. *Dissertation*.
- Kates, M., Kushwaha, S.C. und Sprott, G.D. (1982) Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria. *Methods in Enzymology*, 88, 99-111.
- Kentner, D. und Sourjik, V. (2008) Kooperative Verarbeitung chemotaktischer Signale bei *E. coli*. *Biospektrum*, 14, 240 -242.
- Khursigara, C.M., Lan, G., Neumann, S., Wu, X., Ravindran, S., Borgnia, M.J., Sourjik, V., Milne, J., Tu, Y. und Subramaniam, S. (2011) Lateral density of receptor arrays in the membrane plane influences sensitivity of the *E. coli* chemotaxis response. *EMBO J.*, 30, 1719-1729.
- 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 signaling and high sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99, 11611-11615.

- Kim, Y.-J. (2010) Characterisation of the Sensory RhodopsinII/TransducerII complexes from *Halobacterium salinarum*. *Dissertation*.
- Klare, J.P., Gordeliy, V.I., Labahn, J., Büldt, G., Steinhoff, H.J. und Engelhard, M. (2004) The archael sensory rhodopsin II/transducer complex: a model for transmembrane signal transfer. *FEBS Lett.*, 564, 219-224.
- Klare, J.P., Chizhov, I. und Engelhard, M. (2007) Microbial Rhodopsins: Scaffolds for Ion Pumps, Channels, and Sensors. *Results Probl Cell Differ.*, 45, 73-122.
- Klare, J.P., Bordignon, E., Engelhard, M. und Steinhoff, H.J. (2011) Transmembrane signal transduction in archael phototaxis: The sensory rhodopsin II-transducer complex studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Eur J Cell Biol.*, 90, 731-739.
- Krell, T., Lacal, J., Muñoz-Martínez, F., Reyes-Darias, J.A., Cadirci, B.H., García-Fontana, C. und Ramos, J.L. (2010) Diversity at its best: bacterial taxis. *Environ Microbiol.*, 13, 1115-1124.
- Kunji, E.R.S., Harding, M., Butler, P.J.G. und Akamine, P. (2008) Determination of the molecular mass and dimensions of membrane proteins by size exclusion chromatography. *Methods*, 46, 62-72.
- Lakowicz, J.R. (2006) Advanced anisotropy concepts, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 413-441.
- 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.
- Li, C., Boileau, A.J., Kung, C. und Adler, J. (1988) Osmotaxis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 85, 9451-9455.
- Li, G. und Weis, R.M. (2000) Covalent modification regulates ligand binding to receptor complexes in the chemosensory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 100, 357-365.
- Li, M.S. und Hazelbauer, G.L. (2004) Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex. *J Bacteriol.*, 186, 3687-3694.
- Li, M. und Hazelbauer, G.L. (2011) Core unit of chemotaxis signaling complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108, 9390-9395.
- 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.
- Milligan, D.L. und Koshland, D.E. Jr. (1988) Site-directed cross-linking. Establishing the dimeric structure of the aspartate receptor of bacterial chemotaxis. *J Biol Chem.*, 263, 6268-6275.
- Mondéjar, L.G., Lupas, A., Schultz, A. und Schultz, J.E. (2012) HAMP domain-mediated signal transduction probed with a mycobacterial adenylyl cyclase as a reporter. *J Biol Chem.*, 287, 1022-1031.
- Mootz, H. (2007) Protein- Spleißen durch Inteine - Fundgrube für proteinchemische Anwendungen. *Biospektrum*, 13, 165-167.

