

**Gezielte Modifikation sowie Analyse der Bindungseigenschaften des
Histidin-Bindeproteins aus *Escherichia coli* und des GCN4-Leucinzippers aus
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Julia Wittmann
aus Kulmbach

Göttingen 2002

D 7

Referent:

Prof. Dr. H.-J. Fritz

Korreferent:

PD Dr. H. Kolmar

Tag der mündlichen Prüfung:

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	ZIELE UND AUFGABEN	1
1.2	DIE TOXR-VERMITTELTE TRANSKRIPTIONSAKTIVIERUNG.....	2
1.2.1	<i>Das ToxR-System als Basis für ein Nachweissystem von Rezeptor-Ligandenwechselwirkung.....</i>	3
1.2.2	<i>Das ToxR-System als Basis zur Entwicklung eines genetischen Schalters für die gezielte Genexpression.....</i>	6
1.3	AUSWAHL EINES GEEIGNETEN REZEPTORS ALS BASIS FÜR EIN REPERTOIRE AN REZEPTOREN FÜR NIEDERMOLEKULARE LIGANDEN: DAS HISTIDIN-BINDEPROTEIN (HISJ) AUS E. COLI	9
1.4	AUSWAHL EINES GEEIGNETEN, HOMODIMERISIERENDEN PROTEINS FÜR DIE UNTERSUCHUNG ZUR LIGANDENVERMITTELTEN DIMERSTABILISIERUNG: DER GCN4-LEUCINZIPPER AUS S. CEREVISIAE	13
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	MATERIALIEN	16
2.1.1	<i>Bakterienstämme.....</i>	16
2.1.2	<i>Oligodesoxyribonukleotide</i>	16
2.1.3	<i>Vektoren.....</i>	17
2.1.4	<i>Cemikalien</i>	21
2.1.5	<i>Proteine und Enzyme</i>	21
2.1.6	<i>Weitere Geräte und Materialien</i>	22
2.1.7	<i>Puffer und Lösungen:.....</i>	23
2.1.8	<i>Nährmedien.....</i>	25
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	25
2.2.1	<i>Vermehrung und Lagerung von Escherichia coli-Stämmen.....</i>	25
2.2.2	<i>Transformation von E. coli</i>	25
2.2.3	<i>DNA-Präparation aus E. coli.....</i>	26
2.2.4	<i>Enzymatische Manipulation von DNA.....</i>	26
2.2.5	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR).....</i>	26
2.2.6	<i>Mutagenese von DNA nach der modifizierten QuikChange™-Methode....</i>	28
2.2.7	<i>Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von DNA-Fragmenten.</i>	29
2.2.8	<i>Untersuchung der Dimersierungseigenschaften verschiedener ToxR'-Fusionsproteine mittels TOXCAT-Assay.....</i>	31
2.3	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	31
2.3.1	<i>Präparation der periplasmatischen Proteine aus E. coli im analytischen Maßstab.....</i>	31
2.3.2	<i>Präparation der periplasmatischen Proteine aus E. coli</i>	32
2.3.3	<i>Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC)</i>	32
2.3.4	<i>Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Proteinen</i>	33
2.3.5	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen</i>	33

2.3.6	<i>Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran</i>	34
2.3.7	<i>Immunochemischer Nachweis von transferierten Proteinen auf Nitrocellulose-Membran</i>	34
2.3.8	<i>Messung der β-Galaktosidase-Aktivität im E. coli Zell-Lysat</i>	34
2.4	BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DER HISJ-VARIANTEN.....	36
2.4.1	<i>Erstellung von Kalibrierungskurven zur Bestimmung der Konzentration ^3H-markierter Liganden mittels Szintillationszählung</i>	36
2.4.2	<i>Gleichgewichtsdialyse unter Verwendung ^3H-markierter Liganden zur Bestimmung der Affinitäten der HisJ-Varianten für basische L-Aminosäuren</i>	37
2.4.3	<i>Berechnung der K_d-Werte für die Bindung von basischen L-Aminosäuren durch die HisJ-Varianten mittels der über Gleichgewichtsdialyse ermittelten Daten</i>	38
2.4.4	<i>Fluorimetrische Messung der Konformationsänderung von HisJ</i>	39
2.4.5	<i>Berechnung der K_d-Werte für die Bindung von niederaffinen Liganden durch die HisJ-Varianten</i>	40
2.4.6	<i>Probenvorbereitung zur Messung von Denaturierungskurven</i>	41
2.4.7	<i>Probenvorbereitung zur Messung von Renaturierungskurven</i>	41
2.4.8	<i>Fluoreszenzmessung der De- und Renaturierungskurven</i>	41
2.4.9	<i>Mathematische Behandlung der Faltungs-Thermodynamik - Berechnung der freien Entfaltungsenergie $\Delta G_D^{\text{H}_2\text{O}}$, $[\text{Urea}]_{1/2}$ und m-Werte</i>	42
2.5	MATHEMATISCHE METHODEN	44
2.5.1	<i>Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen</i>	44
2.6	COMPUTERGESTÜTZTE PLANUNG UND AUSWERTUNG VON EXPERIMENTEN	45
3	ERGEBNISSE ZUR GEZIELTEN MODIFIKATION DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN DES HISJ	46
3.1	PLANUNG DER VORGEHENSWEISE.....	46
3.1.1	<i>Das LAOBP aus E. coli als Modellprotein für die Generierung einer HisJ-Variante mit erhöhter Affinität für Arginin und Lysin</i>	46
3.2	KLONIERUNG DER HISJ-VARIANTEN UND DES LAOBP	50
3.2.1	<i>Amplifizierung und Klonierung des wt-hisJ aus E. coli</i>	50
3.2.2	<i>Erzeugung und Klonierung des hisJ^{L52F}-Gens</i>	51
3.2.3	<i>Klonierung des argT-Gens aus E. coli</i>	52
3.3	EXPRESSION UND REINIGUNG DER HISJ-VARIANTEN UND DES LAOBP	53
3.3.1	<i>Untersuchung der Akkumulation der HisJ6H-Varianten und des LAOBP im Periplasma von E. coli</i>	53
3.3.2	<i>Reinigung der HisJ-Varianten und des LAOBP</i>	55
3.4	BESTIMMUNG DER FALTUNGSSTABILITÄT DER LIGANDENFREIEN HISJ-VARIANTEN .	57
3.5	UNTERSUCHUNG DER WECHSELWIRKUNG DER HISJ-VARIANTEN MIT VERSCHIEDENEN LIGANDEN.....	61
3.5.1	<i>Untersuchung der Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit basischen L-Aminosäuren mittels Fluoreszenzspektroskopie</i>	61

3.5.2	<i>Bestimmung der Affinitätskonstanten für die Wechselwirkung der HisJ-Varianten und des LAOBP mit basischen L-Aminosäuren mittels Gleichgewichtsdialyse.....</i>	66
3.5.3	<i>Bestimmung der Affinitätskonstanten für die Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit den basischen D-Aminosäuren mittels Fluoreszenzmessungen ..</i>	72
3.5.4	<i>Bestimmung der Affinitätskonstanten für die Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit Carboxy- bzw. α-Aminosubstituierten Histidin-Derivaten mittels Fluoreszenzmessungen.....</i>	79
3.5.5	<i>Einfluss der Interaktion der HisJ-Varianten mit den basischen L-Aminosäuren auf den Entfaltungsprozess der Proteine</i>	85
4	ERGEBNISSE ZUR LIGANDENVERMITTELTEN DIMERSTABILISIERUNG ANHAND ZWEIER VARIANTEN DES GCN4-LEUCINZIPPERS AUS SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	89
4.1	GEZIELTE AUSTAUSCHE VON AN DER HOMODIMERISIERUNG DES GCN4 BETEILIGTEN AMINOSÄURERESTEN ZUR DESTABILISIERUNG DES HOMODIMERS	89
4.2	ERZEUGUNG DER GCN4-VARIANTEN GCN ^{L5G} UND GCN ^{ALA}	91
4.3	UNTERSUCHUNG DER VARIANTEN GCN ^{L5G} UND GCN ^{ALA} AUF IHRE FÄHIGKEIT ZU HOMODIMERISIEREN	92
4.4	DURCHMUSTERUNG EINER BIBLIOTHEK NIEDERMOLEKULARER VERBINDUNGEN AUF EINE SUBSTANZ, ZUR STABILISIERUNG DER GCN ^{MUT} -VARIANTEN.....	94
4.4.1	<i>Untersuchungen zur möglichen Stabilisierung der Homodimere der GCN^{mut}-Varianten durch Benzoesäure mittels β-Galaktosidaseaktivitäts-Assays</i>	96
4.4.2	<i>Untersuchungen zur möglichen Stabilisierung der Homodimere der GCN^{mut}-Varianten durch Benzoesäure mittels TOXCAT-Assay.....</i>	98
5	DISKUSSION ZUR GEZIELTEN MODIFIKATION DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN DES HISJ	102
5.1	AUSWIRKUNGEN DER L52F-MUTATION AUF DIE KONFORMATIONELLE STABILITÄT VON HISJ	102
5.2	FÄHIGKEIT DER HISJ-VARIANTEN MIT DEN BASISCHEN L-AMINOSÄUREN ZU INTERAGIEREN	103
5.3	AFFINITÄTEN DER HISJ-VARIANTEN FÜR DIE BASISCHEN L-AMINO-SÄUREN.....	104
5.4	AFFINITÄTEN DER HISJ-VARIANTEN FÜR DIE BASISCHEN D-AMINOSÄUREN.....	106
5.5	AFFINITÄTEN DER HISJ-VARIANTEN FÜR CARBOXY- BZW. α -AMINOSUBSTITUIERTE HISTIDIN-DERIVATE.....	107
5.6	EINFLUSS DER BASISCHEN L-AMINOSÄUREN AUF DEN ENTFALTUNGSPROZESS DER HISJ-VARIANTEN.....	108
6	DISKUSSION ZUR LIGANDENVERMITTELTEN DIMERSTABILISIERUNG ANHAND ZWEIER VARIANTEN DES GCN4-LEUCINZIPPERS AUS SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	111

6.1	EINFLUSS DER MUTATIONEN L5G UND L14,15A AUF DAS HOMODIMERISIERUNGSVERHALTEN DES GCN4-LEUCINZIPPERS.....	111
6.2	EINFLUSS VERSCHIEDENER NIEDERMOLEKULARER SUBSTANZEN AUF DIE HOMODIMERISIERUNGSTENDENZ DER GCN ^{MUT} -VARIANTEN	112
6.3	EINFLUSS VON BENZOESÄURE AUF DAS IN DEN TOX-ASSAYS DETEKTIERTE SIGNAL	113
7	ZUSAMMENFASSUNG ZUR GEZIELTEN MODIFIKATION DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN DES HISJ	116
8	ZUSAMMENFASSUNG ZUR LIGANDENVERMITTELTEN DIMERSTABILISIERUNG ANHAND ZWEIER VARIANTEN DES GCN-LEUCINZIPPERS AUS <i>S. CEREVISIAE</i>	118
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	119
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	126
ANHANG	128	128
A.	NUKLEOTIDSEQUENZEN DER RELEVANTEN GENE	128
	<i>Nukleotidsequenz des hisJ-Gens und die daraus abgeleitete Peptidsequenz des HisJ im Einbuchstaben-Code.....</i>	<i>128</i>
	<i>Nukleotidsequenz des argT-Gens und die daraus abgeleitete Peptidsequenz des LAOBP im Einbuchstaben-Code.....</i>	<i>129</i>
	<i>Nukleotidsequenz des Leucinzipperanteils des GCN4-Gens und die daraus abgeleitete Peptidsequenz Leucinzipperanteils des des GCN4 im Einbuchstaben-Code.....</i>	<i>131</i>
B.	HERLEITUNG DER FORMEL ZUR BESTIMMUNG DER BINDUNGSKONSTANTEN	132
C.	FÜR DEN TEST AUF LIGANDENVERMITTELTE DIMERSTABILISIERUNG EINGESETZTE NIEDERMOLEKULARE SUBSTANZEN	134
DANKSAGUNG	135	135