- 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.
- Mukohata, Y., Matsumo-Yagi, A. und Kaji, Y. (1980) In Saline Environment. *Bus Centr Acad Sci., Tokyo*, 31-37.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155, 335-350.
- Muppirala, U.K., Desensi, S., Lybrand, T.P., Hazelbauer, G.L. und Li, Z. (2009) Molecular modeling of flexible arm-mediated interactions between bacterial chemoreceptors and their modification enzyme. *Protein Sci.*, 18, 1702-1714.
- Nishikata, K., Fuchigami, S., Ikeguchi, M. und Kidera, A. (2010) Molecular modeling of the HAMP domain of sensory rhodopsin II transducer from *Natronomonas pharaonis*. *Biophysics*, 6, 27-36.
- Oesterhelt, D. und Stoeckenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol.*, 233, 149-152.
- Okumura, H., Nishiyama, S., Sasaki, A., Homma, M. und Kawagishi, I. (1998) Chemotactic adaptation is altered by changes in the carboxy-terminal sequence conserved among the major methyl-accepting chemoreceptors. *J Bacteriol.*, 180, 1862-1868.
- Ottemann, K.M., Xiao, W., Shin, Y.K. und Koshland, D.E. Jr. (1999) A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science*, 285, 1751-1754.
- Perez, E. und Stock, A.M. (2007) Characterization of the *Thermotoga maritima* chemotaxis methylation system that lacks pentapeptide-dependent methyltransferase CheR:MCP tethering. *Mol Microbiol.*, 63, 363-378.
- Reisdorf, S. (2009) FTIR-spektroskopische Untersuchung der Interaktionen zwischen dem Photorezeptor Sensory Rhodopsin II aus *Natronobacterium pharaonis* und seinem Transducer. *Dissertation*.
- Renault, M., Tommassen-van Boxtel, R., Bos, M. P., Post, J.A., Tommassen, J. und Baldus, M. (2012) Cellular solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 119, 4863-4868.
- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J. und Priess, J.R. (1997) The Behavioral Mechanism of Chemotaxis and Thermotaxis. Cold Spring Harbor (NY), *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Roberts, M.A.J., Papachristodoulou, A. und Armitage, J.P. (2010) Adaptation and control circuits in bacterial chemotaxis. *Biochem Soc Trans.*, 38, 1265-1269.
- Royant, A., Nollert, P., Edman, K., Neutze, R., Landau, E.M., Pebay-Peyroula, E. und Navarro, J. (2001) X-ray structure of sensory rhodopsin II at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98, 10131-10136.
- Sambrook, J., Maniatis, T. und Fritsch, E.F. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 74, 5463-5467.
- Saranak, J. und Foster, K.W. (2005) Photoreceptor for Curling Behavior in *Peranema trichophorum* and Evolution of Eukaryotic Rhodopsins. *Eukaryot Cell.*, 4, 1605-1612.
- Schägger, H. und Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.*, 166, 368-379.
- Schägger, H. und Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem.*, 199, 223-231.
- Seidel, S.A., Dijkman, P.M., Lea, W.A., van den Bogaart, G., Jerabek-Willemsen, M., Lazic, A., Joseph, J.S., Srinivasan, P., Baaske, P., Simeonov, A., Katritch, I., Melo, F.A., Ladbury, J.E., Schreiber, G., Watts, A., Braun, D. und Duhr, S. (2013) Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods*, 59, 301-315.
- Shiomi, D., Okumura, H., Homma, M. und Kawagishi, I. (2000) The aspartate chemoreceptor Tar is effectively methylated by binding to the methyltransferase mainly through hydrophobic interaction. *Mol Microbiol.*, 36, 132-140.
- Simms, S.A., Stock, A.M. und Stock, J.B. (1987) Purification and Characterization of the S-Adenosylmethionin: Glutamyl Methyltransferase That Modifies Membrane Chemoreceptor Proteins in Bacteria. *J Biol Chem.*, 262, 8537-8543.
- Sourjik, V. und Berg, H.C. (2002) Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99, 123-127.
- Sourjik, V. und Berg, H.C. (2004) Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis. *Nature*, 428, 437-441.
- Springer, M.S., Goy, M.F. und Adler, J. (1979) Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction. *Nature*, 280, 279-284.
- Spudich, E.N., Sundberg, S.A., Manor, D. und Spudich, J.L. (1986) Properties of a second sensory receptor protein in *Halobacterium halobium* phototaxis. *Proteins*, 1, 239-246.
- Spudich, J.L., Sineshchekov, O.A. und Govorunova, E.G. (2014) Mechanism divergence in microbial rhodopsins. *Biochim Biophys Acta.*, 1873, 546-552.
- Stone, W.-L. und Dratz, E.A. (1977) Visual Photoreceptors. *Photochem Photobiol.*, 26, 79-85.
- Studdert, C.A. und Parkinson, J.S. (2004) Crosslinking snapshots of bacterial chemoreceptor squads. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101, 2117-2122.
- Studdert, C.A. und Parkinson, J.S. (2005) Insights into the organization and dynamics of bacterial chemoreceptor clusters through in vivo crosslinking studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102, 15623-15628.
- Sugiyama, Y. und Mukohata, Y. (1984) Isolation and characterization of halorhodopsin from *Halobacterium halobium*. *J Biochem.*, 96, 413-420.

- Suydam, I.T. und Boxer, S.G. (2003) Vibrational stark effects calibrate the sensitivity of vibrational probes for electric fields in proteins. *Biochemistry*, 42, 12050-12055.
- Suzuki, D., Irieda, H., Homma, M., Kawagishi, I. und Sudo, Y. (2010) Phototactic and chemotactic signal transduction by transmembrane receptors and transducers in microorganisms. *Sensors*, 10, 4010-4039.
- Swain, K.E. und Falke, J.J. (2007) Structure of the Conserved HAMP Domain in an Intact, Membrane-Bound Chemoreceptor: A Disulfide Mapping Study. *Biochemistry*, 46, 13684-13695.
- Taylor, B.L., Zhuli, I.B. und Johnson, M.S. (1999) Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annu Rev Microbiol.*, 53, 103-28.
- Terwilliger, T.C. und Koshland, D.E. Jr. (1984) Sites of methyl-esterification and deamination on the aspartate receptor involved in chemotaxis. *J Biol Chem.*, 259, 7719-7725.
- Ulbrich, S. (2011) Methylierung des Tar Rezeptors durch CheR, *Bachelorarbeit*.
- Ulbrich, S. (2014) Untersuchungen zur Signaltransduktion in *E. coli* durch semisynthetische Darstellung und Methylierung des Aspartatrezeptors Tar. *Masterarbeit*.
- Vogel, R. und Siebert, F. (2000) Vibrational spectroscopy for probing protein function. *Curr Opin Chem Biol.*, 4, 518-523.
- Wang, J., Sasaki, J., Tsai, A.L. und Spudich, J.L. (2012) HAMP domain signal relay mechanism in a sensory rhodopsin-transducer complex. *J Biol Chem.*, 287, 21316-21325.
- Wegener, A.A., Chizhov, I., Engelhard, M. und Steinhoff, H.J. (2000) Time-resolved detection of transient movement of helix F in spin-labelled pharaonis sensory rhodopsin II. *J Mol Biol.*, 301, 881-891
- Wegener, A.A., Klare, J.P., Engelhard, M. und Steinhoff, H.J. (2001) Structural insights into the early steps of Receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis. *EMBO J.*, 20, 5312-5319.
- Wessel, D. und Flügge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.*, 138, 141-143.
- Winter, R. und Noll, F. (1998) Methoden der Biophysikalischen Chemie. *Teubner Studienbücher Chemie*.
- Wolanin, P.M., Baker, M.D., Francis, N.R., Thomas, D.R., DeRosier, D.J. und Stock, J.B. (2006) Self-assembly of receptor/ signaling complexes in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103, 14313-14318.
- Yonekawa, H. und Hayashi, H. (1986) Desensitization by covalent modification of the chemoreceptor of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 198, 21-24.
- Zhou, Q., Ames, P. und Parkinson, J.S. (2009) Mutational analyses of HAMP helices suggest a dynamic bundle model of input-output signalling in chemoreceptors. *Mol Microbiol.*, 73, 801-814.