1 Einleitung

1.1 Ziele und Aufgaben

Die fast vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms (Venter *et al.*, 2001; Lander *et al.*, 2001) lieferte der Wissenschaft eine grosse Datenmenge, die für sich genommen allerdings wenig Aussagekraft besitzt. So kennt man heute zwar die Anzahl der Nukleotide und ihre Lage im Genom, doch dieses Kenntnis allein gibt noch keinen Aufschluss über die komplexe Wirkungsweise des menschlichen Organismus. Um diese zu verstehen, müssen aus den vorliegenden Sequenzen, von denen nur ca. 10 % kodierende Bereiche darstellen, Gene identifiziert, die dazugehörigen Proteine annotiert und grösseren funktionstragenden Komplexen zugeordnet werden. Derartige Komplexe setzen sich aus unterschiedlichen Makromolekülen zusammen, die über eine Vielzahl von Wechselwirkungen miteinander in Kontakt stehen und so ein funktionelles Netzwerk ausbilden. Die Analyse der Funktionsweise solcher Netzwerke, sowie deren einzelnen Komponenten und ihrer Interaktionen ist nicht nur von grundlagenwissenschaftlichem Interesse, sondern beschäftigt auch viele anwendungsbezogene Forschungsbereiche. Insbesondere im medizinischen Sektor ist man an der Aufklärung der komplizierten molekularen Mechanismen interessiert, da jedes einzelne funktionstragende Makromolekül und jeder supramolekulare Komplex im Zusammenhang mit einer Krankheit stehen kann und somit ein potentielles Target für ein neues Arzneimittel darstellt. Die Suche nach neuen Wirkstoffen ausgehend von DNA-Sequenzen ist eine völlig neue Herangehensweise in der medizinischen Forschung, da bislang die Krankheit selbst der Ausgangspunkt war, und die Sequenzierung der für diese Krankheit relevanten Gene oft am Ende eines langwierigen Suchprozesses stand, der hauptsächlich aus klinischen Testreihen, wie z. B. Tierversuchen bestand.

Diese neuartige Herangehensweise, sowie die grosse Anzahl potentieller Drug-Targets, erforderte die Entwicklung neuer experimenteller Techniken, die schnelle und effiziente Analysen in grossem Maßstab ermöglichen und hat so zur Etablierung völlig neuer Disziplinen wie Proteomik, Drug Discovery, etc. geführt. Für die Suche nach niedermolekularen Verbindungen, die über Interaktion mit einem bestimmten Makromolekül die Funktion dieses Targets durch Aktivierung, Inhibierung oder Modifikation beeinflussen und somit ein potentielles Medikament darstellen, sind physikalische, biochemische und biologische Methoden einsetzbar. Ein genetisches Verfahren zur Analyse molekularer Wechselwirkungen, das ToxR-System aus *Vibrio cholerae* (siehe Abschnitt 1.2) ist Gegenstand dieser Dissertation. Aufbauend auf diesem System soll ein Verfahren zur Drug Discovery entwickelt werden.

Beim Drug Discovery werden Substanzbibliotheken auf Interaktion mit einem validierten Makromolekül durchmustert. Für die Entwicklung neuer Medikamente müssen dann in weiteren Experimenten die als Interaktionspartner identifizierten Substanzen auf mögliche Beeinflussung der Funktionsweise des jeweiligen Makromoleküls untersucht werden.

Ziel des Projektes, in dessen Rahmen diese Doktorarbeit angefertigt wurde, ist es, basierend auf dem ToxR-System ein Verfahren zur Identifizierung von Rezeptor-Ligandenwechselwirkungen zu entwickeln, wobei zunächst ein Modellsystem geschaffen werden soll, bei dem die Wechselwirkung konstanter Liganden mit variierenden Rezeptoren untersucht werden kann.

1.2 Die ToxR-vermittelte Transkriptionsaktivierung

Bei ToxR handelt es sich um ein integrales Membranprotein des gramnegativen Eubakteriums *Vibrio cholerae*, welches die Expression der Cholera toxin Untereinheiten CtxA und CtxB reguliert (Miller und Mekalanos, 1988). Es besteht aus drei Domänen, einer N-terminalen, cytoplasmatischen DNA-bindenden, einer transmembralen und einer C-terminalen, periplasmatischen Domäne, welche Homodimere bilden kann (DiRita & Mekalanos, 1991; Kolmar *et al.*, 1995b).

Die Expression des Cholera toxins wird induziert, sobald das Bakterium seinen Wirtsorganismus befallen hat (es siedelt sich im menschlichen Darm an). Der Vorgang der Transkriptionsaktivierung ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

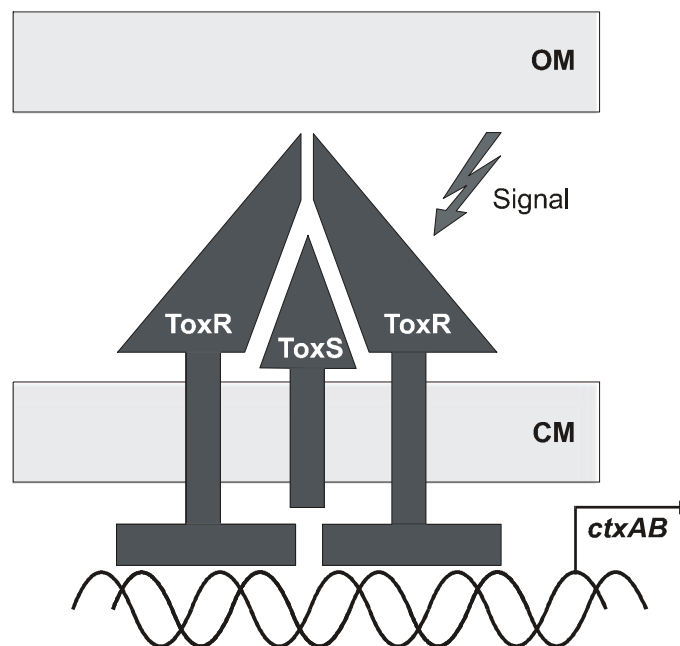


Abbildung 1: Schematische Darstellung des von DiRita und Mekalanos (1991) vorgeschlagenen Modells zur Transkriptionsaktivierung des *ctx*-Promotors in *Vibrio cholerae* (Abb. nach DiRita und Mekalanos (1991), modifiziert). Die durch ToxS vermittelte, bzw. stabilisierte Dimerisierung der periplasmatischen Domänen zweier ToxR-Moleküle führt zur räumlichen Annäherung der cytoplasmatischen, DNA-bindenden Domänen, wodurch es zur Transkription der unter der Kontrolle des *ctx*-Promotors stehenden *ctxAB*-Gene kommt. CM: Cytoplasmamembran; OM: Äußere Membran; *ctxAB*: *ctxAB*-Gene.

Durch die veränderten Umweltbedingungen (wahrscheinlich spielen hier pH-Wert, Osmolarität und andere exogene Stimuli eine Rolle) kommt es zu einer Dimerisierung zweier periplasmatischer ToxR-Domänen, welche vermutlich durch ein weiteres integrales Membranprotein, ToxS vermittelt, bzw. stabilisiert wird (DiRita & Mekalanos, 1991). Das durch die Dimerisierung der periplasmatischen Domäne ausgelöste Signal wird über die Transmembranregion auf die cytoplasmatische Domäne übertragen. Da zu ToxR keine Strukturdaten vorliegen, ist unklar, ob die cytoplasmatische Domäne ebenfalls Dimere bilden kann, oder ob die beiden cytoplasmatischen Domänen, deren periplasmatischen Domänen dimerisiert sind, nur in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Es ist allerdings bekannt, dass die cytoplasmatische Domäne durch Dimerisierung der periplasmatischen Domäne in die Lage versetzt wird, den *ctx*-Promotor zu binden, unter dessen Kontrolle die Gene *ctxA* und *ctxB*, welche für die α - und β -Untereinheiten des Choleraenterotoxins codieren, und somit die Transkription dieser Gene zu aktivieren (DiRita und Mekalanos, 1991).

Aufgrund der von der Dimerisierung abhängigen Transkriptionsaktivierung lässt sich ToxR als Indikatorsystem für Protein-Protein-Wechselwirkungen verwenden. Entfernt man die periplasmatische Domäne des ToxR und fusioniert das zu untersuchende Protein C-terminal an das verbleibende ToxR' (welches aus der cytoplasmatischen und der Transmembrandomäne besteht), so kann eine mögliche Dimerisierung dieses Proteins nach Expression in einem *E. coli*-Indikatorstamm, welcher das *lacZ*-Gen unter Kontrolle des *ctx*-Promotors trägt, untersucht werden (Kolmar, *et al.*, 1995b, 1994; Kolmar, 1995a). Eine Dimerisierung des zu untersuchenden Proteins führt durch ToxR-vermittelte Aktivierung des *ctx*-Promotors zu Expression der β -Galaktosidase, deren Aktivität sich spektroskopisch über einen β -Galaktosidase-Assay messen lässt (Miller, 1972).

Anwendung fand dieses System bereits nicht nur zur Untersuchung homodimersierender Eigenschaften verschiedener Proteine. Es besteht auch die Möglichkeit, verschiedene Proteine auf ihre Fähigkeit, Heterodimere zu bilden zu untersuchen (Hennecke, 1996). Ein weiteres auf ToxR basierendes Nachweissystem molekularer Wechselwirkungen wurde von Russ & Engelmann (1999) und Gurezka & Langosch (2001) entwickelt. Dieses System ähnelt vom Prinzip her dem oben beschriebenen, allerdings wird als Reporter gen das *cat*-Gen, welches für die Chloramphenicolacetyltransferase kodiert, verwendet. Die Dimerisierung der zu untersuchenden Makromoleküle resultiert bei dem als TOXCAT bezeichnetem Verfahren direkt in einer Erhöhung der Chloramphenicolresistenz, der die entsprechenden Proteine exprimierenden Zellen. Auch dieses Verfahren wurde im Rahmen dieser Dissertation zur Untersuchung von Rezeptor-Ligandenwechselwirkungen eingesetzt.

1.2.1 Das ToxR-System als Basis für ein Nachweissystem von Rezeptor-Ligandenwechselwirkung

Basierend auf dem ToxR-System soll nun ein genetisches *Screening*-Verfahren zur Rezeptor-Ligandenwechselwirkung entwickelt werden. Hierfür werden zwei ToxR'-Fu-

sionsmodule benötigt: zum einem ein konstantes Modul, bestehend aus ToxR' und einem Rezeptorprotein mit bekannter, hoher Affinität zu einem bestimmten Liganden (in diesem Fall das Histidin-Bindeprotein HisJ aus *E. coli*, welches in dieser Abteilung bereits als Fusionsprotein mit ToxR' vorliegt und unter Abschnitt 1.3 näher beschrieben wird), zum anderen ein variables Modul, bei dem die unterschiedlichen Mitglieder eines Repertoires an Rezeptorproteinen, welches durch Zufallsmutagenese des HisJ generiert werden soll, mit dem ToxR' in Fusion vorliegen. Will man nun aus diesem Repertoire einen Kandidaten isolieren, der mit einem gewünschten Ligandenmolekül interagiert, so kann man das Repertoire mittels Tox-Assay auf einen solchen Kandidaten durchmustern, indem man ein heterobifunktionelles Liganden-Linker-Ligandenmolekül einsetzt, bei dem der bekannte Ligand des konstanten Rezeptorproteins über einem Spacer mit dem Ligandenmolekül verbunden ist, für das man einen geeigneten Rezeptor sucht. Dieses Linkermolekül sollte eine Heterodimerisierung des konstanten Rezeptors und des gesuchten Rezeptors, welcher mit dem gewünschten Ligandenmolekül interagiert, bewirken. Anhand erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität im ToxR-Assay lässt sich diese Heterodimerisierung, und somit die Wechselwirkung des Rezeptorproteins mit dem gewünschten Ligandenmolekül, nachweisen. Eine Schemazeichnung dieses Prinzips ist in Abb. 2 dargestellt.

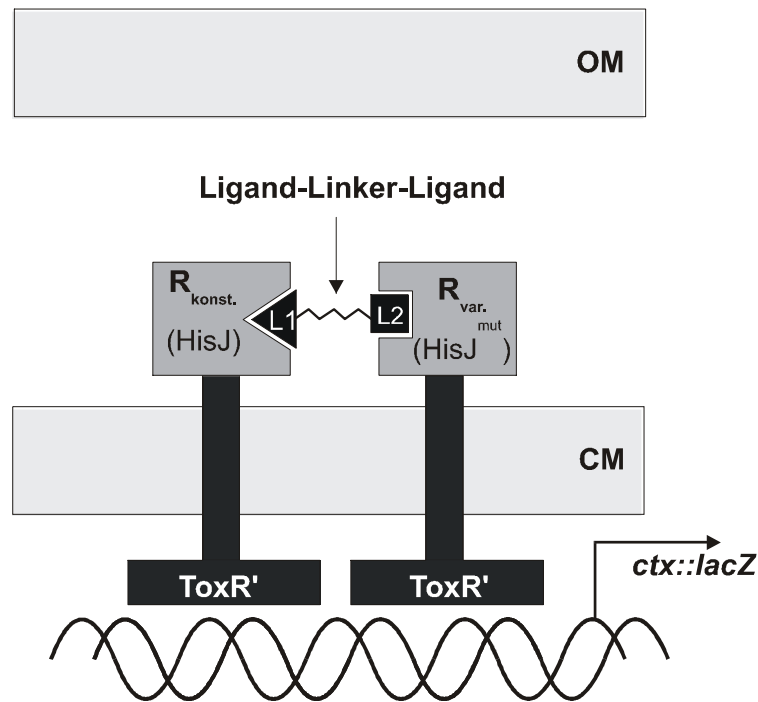


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines möglichen genetischen *Screening*-Verfahrens der Rezeptor-Ligandenwechselwirkung beruhend auf der ToxR-vermittelten Transkriptionsaktivierung. Anstelle der periplasmatischen ToxR-Domäne, befinden sich die auf Interaktion mit gewünschten Liganden zu untersuchenden Rezeptormoleküle in Fusion mit dem ToxR'-Sockel. Dabei handelt es sich bei $R_{\text{konst.}}$ um ein konstantes Rezeptormolekül (in diesem Fall das HisJ aus *E. coli*) mit bekannter hoher Affinität für den Liganden L1. $R_{\text{var. mut}}$ stellt eine durch Mutagenese des HisJ generierte Bibliothek an Rezeptormolekülen dar, die mit unterschiedlichen niedermolekularen Substanzen wechselwirken. Für die Suche nach einem Rezeptormolekül, das mit dem Liganden L2 spezifisch wechselwirkt, wird ein Liganden-Linker-Ligandenmolekül eingesetzt, bei dem der Ligand L1 mit dem Liganden L2 über einen Spacer verbunden ist. Über ein solches Liganden-Linker-Ligandenmolekül sollte das HisJ^{mut}-Molekül aus der Rezeptorbibliothek, welches den Liganden L2 hochaffin bindet, mit dem konstanten Rezeptormolekül HisJ dimerisiert werden, was in Aktivierung der Transkription des unter Kontrolle des *ctx*-Promotors stehenden Reportergens *lacZ* resultiert und anhand erhöhter β -Galaktosidaseaktivität im Zell-Lysat nachweisbar ist. CM: Cytoplasmamembran; OM: Äußere Membran.

Alternativ könnte der TOXCAT-Assay als Selektionssystem verwendet werden, wobei hier die Zellen auf Platten, denen das heterobifunktionelle Liganden-Linker-Ligandenmolekül beigemischt ist und die mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an Chloramphenicol versetzt sind, ausstreicht. In diesem Fall können solche Zellen bei hohen Chloramphenicolkonzentrationen wachsen, die ein Rezeptormolekül exprimieren, der das gewünschte Ligandenmolekül hochaffin bindet und sich somit über das Liganden-Linker-Ligandenmolekül mit dem konstanten Rezeptormolekül dimerisieren lässt.

Ein solches Verfahren zur Detektion von Rezeptor-Ligandenwechselwirkung unterscheidet sich zwar vom herkömmlichen Drug Discovery dadurch, dass anstelle von Substanzbibliotheken ganz bestimmte, im Vorfeld definierte Liganden auf Interaktion mit Rezeptoren unbekannter Funktion untersucht werden, allerdings kann aufbauend auf einem solchen System ein Detektionsverfahren für niedermolekulare Verbindungen entwickelt werden. Ein solches Detektionsverfahren könnte z.B. im klinischen Bereich zum Nachweis

von Stoffwechselprodukten, Medikamenten, Karzinogenen, etc. oder in der Umweltanalytik zum Auffinden von Toxinen Anwendung finden.

Ist unter Verwendung des ToxR-Systems ein geeignetes Rezeptorprotein welches mit dem gewünschten Liganden hochaffin wechselwirkt, identifiziert, so kann dieses Rezeptorprotein näher charakterisiert und schliesslich in einem Detektionsverfahren zum spezifischen Nachweis der gewünschten Substanz Einsatz finden.

Weiterhin eignet sich das ToxR-System aufgrund seiner transkriptionsaktivierenden Eigenschaft auch zur Entwicklung eines genetischen Schalters, über den sich gezielt die Expression bestimmter Gene regulieren lässt. Für die Landwirtschaft sind in dieser Hinsicht besonders Systeme von Interesse, mit denen sich die Expression bestimmter Gene regulieren lässt, also z.B. die Produktion „positiver“ Makromoleküle (z.B. Resistenz- oder ertragssteigernde Faktoren) aktiviert werden kann. Daher ist ein weiteres Ziel dieses Projektes, die Entwicklung eines solchen Systems in Form eines genetischen Schalters, zur gezielten Expression gewünschter Genprodukte.

1.2.2 Das ToxR-System als Basis zur Entwicklung eines genetischen Schalters für die gezielte Genexpression

Im simpelsten Fall besteht ein genetischer Schalter zur gezielten Genexpression aus einer transkriptionsaktivierenden Komponente und einem Rezeptorprotein, dass durch hochaffine Wechselwirkung mit einer niedermolekularen Verbindung den Transkriptionsaktivator in die Lage versetzt, die Expression der gewünschten Genprodukte zu induzieren. Dies könnte z.B. erreicht werden, indem das Effektormolekül eine stabile Dimerisierung zweier Rezeptorproteine bewirkt, da die Ausbildung von Proteindimeren ein in der Natur vielfach verwirklichtes Signal für Aktivierung der Transkription darstellt. In diesem Projekt sollen als Rezeptorkomponenten eines solchen Systems zwei in ihrem natürlichen Dimerisierungsverhalten eingeschränkte Varianten des GCN4-Leucinzippers aus *Saccharomyces cerevisiae*, welcher unter Abschnitt 1.4 näher behandelt wird, für erste Untersuchungen zur Entwicklung eines genetischen Schalters zur gezielten Genexpression eingesetzt werden. Es sollen niedermolekulare Verbindungen identifiziert werden, durch die die Homodimerisierung der GCN4-Varianten stabilisiert, und dadurch das Signal zur Transkriptionsaktivierung gegeben wird. Als transkriptionsaktivierende Komponente soll wiederum das ToxR'-System aus *Vibrio cholerae*, welches über Protein-Protein-Wechselwirkung reguliert wird, dienen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte unter Verwendung des ToxR-Systems in Fusion mit dem GCN4 zunächst ein Modellsystem geschaffen werden, anhand dessen untersucht werden kann, ob ein solches System prinzipiell realisierbar ist. Aufbauend auf einem solchen Modellsystem können zu einem späteren Zeitpunkt ähnliche, wenngleich wesentlich komplexere Systeme entwickelt werden, welche auf den pflanzlichen Organismus, in dem sie schliesslich eingesetzt werden sollen, abgestimmt sind. Das ToxR'-System eignet sich gut als Basis für ein derartiges Modellsystem, da es einfach zu

handhaben und von der simpelsten möglichen Funktionsweise ist, da hier Dimerisierung das unmittelbare Signal für die Transkriptionsaktivierung ist. Ein über eine komplexe Signalkaskade reguliertes Transkriptionsaktivierungssystem brächte mit seinen vielen zusätzlich benötigten Komponenten mögliche Störfaktoren mit sich, die das System auf nicht vorzusagende Weise beeinflussen könnten.

Als Rezeptorkomponente, über deren Liganden-induzierte Dimerisierung die ToxR-vermittelte Transkriptionsaktivierung ausgelöst werden soll, soll über gezielte Mutagenese eine Variante des GCN4-Leucinzipfers aus *Saccharomyces cerevisiae* mit dem ToxR fusioniert werden, die in ihrem Dimerisierungsverhalten eingeschränkt ist. Das GCN-Protein soll hierfür so modifiziert werden, dass eine Lücke in der Interaktionsfläche zwischen zwei GCN-Molekülen entsteht, durch die die Fähigkeit des Proteins, stabile Homodimere zu bilden, deutlich eingeschränkt ist. Eine Bibliothek niedermolekularer Substanzen soll dann auf Verbindungen durchmustert werden, die in der Lage sind, diese Lücke zu füllen und die Homodimerisierung der GCN-Variante deutlich zu stabilisieren. Für die Identifizierung dieser Substanz soll der Tox-Assay angewandt werden, indem eine ligandenvermittelte Stabilisierung des GCN-Homodimers anhand einer Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität im *E. coli* Zell-Lysat detektiert wird. Schematisch ist die Vorgehensweise in Abb. 3 dargestellt.

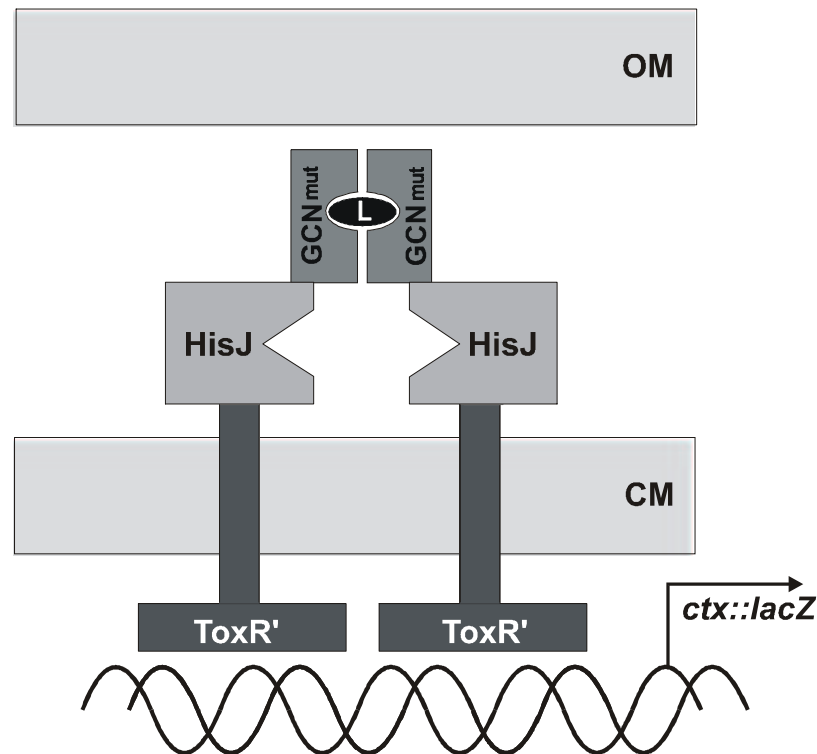


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines möglichen Modellsystems zur Entwicklung eines genetischen Schalters basierend auf der ToxR'-vermittelten Transkriptionsaktivierung. Anstelle der periplasmatischen ToxR-Domäne befindet sich eine HisJGCN^{mut}-Fusionsprotein auf dem ToxR'-Sockel. Bei GCN^{mut} handelt es sich um eine gezielt generierte Variante des GCN4-Leucinzipers aus *S. cerevisiae*, die aufgrund einer Lücke in der Interaktionsfläche zweier GCN-Moleküle in ihrer Fähigkeit, stabile Homodimere zu bilden, eingeschränkt ist. Über eine niedermolekulare Verbindung L, die in der Lage ist, die Lücke in der Interaktionsfläche durch spezifische Interaktion auszufüllen, soll das GCN^{mut}-Homodimer signifikant stabilisiert werden, was in Aktivierung der Transkription des unter Kontrolle des *ctx*-Promotors stehenden Gens resultiert. Um eine solche Substanz aus einer Bibliothek niedermolekularer Verbindungen zu identifizieren, steht als Reportergen das *lacZ* unter Kontrolle des *ctx*-Promotors. Eine durch Liganden-induzierte Stabilisierung des GCN^{mut}-Homodimers bewirkt Erhöhung der Transkriptionsrate des *lacZ* und lässt sich anhand erhöhter β -Galaktosidaseaktivität im Zell-Lysat nachweisen. CM: Cytoplasmamembran; OM: Äußere Membran.