Zlotnick, A., Lee, A., Bourne, C.R., Johnson, J.M., Domanico, P.L. und Stray, S.J. (2007) In vitro screening for molecules that affect virus capsid assembly (and other protein association reactions). *Nat Protoc.*, 2, 490-498.

## 8 Anhang

### Proteinsequenzen

#### Tar-His

10 20 30 40 50 60  
MVNRIRVVTL LVMVLGVFAL LQLISGSLFF SSLHHSQKSF VVSNQLREQQ GELTSTWDLM

70 80 90 100 110 120  
LQTRINLSRS AVRMMMDSSN QQSNKVELL DSARKTLAQA ATHYKKFKSM APLPEMVATS

130 140 150 160 170 180  
RNIDEKYKNY YTALTELIDY LDYGNTGAYF AQPTQGMQNA MGEAFAQYAL SSEKLYRDIV

190 200 210 220 230 240  
TDNADDYRFA QWQLAVIALV VVLILLVAWY GIRRMLLTPL AKIIAHIREI AGGNLANTLT

250 260 270 280 290 300  
IDGRSEMDDL AQSVSHMQRS LTDTVTHVRE GSDAIYAGTR EIAAGNTDLS SRTEQQASAL

310 320 330 340 350 360  
EETAASMEQL TATVKQNADN ARQASQLAQS ASDTAQHGGK VVDGVVKTMH EIADSSKKIA

370 380 390 400 410 420  
DIISVIDGIA FQTNILALNA AVEAARAGEQ GRGFAVVAGE VRNLASRSAQ AAKEIKALIE

430 440 450 460 470 480  
DSVSRVDTGS VLVESAGETM NNIVNAVTRV TDIMGEIASA SDEQSRGIDQ VALAVSEMDR

490 500 510 520 530 540  
VTQQNASLVQ ESAAAAAAL E QASRLTQAV SAFRLAASPL TNKPQTPSRP ASEQPPAQPR

550 560  
LRIAEQDPNW ETLNSHHHHH HH

**Anzahl der Aminosäuren: 562**

**Molekulargewicht: 61.056,8 g/mol**

**Theoretischer pI: 5,79**

Tar-Strepll

10            20            30            40            50            60  
MVNRIRVVTL LVMVLGVFAL LQLISGSLFF SSLHHSQKSF VVSNQLREQQ GELTSTWDLM

70            80            90            100            110            120  
LQTRINLSRS AVRMMMDSSN QQSNAKVELL DSARKTLAQA ATHYKKFKSM APLPEMVATS

130            140            150            160            170            180  
RNIDEKYKNY YTALTELIDY LDYGNTGAYF AQPTQGMQNA MGEAFAQYAL SSEKLYRDIV

190            200            210            220            230            240  
TDNADDYRFA QWQLAVIALV VVLILLVAWY GIRRMLLTPL AKIIAHIREI AGGNLANTLT

250            260            270            280            290            300  
IDGRSEMGLD AQSVSHMQRS LTDTVTHVRE GSDAIYAGTR EIAAGNTDLS SRTEQQASAL

310            320            330            340            350            360  
EETAASMEQL TATVKQNADN ARQASQLAQS ASDTAQHGGK VVDGVVKTMH EIADSSKKIA

370            380            390            400            410            420  
DIISVIDGIA FQTNILALNA AVEAARAGEQ GRGFAVVAGE VRNLASRSAQ AAKEIKALIE

430            440            450            460            470            480  
DSVSRVDTGS VLVESAGETM NNIVNAVTRV TDIMGEIASA SDEQSRGIDQ VALAVSEMDR

490            500            510            520            530            540  
VTQQNASLVQ ESAAAAAALE EQASRLTQAV SAFRLAASPL TNKPQTSPRP ASEQPPAQPR