Zusätzlich zu den β -Galaktosidaseaktivitätassays kann bei der Suche nach einer Substanz, die in der Lage ist, die GCN-Homodimere zu stabilisieren, wiederum der TOXCAT-Assay eingesetzt werden (in analoger Weise wie unter Abschnitt 1.2.1 beschrieben, wobei in diesem Falle eine möglicherweise die GCN-Dimere stabilisierende Substanz anstelle eine Liganden-Linker-Ligandenmoleküls dem Medium beigemischt wird.).

1.3 Auswahl eines geeigneten Rezeptors als Basis für ein Repertoire an Rezeptoren für niedermolekulare Liganden: Das Histidin-Bindeprotein (HisJ) aus *E. coli*

Für die Erzeugung eines Repertoires an Rezeptorproteinen für beliebig vorzugebende niedermolekulare Liganden sollte das Protein, von dem ausgehend dieses Repertoire aufgebaut werden soll, bestimmte Eigenschaften aufweisen: es sollte sich um einen monomeren Einkettenrezeptor bekannter Struktur handeln, welcher bereits eine niedermolekulare Substanz spezifisch und mit möglichst hoher Affinität bindet. Durch Austausch der an der Bindung des Liganden beteiligten Aminosäuren sollte es möglich sein, ein Repertoire an Rezeptoren zu erzeugen, welche verschiedene niedermolekulare Liganden hochaffin binden. Ein Protein, das alle diese Voraussetzungen erfüllt, ist das Histidin-Bindeprotein (HisJ) aus *E. coli*. HisJ gehört der Klasse der löslichen periplasmatischen Rezeptorproteine an, welche im Periplasma gramnegativer Bakterien wie *E. coli* am Transport niedermolekularer Substanzen ins Zellinnere beteiligt sind, in Frage.

Zu der mindestens fünfzig Mitglieder umfassenden Klasse der periplasmatischen Rezeptorproteine der gramnegativen Bakterien gehören Aminosäure-Bindeproteine, Rezeptoren für Mono- und Oligosaccharide, Di- und Oligopeptide, Oxyanionen, Kationen und Vitamine. Von ca. einem Dutzend dieser Rezeptorproteine wurde die Struktur im Bereich von 1,9 bis 1,02 Å gelöst (Quioco *et al.*, 1996).

Obwohl diese Rezeptoren, deren relative Molmassen in den Größenordnungen von 20000 bis 60000 Da rangieren, zueinander zum Teil sehr geringe Sequenzhomologien aufweisen, besitzen sie alle eine ähnliche Tertiärstruktur: sie sind aus zwei globulären Domänen zusammengesetzt, zwischen denen sich die Ligandenbindungsstelle befindet. (Quioco *et al.*, 1996).

Zwischen den beiden Domänen befindet sich eine Furche, die die Bindungstasche bildet. Die Rezeptorproteine kommen in zwei Konformationen vor, einer offenen, bei der das Protein eine gestreckte Form einnimmt und kein Ligand gebunden ist, und eine geschlossene, bei der die beiden Domänen den Liganden zwischen sich einschließen (Quioco *et al.*, 1996).

Die löslichen Rezeptorproteine binden ihren jeweiligen Liganden mit einem zumeist im mikromolaren Bereich angesiedeltem K_d -Wert und leiten ihn an einen membranständigen Proteinkomplex weiter, über welchen er schliesslich unter ATP-Hydrolyse ins Cytoplasma transportiert wird (Boos und Lucht, 1996).

Im Falle des Histidintransport besteht dieser Komplex aus den Untereinheiten HisQ, HisM und HisP, über die das Histidin unter ATP-Hydrolyse durch die Cytoplasmamembran geschleust wird (Liu und Ames 1996). Dies ist schematisch in Abb. 4 dargestellt.

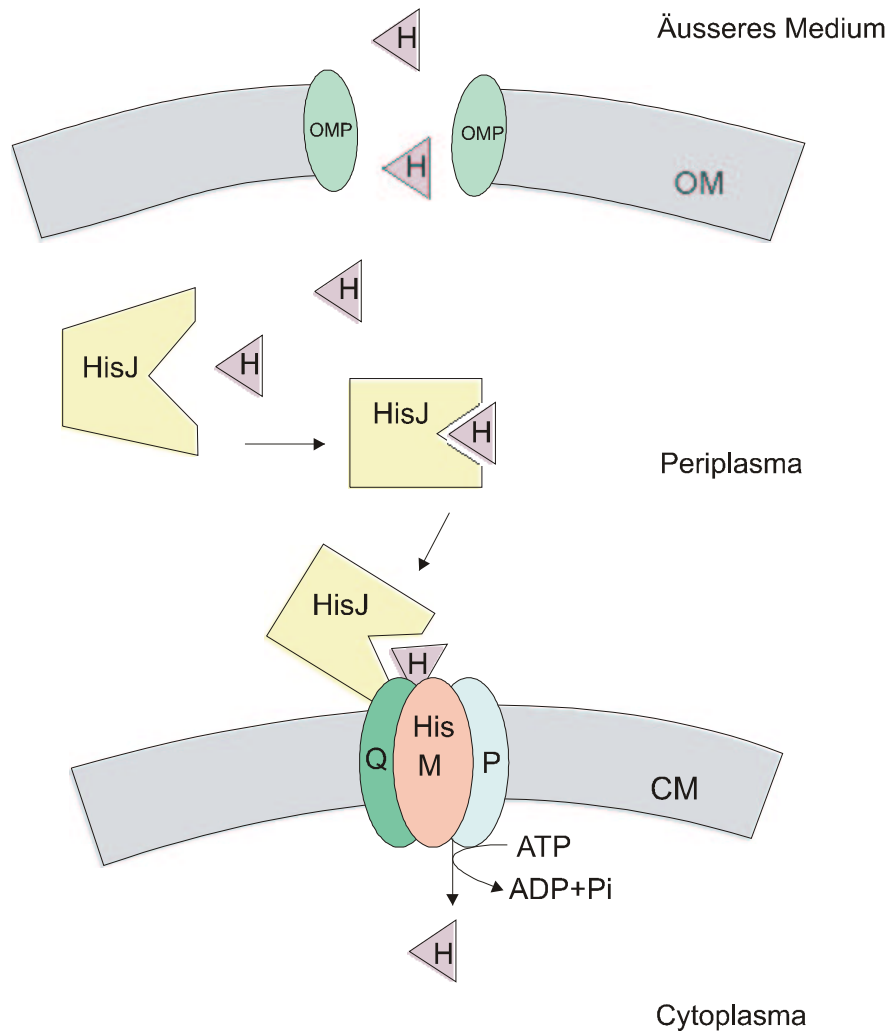


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Transportes von Histidin ins Zellinnere von *E. coli*. Histidin (H) diffundiert frei durch die in der äusseren Membran (OM) befindlichen Poren (OMP: *Outer Membrane Pore*). Im Periplasma wird es vom Histidin-Bindeprotein (HisJ) gebunden und an einen membranständigen Proteinkomplex, bestehend aus HisQ, HisM und HisP weitergeleitet. Über diesen Proteinkomplex wird das Histidin unter ATP-Hydrolyse durch die Cytoplasmamembran (CM) ins Innere der Bakterienzelle transportiert.

HisJ besteht aus 238 Aminosäuren und gehört mit einer relativen Molmasse von 26100 Da zu kleineren Rezeptorproteinen, wodurch es einfach zu handhaben sein sollte. Die Kristallstruktur des HisJ wurde im Komplex mit L-Histidin mit einer Auflösung von 1,89 Å durch die „*Molecular Replacement*“-Technik geklärt (Yao *et al.*, 1994). Eine Darstellung des Hauptkettenverlaufs von HisJ im Komplex mit L-Histidin ist in Abb. 5 gezeigt.

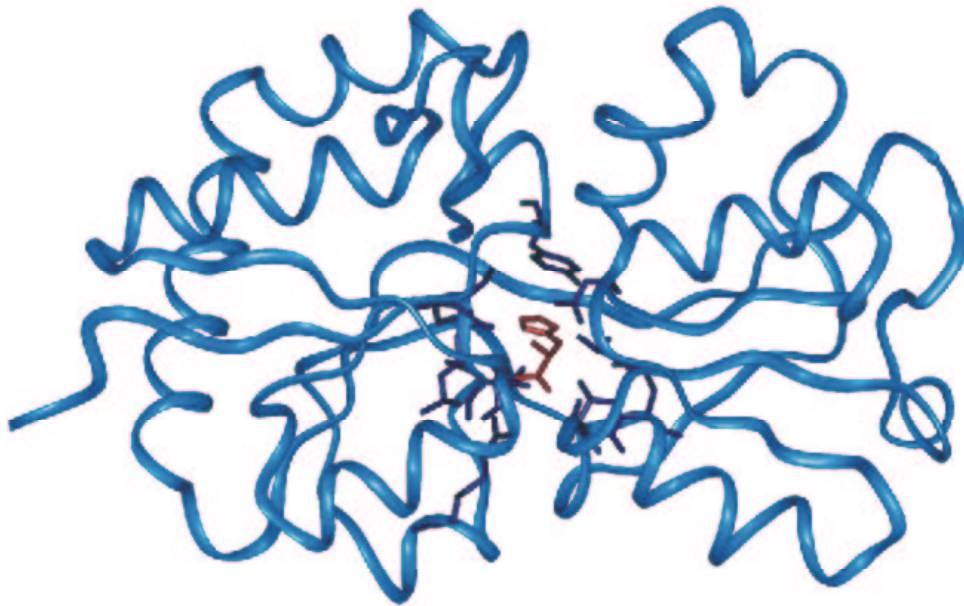


Abbildung 5: Darstellung des Hauptkettenverlaufs von HisJ mit ausgewählten Seitenketten (den an der Bindung es Histidins beteiligten Aminosäuren sowie des gebundenen Histidins). Die Abbildung wurde mit dem InsightII-Programm ausgehend von der von Yao *et al.*, (1994) gelösten Kristallstruktur von HisJ erstellt. Die an der Bindung des Histidins beteiligten Aminosäuren der sind dunkelblau, das gebundene Histidin rot dargestellt.

HisJ setzt sich aus zwei globulären Domänen zusammen, der Domäne I (Aminosäuren 1-86 und 197-238) und der Domäne II (Aminosäuren 90-192), zwischen denen sich die Ligandenbindungsstelle für das L-Histidin befindet. Die Aminosäuren 87-89 und 193-196 bilden ein zweisträngiges β -Faltblatt aus, welches als Scharnier zwischen den Domänen die mit dem Binden des L-Histidins einhergehende Konformationsänderung des HisJ vermittelt (Oh *et al.*, 1994). Das HisJ bildet eine ellipsoide Form mit den Abmessungen 60 x 45 x 40 Å.

Abb. 6 zeigt eine Darstellung der an der Bindung des Histidins beteiligten Aminosäurereste mit gebundenem Histidin sowie der bei der Bindung des Histidins ausgebildeten Wasserstoffbrücken.

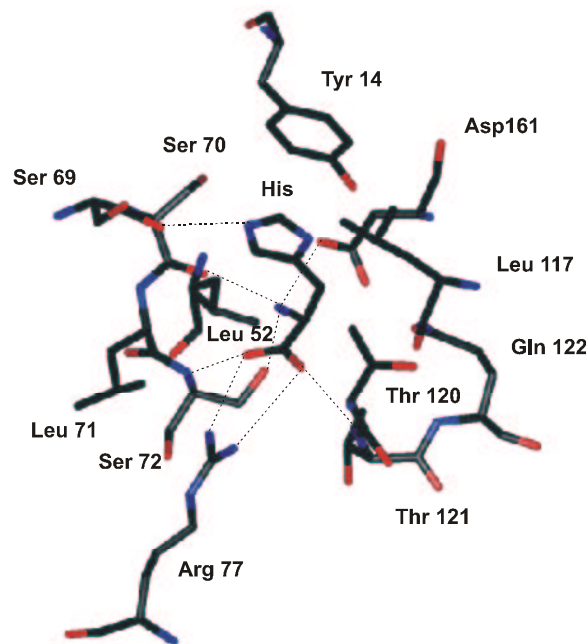


Abbildung 6: Darstellung der an der Bindungstasche des HisJ mit gebundenem Histidin (His) (nach Yao *et al.*, (1994), modifiziert). Dargestellt sind die an der Bindung des Histidins beteiligten Aminosäuren und die wichtigsten von ihnen zum Histidin ausgebildeten Wasserstoffbrücken, ausserdem ist ihre Position im HisJ angegeben. Kohlenstoffatome sind schwarz, Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome blau dargestellt.

An der Bindung des HisJ sind zwölf Aminosäurereste beteiligt. In der Domäne I sind das die sieben Aminosäuren Y14, L52, S69, S70, L71, S72 und R77 in der Domäne II die verbleibenden fünf Aminosäuren L177, T120, T121, Q122 und D161. Bei der Bindung des Histidins werden insgesamt 10 Wasserstoffbrücken, zwei Salzbrücken und 63 van der Waals Kontakte zum HisJ ausgebildet. Das Tyr14 ist am stärksten in die Histidin-Bindung involviert, es interagiert alleine mit sieben Atomen des Histidins, außerdem bildet sein aromatischer Ring starke hydrophobe Kontakte zu dem Imidazolring des Histidins aus. Die α -Amino- und die Carboxygruppe des Histidins bilden Salzbrücken mit ungepaarten geladenen Resten des HisJ (Arg77 und Asp161) aus, die Seitenkette des Histidins tritt jedoch nicht in Wechselwirkung mit einem negativ geladenen Rest des HisJ (Yao *et al.*, 1994).

Messungen der Bindung des L-Histidins, die am Histidin-Bindeprotein aus *Salmonella typhimurium* durchgeführt wurden, ergaben einen K_d -Wert von 3×10^{-8} M, eine Assoziationskonstante k_{on} von $10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und eine Dissoziationskonstante k_{off} von $9,7 \text{ s}^{-1}$. (Miller *et al.*, 1983).

Will man das HisJ als konstantes Modul innerhalb eines auf dem ToxR-System basierenden Verfahren zur Rezeptor-Ligandenwechselwirkung verwenden, ist es notwendig, seine Bindungseigenschaften dahingehend zu verändern, dass es anstelle von

Histidin eine abiotische Substanz hochaffin bindet, da das Tox-System in lebenden Zellen Anwendung findet und natürlicherweise frei vorliegendes Histidin den Assay durch Interaktion mit HisJ negativ beeinflussen kann. Die hierfür nötigen Veränderungen der Bindungseigenschaften des HisJ sollen durch Austausch der an der Ligandenbindung beteiligten Reste vorgenommen werden.

In ersten Experimenten, die Gegenstand dieser Dissertation sind, soll zunächst untersucht werden, ob Modifikationen der Bindungstasche des HisJ ohne drastische Einbuße der Stabilität und generellen Funktionsweise des Proteins toleriert werden und ob durch möglichst geringere Veränderung der Bindungstasche (z.B. den Austausch eines einzigen Restes) die Bindungseigenschaften des HisJ deutlich verändert werden können. Daher ist es ein wesentliches Thema dieser Dissertation die gezielte Generierung einer HisJ-Variante mit gegenüber dem Wildtypprotein veränderten Bindungseigenschaften. Weiterhin soll diese HisJ-Variante hinsichtlich ihrer Faltungstabilität und ihren Bindungseigenschaften charakterisiert und mit dem wt-HisJ verglichen werden.

1.4 Auswahl eines geeigneten, homodimerisierenden Proteins für die Untersuchung zur ligandenvermittelten Dimerstabilisierung: der GCN4-Leucinzipper aus *S. cerevisiae*

Für die Entwicklung eines genetischen Schalters zur gezielten Genexpression soll als Rezeptorkomponente ein Protein ausgewählt werden, welches natürlicherweise stabile Homodimere ausbildet. In dieser Fähigkeit soll es durch gezielte Modifikation der Interaktionsfläche eingeschränkt werden, und zwar durch Einführung einer Lücke in der Kontaktfläche zweier Proteinmoleküle. Um möglichst sicher vorhersagen zu können, welche Modifikationen für diesen Zweck geeignet sind, sollte es sich um ein Protein handeln, bei dem der Mechanismus der Homodimerisierung gut charakterisiert und verstanden ist. Ausserdem sollte das Protein einfach zu handhaben und gut in *E. coli* exprimierbar sein. Ein solches Protein stellt der GCN4-Leucinzipper aus *Saccharomyces cerevisiae* dar. Es handelt sich dabei um einen Transkriptionsaktivator, der im Wesentlichen an der Regulierung der Expression der für die Aminosäuresynthese zuständigen Enzyme beteiligt ist (Mitchell & Magasanik, 1984). In seiner Funktion als Transkriptionsaktivator bindet GCN4 unter Formierung eines stabilen Homodimers (Ellenberger *et al.*, (1992) Promotorbereiche mit der Konsensussequenz 5'-TGACTC-3' (Arndt & Fink, 1986) und aktiviert die Transkription der unter Kontrolle dieser Promotoren stehenden Gene durch Interaktion mit diversen Transkriptionsfaktoren (Singer *et al.*, 1990; Mahadevan & Stuhl, 1990; Ponticelli & Struhl, 1990).

GCN4 besteht insgesamt aus 281 Aminosäuren und ist aus mehreren Bereichen unterschiedlicher Funktion aufgebaut. Hope *et al.*, (1988) zeigten, dass ein N-terminaler Bereich hoher negativer Nettoladung, der die Aminosäuren 107-146 umfasst, essentiell für die transkriptionsaktivierende Funktion des GCN4 ist. Der Bereich, der die Aminosäuren

230-245 umfasst, und der reich an basischen Aminosäureresten ist, konnte als die DNA-bindende Komponente des GCN4 identifiziert werden (Hope *et al.*, 1986). Für die Ausbildung des GCN4-Homodimers sind die 33 C-terminalen Resten (Aminosäuren 248-281) zuständig (Pu & Struhl, 1993). Der DNA-bindende und der dimerisierende Bereich bilden eine α -Helix aus, wobei die Dimerisierung über ein Leucinheptadenmotiv vermittelt wird: an jeder siebten Position im Dimerisierungsbereich befindet sich ein Leucinrest. Über hydrophobe Kontakte dieser Leucinreste ordnen sich die α -helicalen Strukturen zweier GCN4-Moleküle parallel zueinander an und bilden so ein stabiles Homodimer aus (O'Shea *et al.*, 1989). Das dabei entstehende charakteristische Strukturmotiv wird als *coiled-coil* bezeichnet. Die Struktur des C-terminalen Anteils, bestehend aus dem DNA-bindenden Bereich im Komplex mit Promotor-DNA und dem Leucinheptadenmotiv wurde von Ellenberger *et al.*, (1992) röntgenkristallographisch aufgeklärt, eine Darstellung desselben ist in Abb. 7 gezeigt.

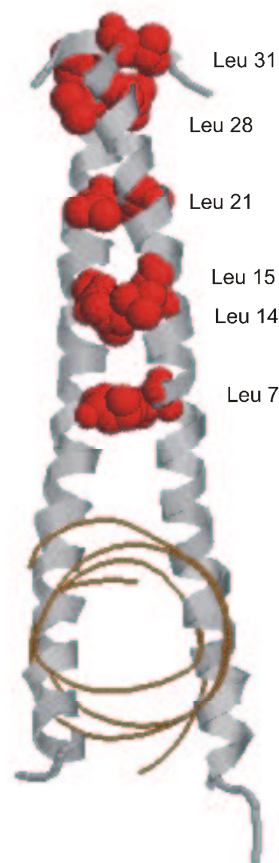


Abbildung 7: Darstellung des GCN4-Leucinzipperhomodimers aus *S. cerevisiae* (basierend auf der von Ellenberger *et al.*, (1992) gelösten Kristallstruktur. Das GCN ist als Bändermodell dargestellt, die für die Homodimerisierung relevanten Leucinreste, an jeder siebten Position sind in Form von Kalottendarstellungen und roter Färbung hervorgehoben. Die gebundene DNA ist orange gefärbt.

Deutlich hervorgehoben sind die für die Homoimerisierung zweier GCN4-Moleküle relevanten Leucinreste an jeder siebten Position im Leucinheptadenmotiv.