550            560            570  
LRIAEQDPNW ETLNSENLYF QGGSNWSHPQ FEK

**Anzahl der Aminosäuren: 573**

**Molekulargewicht: 62.247,1 g/mol**

**Theoretischer pI: 5,39**

Tar

10            20            30            40            50            60  
MVNRIRVVTL LVMVLGVFAL LQLISGSLFF SSLHHSQKSF VVSNQLREQQ GELTSTWDLM

70            80            90            100            110            120  
LQTRINLSRS AVRMMMDSSN QQSNAKVELL DSARKTLAQA ATHYKKFKSM APLPEMVATS

130            140            150            160            170            180  
RNIDEKYKNY YTALTELIDY LDYGNTGAYF AQPTQGMQNA MGEAFAQYAL SSEKLYRDIV

190            200            210            220            230            240  
TDNADDYRFA QWQLAVIALV VVLILLVAWY GIRRMMLTPL AKIIAHIREI AGGNLANTLT

250            260            270            280            290            300  
IDGRSEMDDL AQSVSHMQRS LTDTVTHVRE GSDAIYAGTR EIAAGNTDLS SRTEQQASAL

310            320            330            340            350            360  
EETAASMEQL TATVKQNADN ARQASQLAQS ASDTAQHGGK VVDGVVKTMH EIADSSKKIA

370            380            390            400            410            420  
DIISVIDGIA FQTNILALNA AVEAARAGEQ GRGFAVVAGE VRNLASRSAQ AAKEIKALIE

430            440            450            460            470            480  
DSVSRVDTGS VLVESAGETM NNIVNAVTRV TDIMGEIASA SDEQSRGIDQ VALAVSEMDR

490            500            510            520            530            540  
VTQQNASLVQ ESAAAAAALE EQASRLTQAV SAFRLAASPL TNKPQTPSRP ASEQPPAQPR

550  
LRIAEQDPNW ETF

**Anzahl der Aminosäuren: 553**

**Molekulargewicht: 59.929,6 g/mol**

**Theoretischer pI: 5,39**

TarΔ-StreptII

10 20 30 40 50 60  
MVNRIRVVTL LVMVLGVFAL LQLISGSLVT AAAATGDAAA VQEAAQWQLA VIALVVVLIL

70 80 90 100 110 120  
LVAWYGIRRM LLTPLAKIIA HIREIAGGNL ANTLTIDGRS EMGDLAQSVS HMQRSLTDTV

130 140 150 160 170 180  
THVREGSDAI YAGTREIAAG NTDLSSRTEQ QASALEETAA SMEQLTATVK QNADNARQAS

190 200 210 220 230 240  
QLAQASDSTA QHGGKVVDGV VKTMHEIADS SKKIADIISV IDGIAFQJNI LALNAAVEAA

250 260 270 280 290 300  
RAGEQGRGFA VVAGEVRNLA SRSAQAAKEI KALIEDSVSR VDTGSQLVES AGETMNNIVN

310 320 330 340 350 360  
AVTRVTDIMG EIASASDEQS RGIDQVALAV SEMDRVTTQN ASLVQESAAA AAAL EEQASR

370 380 390 400 410 420  
LTQAVSAFRL AASPLTNKPQ TSPRPASEQP PAQPRLRIAE QDPNWETLNS ENLYFQGGSN

WSHPQFEK

**Anzahl der Aminosäuren: 428****Molekulargewicht: 45.220,9 g/mol****Theoretischer pI: 5,03**

TarΔ

10            20            30            40            50            60  
MVNRIRVVTL LVMVLGVFAL LQLISGSLVT AAAATGDAAA VQEAAQWQLA VIALVVVLIL

70            80            90            100            110            120  
LVAWYGIRCM LLTPLAKIIA HIREIAGGNL ANTLTIDGRS EMGDLAQSVS HMQRSLTDTV

130            140            150            160            170            180  
THVREGSDAI YAGTREIAAG NTDLSSRTEQ QASALEETAA SMEQLTATVK QNADNARQAS