Hu *et al.*, (1990) konnten über Mutationsanalysen zeigen, dass sich an wenigstens an zwei Positionen des Heptadenmotivs ein Leucinrest befinden muss, um die Ausbildung eines stabiles Homodimers zu gewährleisten. Dies legt den Schluss nahe, dass Austausch eines oder mehrerer Leucinreste des Heptadenmotivs zur Destabilisierung des Dimers führen. Im Rahmen dieser Dissertation wurden anhand eines Fragmentes des GCN4, das nur die Aminosäuren 247-281, also das für die Dimerisierung zuständige Leucinheptadenmotiv, umfasst, solche Austausche vorgenommen und die so generierten GCN-Varianten auf ihre Fähigkeit zu homodimerisieren getestet. Weiterhin wurde eine Bibliothek niedermolekularer Substanzen mittels Tox-Assay auf eine Verbindung durchmustert, die in der Lage ist, die Homodimerisierung dieser GCN4-Varianten signifikant zu stabilisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

Escherichia coli:

Chr3 (Gurezka & Langosch, 2001)

[F⁻, *endA1*, *hsdR17*, (*r_{km}⁻*), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA96(Nal^r)*, *relA1*, Δ (*lacZYAargF*)
U196, Φ 80*lacZ* Δ *M15 attB(bla, ctx::cat)*]

DH5 α (Hanahan, 1983)

[F⁻, *endA1*, *hsdR17*, (*r_{km}⁻*), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA96(Nal^r)*, *relA1*, Δ (*lacZYAargF*)
U196, Φ 80*lacZ* Δ *M15*]

FHK 12 (Kolmar *et al.*, 1995a)

[*ara*, Δ (*lac-proAB*), *rpsL*, *thi*; (Φ 80 *lacZ* Δ *M15*), *attB(bla, ctx::lacZ)*; F' *lacZ* Δ *M15, pro*
A⁺B⁺]

HS 3018 (Shuman, 1982)

[*MC 4100*, *malT^C-1*(F⁻, (*argF-lac*)*U169*, *araD139*, *rpsL150*, *ptsF25*, *flbB5301*, *rbsR*, *deoC*,
relA1), *malT^C-1*, Δ *malE444*]

2.1.2 Oligodesoxyribonukleotide (relevante Schnittstellen sind unterstrichen, mutierte Codons fett dargestellt).

2.1.2.1 Oligonukleotide als Primer für die Genamplifikation

HisJdown 5'-GACCGCAGGCTTCAGCTGGGGCGATTCCGCAGAAC-3'

HisJ6HUp

5'-GGCCCAAAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGATCTGCCACCATAAAC
ATCAAA-3'

HisJBglup 5'-GGCCCAAGATCTGCCACCATAAACATCAAA-3'

LAOdown 5'-GACCGCAGGCCTCAGCTGGGGCGCTACCGGAGACGG-3'

LAOup 5'-GCCAGCAGATCTGTCACCGTAGACATTAAGTCG-3'

ToxCATGCNdown 5'-CGAAAGCCGAATTCTTTGGC-3'

ToxCATGCNup 5'-GGTCGACCTCGAGAAGCTTTTAGCGTTCGCCAAC-3'

2.1.2.2 Oligonukleotide als Primer für die Sequenzanalyse

pASKdown	5'-CGTGGCGAATAAATCGGCTC-3'
pASKup	5'-GACAGCTATCGCGATTGCAG-3'
pHKToxdown	5'-CGTGGCGAATAAATCGGCTC-3'
pHKToxup	5'-TTTCACCAGCGTTTCTGGG-3'
ToxCATdown	5'-CGAAAGCCGAATTCTTTGGC-3'
ToxCATup	5'-GGTCGACCTCGAGAAGCTTTTAGCGTTCGCCAAC-3'

2.1.2.3 Oligonukleotide als Primer für die Mutagenese

HisJL52F

5'-GCTTCGATATCGATCTGGCAAAGGAATTATGCAAACGCATCAATACGCAAT
GTACGTTTGTGCGAAAATCCGTTTGATGCGTT-3'

GCNL5Gdown 5'-GCAAAGAATGAAACAAGGTGAAGACAAGGTTGAAG-3'

GCNL5Gup 5'-CTTCAACCTTGTCTTCACCTTGTTTCATTCTTTGC-3'

GCNAladown 5'-CAAGGTTGAAGAAGCTGCTTCGAAAAATTATC-3'

GCNAlaup 5'-GATAATTTTTCGAAGCAGCTTCTTCAACCTTG-3'

2.1.3 Vektoren

pASKHisJ6H

Der zur periplasmatischen Expression des HisJ verwendete Vektor pASKHisJ basiert auf dem Vektor pASK75 (Skerra, 1994), der neben dem regulierbaren Tetracyclin Promotor zwei Ribosomenbindestellen besitzt, die eine effiziente Initiation der Transkription gewährleisten. Die dem *hisJ*-Gen vorgeschaltete *ompA*-Signalsequenz gewährleistet die Translokation der Polypeptidkette ins Periplasma, der C-terminale Hexa-Histidintag die Reinigung des Proteins mittels IMAC.

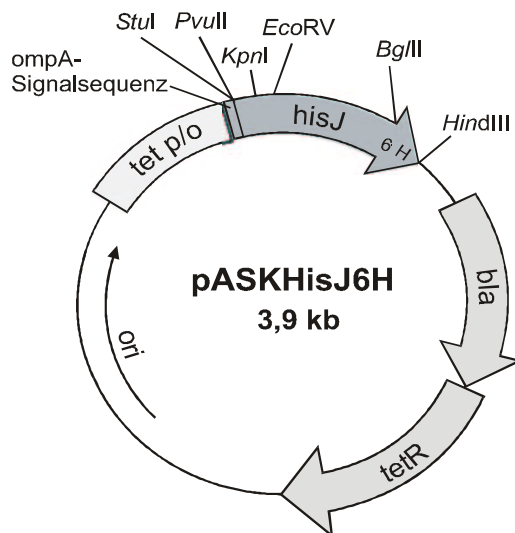


Abbildung 8: Physikalische und genetische Karte des Vektors pASKHisJ6H. Bezeichnungen: tetP/O: Tc Promotor/Operator Region; *tetR*: kodierender Bereich für den Tetracyclin Repressor; *hisJ*: Gen für das Histidin-Bindeprotein; *ompA*: Region aus 90 bp, die für die OmpA-Signalsequenz kodieren, welche die Translokation der Polypeptidkette ins Periplasma bewerkstelligt; 6H: Region aus 18 bp, die für sechs Histidinreste kodieren, dahinter befindet sich ein *Ochre*-Stopcodon; *bla*: für die β -Lactamase codierende Sequenz; *ori*: Replikationsursprung; eingezeichnete sind des Weiteren die für die Arbeit relevanten Schnittstellen.

Weitere pASK-Vektoren für die Proteinexpression:

- pASKHisJ^{L52F}6H (trägt anstelle des *hisJ*-Gens zwischen den Schnittstellen *PvuII* und *BglII* das Gen für *hisJ*^{L52F}, welches dem *hisJ*-Gen entspricht, wobei es an der für Position #52 kodierenden Stelle das Kodon *ttt* für Phenylalanin anstatt *ctg* für Leucin trägt)
- pASKLAO6H (trägt anstelle des *hisJ*-Gens zwischen den Schnittstellen *PvuII* und *BglII* das für LAOBP kodierende Gen *argT*)

pHKToxR'HisJ

Zur Messung der ToxR'-vermittelten Transkriptionsaktivierung im Zell-Lysat des *E. coli*-Stamms FHK12 anhand der β -Galaktosidase-Aktivität wurde dieses Phasmid eingesetzt. Es wurde ausgehend von dem Phasmid pHKToxR'REIBla (Kolmar *et al.*, 1994) konstruiert, indem das *rei*-Gen gegen das *hisJ*-Gen ausgetauscht wurde. Die Expression in FHK12 resultiert in einem bibartitem Fusions-Protein bestehend aus ToxR' und HisJ.

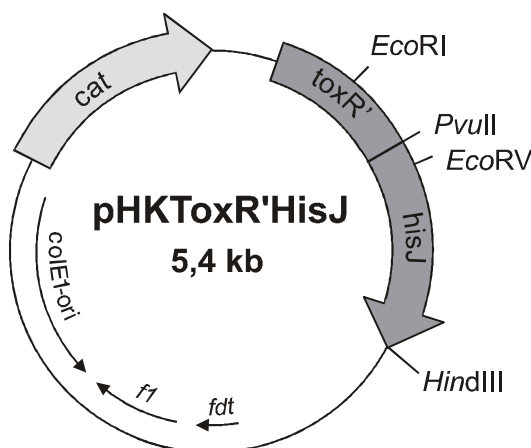


Abbildung 9: Physikalische und genetische Karte des Vektors pHKToxR'HisJ. Bezeichnungen: *toxR'*: Nukleotide -195 bis +630 (bezogen auf den Translationsstart) des *toxR*-Gens aus *Vibrio cholerae*; *hisJ*: Gen für das Histidin-Bindeprotein mit *Amber*-Stopcodon; *cat*: Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase; *colE1*: Replikationsursprung; *f1*: Replikationsursprung des Phagen f1; *fdT*: Transkriptionsterminatoren des Phagen fd; eingezeichnet sind des Weiteren die für die Arbeit relevanten Schnittstellen.

PHKToxR'HisJGCN

Dieser Vektor wurde für Dimerisierungsstudien von HisJ über eine Proteinkomponente (den Leucinzipper GCN4 aus *Saccharomyces cerevisiae*) mittels β -Galaktosidase-Assays eingesetzt. Dieser Vektor unterscheidet sich von dem Vektor pHKToxR'HisJ dadurch, dass er C-terminal des *hisJ*-Gens die für den GCN4-Leucinzipper aus *Saccharomyces cerevisiae* codierende Sequenz mit *Amber*-Stopcodon besitzt. Expression in FHK12 resultiert in einem tripartiten Fusionsprotein bestehend aus ToxR', HisJ und GCN.

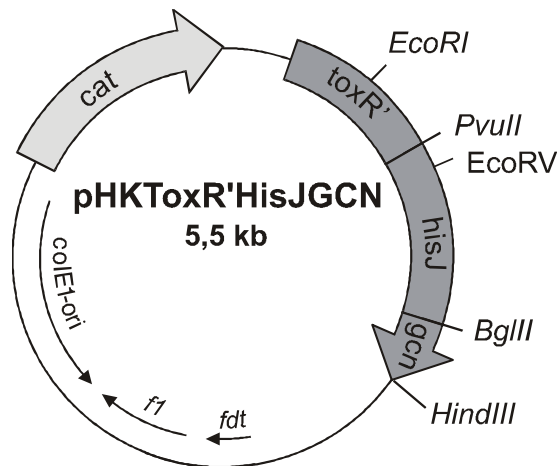


Abbildung 10: Physikalische und genetische Karte des Vektors pHKToxR'HisJGCN. Bezeichnungen: *toxR'*: Nukleotide -195 bis +630 (bezogen auf den Translationsstart) des *toxR*-Gens aus *Vibrio cholerae*; *hisJ*: Gen für das Histidin-Bindeprotein; *gcn*: codierende Sequenz für den GCN4-Leucinzipper aus *Saccharomyces cerevisiae* mit *Amber*-Stopcodon; *cat*: Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase; *colE1*: Replikationsursprung; *f1*: Replikationsursprung des Phagen f1; *fdT*: Transkriptionsterminatoren des Phagen fd; eingezeichnet sind des Weiteren die für die Arbeit relevanten Schnittstellen.

Weitere pHKToxR'-Vektoren für β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmungen

Als Kontrollen bei β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmungen wurden folgende Vektoren eingesetzt, welche (soweit nicht anders vermerkt) von Kolmar *et al.*, (1995b) konstruiert wurden:

- **pHKToxR'MalE**; MalE bezeichnet das Maltose-Bindeprotein aus *E. coli*)
- **pHKToxR'MalEGCN**
- **pHKToxR'REIT39K** (Kolmar *et al.*, 1995a)
- **pHKToxR'HisJGCN^{L5G}** (entspricht dem Plasmid pHKToxR'HisJGCN, allerdings trägt das Gen für den GCN4-Leucinzipper an der für die Position #7 kodierenden Stelle das Kodon GGT für Glycin anstatt CTT für Leucin)
- **pHKToxR'HisJGCN^{Ala}** (entspricht dem Plasmid pHKToxR'HisJGCN, allerdings trägt das Gen für den GCN4-Leucinzipper an den für die Positionen #14 und #15 kodierenden Stellen das Kodon GCT für Alanin anstatt TTG bzw. CTT für Leucin)

ToxIVBKIIHisJGCN

Dieser Vektor wurde für *in vivo*-Dimerisierungsstudien von ToxR'-Fusionsproteinen über Vermittlung von Resistenz gegen Chloramphenicol im Reporterstamm Chr3 (TOXCAT-Assay) eingesetzt. Er wurde ausgehend von dem Plasmid ToxIVBKII Δ MalEMyc (Gurezka & Langosch, 2001) konstruiert, indem über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* *malEmyc* gegen *hisJgcn* ausgetauscht wurde. Expression in Chr3-Zellen resultiert in einem tripartiten Fusionsprotein, bestehend aus ToxR', HisJ und dem GCN4-Leucinzipper. Die Expression dieses Fusionsproteins steht unter Kontrolle des *pBad*-Promotors, die Transkription ist in konzentrationsabhängiger Weise mit Arabinose induzierbar. Der Vektor enthält ausserdem das *araC*-Gen, welches für das Arabinose Operon Regulator Protein kodiert, das in Abwesenheit von Arabinose als Repressor, in Anwesenheit von Arabinose als Aktivator der Expression von unter Kontrolle des *pBad*-Promotors stehenden Genen fungiert, sowie ein *kan*-Gen zu Vermittlung von Kanamycinresistenz.

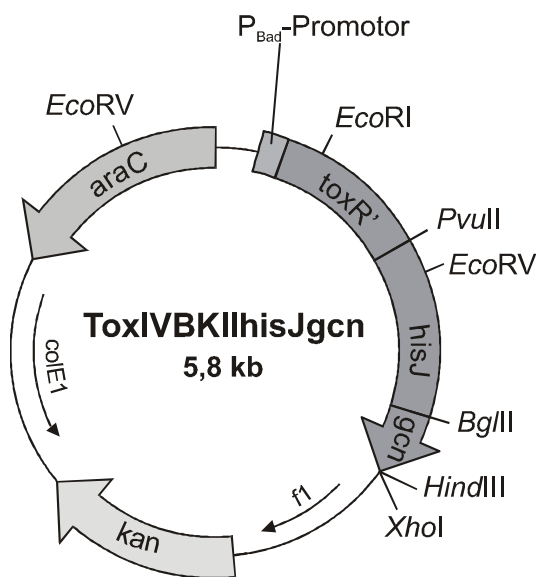


Abbildung 11: Physikalische und genetische Karte des Vektors ToxIVBKIIhisJgcN. Bezeichnungen: *toxR'*: Nukleotide -195 bis +630 (bezogen auf den Translationsstart) des *toxR*-Gens aus *Vibrio cholerae*; *hisJ*: Gen für das Histidin-Bindeprotein; *gcn*: codierende Sequenz für den GCN4-Leucinzipper aus *Saccharomyces cerevisiae* mit Amber-Stopcodon; *P_{Bad}*: Arabinose-induzierbarer Promotor; *araC*: codierende Sequenz für das Arabinose Operon Regulator Protein *kan*: Gen für die Aminoglycosid-3' Phosphotransferase Agp3 zur Vermittlung von Kanamycinresistenz; *colE1*: Replikationsursprung; *f1*: Replikationsursprung des Phagen f1; eingezeichnet sind des Weiteren die für die Arbeit relevanten Schnittstellen.

Weitere ToxIVBKII-Vektoren für den TOXCAT-Assay

Folgende Vektoren wurden ebenfalls für Dimerisierungsstudien von ToxR'-Fusionsproteinen mittels TOXCAT-Assay verwendet. Sie wurden alle ausgehend von ToxIVBKIIHisJGCN konstruiert, indem die entsprechenden (Fusions-) Gene über einen Kassettenaustausch zwischen den Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* in den Vektor inkloniert wurden:

- ToxIVBKIIHisJ
- ToxIVBKIIHisJGCN^{L5G}
- ToxIVBKIIHisJGCN^{Ala}

2.1.4 Cemikalien

AMERSHAM, Braunschweig:

BIOMOL, Hamburg: 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat *p*-Toluidinsalz (BCIP); Isopropyl- β -D-thio-Galactopyranosid (IPTG)

BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim: Adenosin-5'-triphosphat (ATP); Ampicillin (Natriumsalz), 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

FLUKA; Neu-Ulm: Bromphenolblau; Dimethylsulfoxid (DMSO); Glycerin; β -Mercaptoethanol; Saccharose

HARTMANN-ANALYTIC; Braunschweig: [2,5-³H]-L-Histidin, [2,3-³H]-L-Arginin, [4,5-³H]-L-Lysin

NATIONAL DIAGNOSTICS, Simerville, New Jersey, USA: PROTOGEL™ vorgemischtes Acrylamid/Bisacrylamid (30% : 0,8%); SEQUAGEL™; SEQUAGEL COMPLETE™

OXOID, Wesel: Bacteriological Agar

PACKARD; Meriden: Tri-Carb© Liquid Scintillation Analyzer

RIEDEL-DE HAEN, Seelze: Ammoniumacetat; Chloroform; Ethanol; Kaliumacetat; Methanol; konzentrierte Salzsäure

ROTH; Karlsruhe: Szintillatinsröhrchen

SREVA, Heidelberg: Dithioreitol (DDT); Etylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA); atriumdodecylsulfat (SDS); N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

SIGMA, Deisenhofen: Chloramphenicol; Coomassie Brilliant Blue G250; Ethidiumbromid; O-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG); 4-Nitrotetrazoliumchlorid-blau (NBT) Ponceau-S-Concentrate™; Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris); Triton X-100; TWEEN 20 (Polyoxyethylen-sorbitan-Mono-Laureat); L- β -Imidazolylmilchsäure; L-Histidinamid

ZINSSER ANALYTIC, Berkshire: Quicksafe A Scintillation Liquid

2.1.5 Proteine und Enzyme

5 PRIME → 3 PRIME INC., Boulder, USA: Rabbit Anti-Ampillicinase

Antikörper gegen HisJ (polyklonales anti-rabbit Serum): zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Ames, Berkeley, Kalifornien, USA

BIO-RAD, München: Molmassenstandard für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page Molecular Weight Standard, Low Range): Rabbit muscle phosphorylase B (97400 Da), Bovine serum albumine (66200), Hen egg white ovalbumine (45000 Da), Bovine carbonic anhydrase (31000 Da), Soybean trypsin inhibitor (21500 Da), Hen egg white lysozyme (14400 Da), Bovine pancreas aprotinin (6500 Da)

BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim: Restriktionsendonukleasen, Ribonuklease A (Rnase A); T4 DNA-Ligase;

EPICENTRE, Madison, USA: Tfl-Polymerase

LABOREIGENE Produktion:

NESTLÉ DEUTSCHLAND AG, Frankfurt a.M.: Glücksklee Magermilchpulver

SERVA, Deisenhofen: Albumin aus Rinderserum (BSA)

SIGMA, Deisenhofen: Anti-Kaninchen-IgG-Ziegenantiserum, alkalische Phosphatase konjugiert; Anti-Maus-IgG-Ziegenserum, Biotin-konjugiert; Anti-Kaninchen-IgG-Ziegenserum, Biotin-konjugiert; Streptavidin, alkalische Phosphatase konjugiert

2.1.6 Weitere Geräte und Materialien

AMICON GmbH, Witten: Ultrafiltrationsröhrchen Centriprap 10 und Centricon 10

AMICON SLM, Urbana, Illinois, USA: French Pressure Cell Press

GENOMED GmbH, Bad Oeynhausen: JETSTAR™ Plasmid Kit

GIBCO/BRL, Eggenstein: Agar Bacteriological Grade; Trypton; Hefe Extrakt

GREINER, Nürtingen: Petrischalen; Röhrchen

HARVARD BIOSCIENCE, Holliston: DispoEquilibrium Dialyzer™

HEINEMANN, Schab. Gmünd: Ultraschallgerät Branson Sonifier W-250

HELMA, Mühlheim/Baden: Quarzküvetten

HERAEUS, Hamburg: Biofuge fresco und pico, Tischzentrifugen

HETTICH, Tuttlingen: Kühlzentrifuge Roto Silenta/RP

HITACHI, Tokio, Japan: Fluoreszenz Spektrophotometer Modell F-4500

INGOLD, Steinbach: pH-Elektrode U402-M5

JANDEL SCIENTIFIC, Erkrath: Sigma Plot® für Windows™ 5.0

MILLIPORE, Eschborn: Filtereinheiten Millex FG13 und Ultrafree®-20 Nanopore-Wasser-Anlage

MJ RESEARCH, Watertown, USA: „Minicycler™“; „Chill-out 14“ Flüssigwachs

NUNC, Wiesbaden: *Micro-Well* 96-Loch Mikrotiter-Platten

PHARMACIA/LKB; Freiburg: Elektrophorese-Stromversorger ECPS 3000/150; NOVA-BLOT elektrophoretische Transfer Apperatur, FPLC-Anlage mit Probeninjektor AUTOSAMPLER Typ 2157;

SARTORIUS, Göttingen: Minisart® NML Sterilfilter

SAVANT INSTRUMENTS, Farmingdale, NY: Speedvac Concentrator SVC 100H

SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel: Nitrocellulose-Membranen (0,45 µm); 3 mm Filterpapier; Einmalfiltrationsgerät VACUFLOW

SERVA, Heidelberg: Visking Dialyseschläuche 20/32 (6 mm)

SLT LABINSTRUMENTS, Crailsheim: ELISA-Reader 340 ATTC

SORVALL, Bad Nauheim: Zentrifuge RC-5C, Rotortypen SS34, GSA

2.1.7 Puffer und Lösungen:

D-Arabinose: 10%, autoklaviert

APS-Stammlösung: 25% APS, frisch angesetzt

BCIP-Stammlösung: 50 mg/ml in Dimethylformamid

Blocklösung: 5 % (w/v) Milchpulver in PBS

Dialysepuffer: 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,7

E1-Puffer (Jetstar™): 50 mM Tris/HCl, 10mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase

E2-Puffer (Jetstar™): 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS

E3-Puffer (Jetstar™): 3,2 M Kaliumacetat/Essigsäure, pH 5,0

E4-Puffer (Jetstar™): 600 mM NaCl, 100 mM Kaliumacetat/Essigsäure, pH 5,0, 0,15% Triton X-100

E5-Puffer (Jetstar™): 800 mM NaCl, 100 mM Kaliumacetat/Essigsäure, pH 5,0

E6-Puffer (Jetstar™): 1,25 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5

Ethidiumbromid-Lösung: 1 mg/ml Ethidiumbromid

Formamid-Farbmarker: 100 ml Formamid, 0.1 g Bromphenolblau, 0.1 g Xylencyanol FF, 2 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0

Glasmilch-Suspension: 2 µg DNA/µl Glasmilch Bindungskapazität

Gleichgewichtsdialysepuffer: 10 mM Natriumphosphat, 200 mM NaCl, pH 7,2

Harnstoffproteinprobenpuffer: 8 M Harnstoff, 200 mM tris-HCl, 200 mM DDT, 2 % (w/V) SDS, 0,005 % Bromphenolblau

IMAC-Elutionspuffer: 25 mM; 50 mM; 75 mM; 80 mM, 90 mM, 100 mM; 125 mM, 150 mM; 175 mM, 200 mM; 250 mM und 300 mM Imidazol in IMAC Startpuffer, pH 7,4

IMAC-Startpuffer: 20 mM Na₂PO₄, 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,4

Low Marker: 10 µl Low Marker (BIO-RAD), 90 µl H₂O, 100 µl Proteinprobenpuffer; vor dem Auftragen für 5 min auf 99°C erhitzt.

Lysispuffer: 0,1 M Tris-HCl, 0,2 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 bei 4°C

IPTG-Stammlösung: 1 M IPTG in Wasser, sterilfiltriert.

Kaliumphosphatpuffer: 10 mM, pH 6,7

NaJ-Lösung zur Reinigung von DNA über Glasmilch: 6 M NaJ, 0.12 M Na₂SO₃, filtriert und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

NBT-Stammlösung: 75 mg/ml in 70% Dimethylformamid

PAGE-Laufpuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

PAG-Entfärbelösung I: 50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure

PAG-Entfärbelösung II: 10% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Essigsäure

PAG-Färbelösung: 0,2% (w/v) Coomassie G250 und R250, gelöst in 50% Ethanol, 10% Eisessig, die Lösung wurde filtriert und lichtgeschützt bei RT gelagert

PBS-Puffer: 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄

PBS-Tween-Puffer: PBS-Puffer mit zusätzlich 0,05% (v/v) Tween 20

PCR-dNTP-Stammlösung (10x): je 2 mM dNTP (N = A, C, G, T); mit 50 mM Tris-Base auf pH 7.0 eingestellt.