190            200            210            220            230            240  
QLAQSASDTA QHGGKVVDGV VKTMHEIADS SKKIADIISV IDGIAFQJNI LALNAAVEAA

250            260            270            280            290            300  
RAGEQGRGFA VVAGEVRNLA SRSAQAAKEI KALIEDSVSR VDTGSVLVES AGETMNNIVN

310            320            330            340            350            360  
AVTRVTDIMG EIASASDEQS RGIDQVALAV SEMDRVTOQN ASLVQESAAA AAAL EEQASR

370            380            390            400  
LTQAVSAFRL AASPLTNKPQ TPSRPASEQP PAQPRLRIAE QDPNWETF

**Anzahl der Aminosäuren: 408**

**Molekulargewicht: 42.816,4 g/mol**

**Theoretischer pI: 4,95**

HsSRII-His

10 20 30 40 50 60  
MALTTWFWVG AVGMLAGTVL PIRDCIRHPS HRRYDLVLAG ITGLAAIAYT TMGLGITATT

70 80 90 100 110 120  
VGDRTVYLAR YIDWLVTTPV IVLYLAMLAR PGHRITSAWLL AADVVFVIAAG IAAALTTGVQ

130 140 150 160 170 180  
RWLFFAVGAA GYAALLYGLL GTLPRALGDD PRVRSLFVTL RNITVVLWTL YPVVWLLSPA

190 200 210 220 230 240  
GIGILQTEMY TIVVVYLDVI SKVAFVAFV LGADAVSRLV AADAAAPATA EPTPDGDKLA

250 260  
AALEIKRASQ PELAPEDPED VEHHHHHH

**Anzahl der Aminosäuren: 268**

**Molekulargewicht: 28.804,6 g/mol**

**Theoretischer pI: 6,28**

HsHtrII-His

10            20            30            40            50            60  
 MGSGLVARIR GSYGTKLTLA LVVVVLSVG VGTFFVYQTT TQLETDV RAD LTGSADARAD

70            80            90            100            110            120  
 HLDAWLSNAR GQTQLASRHP VLASGNDTAI TRYLEGLAAS DERPDGRWFA GHVYNTSTTT

130            140            150            160            170            180  
 IEASSADAFT GVNPREQGAP FATDPPSFAT TSDVVVAAPF TVPAADFPVL SVLSPIPGETT

190            200            210            220            230            240  
 DKALIYMVNV NTLTDDFGQN VAGSTTTVVS ADGTYVSHPD QDRVLTGHDG PSRLLNQSRRT

250            260            270            280            290            300  
 QPAYIDANGT VTAAAPVDGA PWSVLVRAPH DRAFALGDFV ASSLVGLVLI TIVSLSLIGV

310            320            330            340            350            360  
 TVGSTTVTAL RQFSRRADEM AAGDLDTDID TSRNDEFGLT AESFRSMRDS LSESLTDAER

370            380            390            400            410            420  
 ATARAEDARE DAEQQRADA E AAREDAEAAR KDAQETARAL ESAAADYEEA LTAVADGDLT

430            440            450            460            470            480  
 RRVDASRDHD AMARIGHALN DMLDDIETSV AAATAFSDHV SDAAQRVEAD AGDAIDAGTD

490            500            510            520            530            540  
 VSTAVDEISD GATEQTDRLH EVAGEVDDL S ASAE EVAETV ASLADTAGQA ASAVDDGRQA

550            560            570            580            590            600  
 TEDAVETMDD VADDAEAAAAD AMDALDSEMA DIGEIVDVIA DIADQTNMLA LNASIEAART

610            620            630            640            650            660  
 GADGDGFAVV ADEVKTLAEE SRDAAEDIES RLLALQGQVS DVADEMRATS DTVSDGRATV

670            680            690            700            710            720  
 GDAATALDDV VSFVADTDTA AGQIRAATDR QAHAASRVAS AVDEVAGISQ ETAAQATAVA

730            740            750            760            770  
 DSAATQTDTL SSVDDAAADL ADRAAALDDL LAEFDAHDDT EPEDYENSHH HHHHH

**Anzahl der Aminosäuren: 775****Molekulargewicht: 80.609,0 g/mol****Theoretischer pI: 4,10**



**HsHtrII 398-His**

10            20            30            40            50            60  
MGSGLVARIR GSYGTKLTLA LVVVVLSVG VGTFFVYQTT TQLETDV RAD LTGSADARAD

70            80            90            100            110            120  
HLDAWLSNAR GQTQLASRHP VLASGNDTAI TRYLEGLAAS DERPDGRWFA GHVYNTSTTT

130            140            150            160            170            180  
IEASSADAFT GVNPREQGAP FATDPPSFAT TSDVVVAAPF TVPAADFPVL SVLSPIP GTT

190            200            210            220            230            240  
DKALIYMVNV NTLTDDFGQN VAGSTTTVVS ADGTYVSHPD QDRVLTGHDG PSRLLNQ SRT

250            260            270            280            290            300  
QPAYIDANGT VTAAAPVDGA PWSVLVRAPH DRAFALGDFV ASSLVGLVLI TIVSLSLIGV

310            320            330            340            350            360  
TVGSTTVTAL RQFSRRADEM AAGDLDTDID TSRNDEF GTL AESFRSMRDS LSESLTDAER

370            380            390            400  
ATARAEDARE DAEQQRADAE AAREDAEAAR KDAQETARNS HHHHHHH

**Anzahl der Aminosäuren: 407****Molekulargewicht: 43.113,3 g/mol****Theoretischer pI: 4,85**

NpSRII-His

10 20 30 40 50 60  
MVGLTTLFWL GAIGMLVGTL AFAWAGR DAG SGERRYVTL VGISGIAAVA YVMALGVGW

70 80 90 100 110 120  
VPVAERTVFA PRYIDWILTT PLIVYFLGLL AGLDSREFGI VITLNTVVML AGFAGAMVPG

130 140 150 160 170 180  
IERYALFGMG AVAFLGLVYY LVGPMTESAS QRSSGIKSLY VRLRNLTVIL WAIYPIWLL

190 200 210 220 230 240  
GPPGVALLTP TVDVALIVYL DLVTKVGF GF IALDAAATLR AEHGESLAGV DTDAPAVADE

NSHHHHHHH

**Anzahl der Aminosäuren: 249****Molekulargewicht: 26.645,2 g/mol****Theoretischer pI: 6,03**

NpHtrII-His

10            20            30            40            50            60  
MALNVSRLLL PSRVRHSYTG KMGAVFIFVG ALTVLFGAIA YGEVTAAAAT GDAAAVQEAA  
  
70            80            90            100           110           120  
VSAILGLIIL LGINLGLVAA TLGGDTAASL STLAAKASRM GDGDL DVELE TRREDEIGDL  
  
130           140           150           160           170           180  
YAAFDEMRS VRTSLEDAKN AREDAEQAQK RAEINTELQ AEAERFGEVM DRCADGDFTO  
  
190           200           210           220           230           240  
RLDAETDNEA MQSIEGSFNE MMDGIEALVG RIERFADAVS EDAEAVRANA ESVMEASEDV  
  
250           260           270           280           290           300  
NRAVQNISDA AGDQTETVQQ IALEMDDVSA TTEEVAASAD DIAKTARQAA ETGEAGRETA  
  
310           320           330           340           350           360  
ETAITEMNEV ESRTAQAVAS MEELNEDVRE IGEVSEMIAD IAEQTNILAL NASIEAARAD  
  
370           380           390           400           410           420  
GNSEGFVVA DEVKALAEET KAATEEIDDL IGTVQDRTO TVDDIRETSD QVSEGVETVE  
  
430           440           450           460           470           480  
DTVDALERIV DSVERTNDGI QEINQSTDAQ ADAAQKATM VEDMAATSEQ TASDAETAEE  
  
490           500           510           520           530           540  
TTETQAESVK EVFDLIDGLS EQADSLSETL SRTDTEEASA ADLDDQPTLA AGDDENSHHH

HHHH

**Anzahl der Aminosäuren: 544****Molekulargewicht: 57.896,6 g/mol****Theoretischer pI: 4,01****Tabelle 8:** Position der Cysteinmutation in Tar und TarΔ.

Tar			TarΔ	
AS	Position		AS	Position
Arginin	R214	↔	Arginin	R69
Threonin	T218	↔	Threonin	T73
Isoleucin	I224	↔	Isoleucin	I79
Threonin	T264	↔	Threonin	T119

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Martin Engelhard für die interessante Aufgabenstellung und die fortwährende Unterstützung während dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Susanne Brakmann danke ich für die Betreuung seitens der technischen Universität Dortmund.

Prof. Dr. Roger Goody sei für die Aufnahme in seine Abteilung am MPI in Dortmund herzlich gedankt.

Dr. Ralf Seidel danke ich für die Unterstützung bei molekularbiologischen Arbeiten und seine Hilfe bei vielen anderweitigen Problemstellungen im Laboralltag sowie dem Korrektur lesen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Heinz-Jürgen Steinhoff danke ich für die Unterstützung bei der ESR Spektroskopie und seine Diskussionsbereitschaft, wenn es darum ging, Messergebnisse zu interpretieren. In diesem Zusammenhang danke ich auch Dr. Johann Klare, Ioan Orban und Daniel Klose für ihre Hilfe bei Messungen und der Auswertung der Daten.

Für eine gute Zusammenarbeit sei auch Prof. Dr. Joachim Heberle und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Silke Kerruth und Hendrik Mohrmann gedankt. Vor allem für die Hilfe bei den Thermophorese Messungen sowie den ATR FTIR Analysen.

Prof. Dr. Roland Winter und seinen Mitarbeitern Alexander Werkmüller und Christoph Jeworrek sei ebenfalls für ihre Hilfe bei Anisotropie und SAXS Messungen gedankt.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Marc Baldus und seinen Mitarbeitern, vor allem Sabine Gradmann, für die Festkörper-NMR Messungen.

Ich möchte mich weiterhin besonders bei Martina Wischnewski und Anke Reulen für ihre große Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor bedanken.

Zudem danke ich auch all den ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern, wie Miria, Swetlana, Jörg, Sascha, Nina, Jana, Lars, Karin, Lena, Melanie, Holger, Kester, Ann Katrin, Young, Lin, Andrea, Frank, Marc und David für die gute Arbeitsatmosphäre in Labor und Büro.

Besonders möchte ich mich bei Arne und Sarah für ihre große Hilfe und Unterstützung im Laboralltag bedanken.

An Christa Hornemann geht ein ganz besonderer Dank für ihre große Unterstützung bei organisatorischen wie privaten Dingen.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie ganz herzlich bedanken, ohne deren ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Ines Claudia Kube geb. Heinrich

Geburtsdatum: 23.05.1984

Geburtsort: Herne

### Promotion

Seit 09/2008 Promotion am Max Planck Institut für molekulare Physiologie in Dortmund, Abteilung für physikalische Biochemie.

Dissertation: „Untersuchungen zur Signalweiterleitung in Chemo- und Photorezeptoren“

### Studium

10/2003 - 08/ 2008 Studium des Faches Chemische Biologie an der technischen Universität Dortmund

Abschluss: Master of Science Chemische Biologie

02/ 2008 - 08/2008 Masterarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund, Abteilung für physikalische Biochemie: „Zellfreie Synthese von Channelrhodopsin-2.“

### Schulbildung

08/1994 - 06/2003 Gymnasium Eickel, Herne

Abschluss: Abitur

08/1990 - 06/ 1994 Grundschule an der Königstraße, Herne