Polymerase-Mix (1x): 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 20 mM HEPES, 3 mM DTT, 12 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP (N = A, C, G, T), 1 mM ATP.

Reaktionspuffer für antikörpergekoppelte Alkalische Phosphatase: 0,1 M Tris-HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂

Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (FERMENTAS):

Blau: 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂.

Grün: 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl.

Orange: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl.

Rot: 10 mM Tris/HCl, pH 8.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl.

Gelb: 33 mM Tris-Acetat, pH 7.9, 10 mM Mg-Acetat, 66 mM Kaliumacetat.

Resuspendierungs-Puffer: 0,2 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA, 20% (w/v) Saccharose, pH 9,0 bei 4 °C

RNaseA-Stammlösung: 10 mg/ml RNase, 10 mM Tris/HCl, 15 mM NaCl, pH 7.5; die Lösung wird 20 min auf 100°C erhitzt, langsam auf RT abgekühlt und bei 4°C gelagert.

Schockpuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 4°C

Sucrosefarbmarker: 60% Sucrose, 0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylencyanol FF in TAE-Puffer.

T4 DNA-Ligase-Puffer (10x): 5 x KGB, 40% PEG, 1 mg/ml BSA, 6 mM ATP

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7.4.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0.

Transferpuffer für Western-Blots: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol

Western-Blot-Reaktionspuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂. Unmittelbar vor Gebrauch wurden zu 12,5 ml des Stammpuffers 6,5 µl NBT-

Waschpuffer für Glasmilch: 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 50 % Ethanol.

Z-Puffer: 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1mM MgSO₄, 38,7 mM β-Mercaptoethanol

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Puffer und Lösungen mit demineralisiertem Wasser (MILLIPORE, 'Nanopore'-Wasseranlage) angesetzt.

2.1.8 Nährmedien

dYT-Medium: 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 1 Liter Wasser

Antibiotika-Platten: 10 g Typton, 5g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar, 1 Liter Wasser, entsprechende Menge des Antibiotikums.

Nach 20 min autoklavieren werden 1ml Chloramphenicolstammlösung (25 mg/ml in EtOH).

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Vermehrung und Lagerung von *Escherichia coli*-Stämmen

E. coli-Stämme wurden bei 37°C in dYT-Medium vermehrt, welches bei plasmidtragenden Bakterien mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde. Um eine gute Luftzufuhr zu gewährleisten, wurden Kulturen bis zu 5 ml Volumen im Reagenzglas gerollt. 50 ml-Kulturen wurden bei 150 Upm geschüttelt.

Das Wachstum der Zellen wurde, wenn notwendig, durch Trübungsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) gegen Medium verfolgt. Zur Messung wurde die Suspension so verdünnt, daß die Extinktion einen Wert von 0,3 nicht überschritt.

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde eine frisch gewachsene Übernachtskultur eines Klons mit sterilem Glycerin bis zur Endkonzentration von 50% verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.2 Transformation von *E. coli*

2.2.2.1 Transformation von *E. coli* nach der Calciumchlorid-Methode

E. coli-Zellen wurden nach der Calciumchlorid-Methode transformiert (Mandel und Higa, 1970; modifiziert nach Cohen *et al.*, 1972).

Eine Übernachtskultur des zu transformierenden Stammes wurde mit dYT-Medium 1:50 verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3 bis 0.5 inkubiert. Nach der Zentrifugation (Hettich Rotana/RPC, 4000 UpM, 4°C, 10 min) wurden die Zellen je einmal mit 25 ml und 20 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung gewaschen, in 2 ml derselben Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert.

Zur Transformation wurden zu 200 µl der Zellsuspension mindestens 10 µl DNA-Lösung (10-300 ng) zugesetzt und für mindestens 60 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 45°C für 3 min zur Steigerung der Transformationseffizienz und Zugabe von 1 ml dYT-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf Selektivagar ausplattiert oder in Selektivmedium überimpft.

2.2.3 DNA-Präparation aus *E. coli*

2.2.3.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus *E. coli*

Für die Amplifizierung der Gene *hisJ* und *argT* aus chromosomaler DNA des *E. coli* Stamms HS 3018, wurde musste die chromosomale DNA der Zellen isoliert werden. Hierfür wurde eine 5 ml ü.N. Kultur dieses Stammes in 500 µl TE-Puffer gewaschen und abzentrifugiert (Hettich MikroRapidK, 12000 Upm, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 300 µl TE-Puffer aufgenommen und 15 min bei 65°C inkubiert, wobei die Zellen ausfallen sollten. Nach Zugabe von 2 µl Rnase-Lösung (10 mg/ml) und 60 µl einer 10%igen SDS-Lösung wurden weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde eine Ethanolfällung durchgeführt und die ausgefällte DNA in 10 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.3.2 Isolierung von Plasmid- und Phasmid-DNA aus *E. coli* in präparativen Mengen

Die präparative Reinigung von Plasmid- und Phasmid-DNA aus 50 ml *E. coli*-Kultur erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen SDS-Lyse. Die anschließende Reinigung der DNA über Anionen Austausch Chromatographie (*Jetstar™-kit*, Midi-Präparation) liefert in der Regel 100-300 µg DNA. Die mit dem entsprechenden Plasmid transformierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C in 50 ml Antibiotikum-haltigem Medium angezogen und durch Zentrifugation geerntet. Der Zellaufschluß erfolgte wie in 2.2.3.1 beschrieben, jedoch mit je 4 ml E1-, E2- und E3-Puffer. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, wurden nicht gelöste Zellbestandteile durch Zentrifugation (*SORVALL*-Rotor SS34, 15000 UpM, 4°C, 20 min) sedimentiert und aus dem klaren Überstand die DNA mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt, indem der Überstand auf die Säule gegeben wurde. Vorher wurde die Anionenaustauschersäule mit 10 ml E4-Puffer äquilibriert. Nach Waschen mit 2 x 10 ml E5-Puffer wurde die DNA mit 5 ml E6-Puffer eluiert und durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Die abzentrifugierte DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.4 Enzymatische Manipulation von DNA

2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion steht eine potente *in vitro*-Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zur Verfügung. Mit ihr ist es möglich, aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus selektiv eine DNA-Matrize zu vervielfachen. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA-Vorlage durch Erhitzen in einzelsträngige DNA überführt (Denaturierung). Beim Absenken der Temperatur lagern sich zwei Oligonukleotid-*Primer* an die Matrizen-DNA an (*Primer-Annealing*) und flankieren die zu amplifizierenden komplementären Zielregionen. Die *Primer* werden mit

Hilfe einer thermostabilen Polymerase komplementär zur ursprünglichen Duplex-DNA bei hoher Temperatur verlängert (*Primer-Extension*), um unspezifische Hybridisierung der *Primer* an die Matrize zu verhindern. Es wird eine bestimmte Anzahl an Amplifikationszyklen durchgeführt, wodurch sich die durch die beiden *Primer* flankierte DNA-Region akkumuliert.

Die PCR-Bedingungen mussten je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz sowie der Länge und des G/C-Gehaltes der verwendeten spezifischen *Primer* angepasst werden. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 μl durchgeführt.

Ein PCR-Ansatz bestand jeweils aus folgenden Komponenten:

- 5 μl Polymerasepuffer-Puffer (10x)
- 10-20 ng Template DNA
- 5-100 pmol *Primer*
- 1 μl 10 mM dNTPs
- ad 50 μl Wasser

Die Reaktionsgefäße wurden vor Platzierung in dem *PCR-Cycler* mit *PCR-Wachs* (Chill-out 14, MJ Research) oder Mineralöl überschichtet.

Die Länge und die Temperatur der einzelnen Reaktionsschritte der *PCR*-Zyklen, sowie deren Anzahl wurde durch die Wahl der Matrize, die Basenzusammensetzung, Länge der *Primer* und durch die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt. Die Elongationsreaktion (*Primer-Extension*) wurde bei 72 °C für 30 s pro 1000 bp durchgeführt. Die Anzahl der Zyklen betrug zwischen 20 und 30. Die Schmelztemperatur T_M eines Oligonukleotids wurde nach folgender empirischer Formel [1.1] berechnet, welche sowohl den relativen G/C-Gehalt (% G/C) als auch die Länge der Oligonukleotide (n)

berücksichtigt:

$$T_M [\text{°C}] = 69,3 + 0,41 \cdot (\% \text{ G/C}) - \frac{650}{n} \quad [1.1]$$

Die errechnete Temperatur lag in der Regel zwischen 45 °C und 60 °C. Die optimale *Annealing*-Temperatur T_A für eine Polymerasekettenreaktion wurde nach [1.2] bestimmt:

$$T_A = \frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} - 3^\circ\text{C} \quad [1.2]$$

T_{M1} und T_{M2} stehen dabei für die Schmelztemperaturen der beiden verwendeten *Primer*.

Die PCR wurde im Thermocycler (MWG Biotech) durchgeführt. Das Programm für die PCRs war:

- 98 °C für 2 min
- 94 °C 30s
- *annealing* Temperatur (T_A) 30s
- 72 °C 1 min pro kb Produkt (Minimum 30s)

25 oder 30 Mal nach Schritt 1

2.2.6 Mutagenese von DNA nach der modifizierten *QuikChange*TM-Methode

Zur Erzeugung der GCN4-Varianten GCN^{L5G} und GCN^{Ala} wurde die *QuikChange*TM-Methode der Firma Stratagene herangezogen. Mittels dieser Methode können mehrere Nukleotide ausgetauscht, eingeführt oder deletiert werden. Dazu benötigt man zwei komplementäre Mutationsprimer, für jeden DNA-Strang des Template-Vektors, welche die gewünschten Kodone an den auszutauschenden Positionen enthalten. Mit der *Pfu*-Turbo-Polymerase werden die Mutationsprimer in mehreren Temperaturzyklen verlängert, wobei ein mutiertes Plasmid mit Nicks entsteht. Nach der PCR folgt ein Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *DpnI*, die 5'-Gme⁶ATC-3'-Sequenzen in methylierter, bzw. hemimethylierter Form schneidet. Auf diese Weise wird nichtmutierter Template-Vektor aus dem PCR-Ansatz entfernt, da nur dieser und nicht das mutierte PCR-Produkt, in methylierte Sequenzen besitzt.

Für die Erzeugung der Vektoren pHKToxR'HisJGCN^{L5G} und pHKToxR'HisJGCN^{Ala} wurden als Mutationsprimer wurden die Oligonukleotide GCNL5Gdown und GCNL5Gup, bzw. GCNAladown GCNAlaup verwendet, als Template diente der pHKToxR'HisJGCN-Vektor.

Ein PCR-Ansatz bestand jeweils aus folgenden Komponenten:

- Polymerasepuffer-Puffer (10x)
- 50 ng DNA-Template
- 100 pmol Primer
- 1 µl dNTP-Stammlösung
- 1 µl *Pfu*-Turbo-Polymerase (2,5 U/µl)
- ad. 50 µl H₂O

Die PCR wurde im Thermocycler (MWG Biotech) durchgeführt. Das Programm für die PCR war:

- 95°C für 2 min
- 95°C für 30 sec
- 55°C für 1 min
- 68°C für 16 min

Die Schritte 2-4 wurden 17 x wiederholt. Nach der PCR wurde der komplette Ansatz einer Restriktionsspaltung mit *DpnI* unterzogen, um Template-DNA zu entfernen und dann CaCl_2 -kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes DH5 α mit 10 μl des Ansatzes transformiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf Selektivmedium plattiert.

2.2.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom jeweiligen Hersteller des Enzyms empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen gespalten.

Für präparative Spaltungen wurden 1-3 μg Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 -50 μl für 1 Stunde inkubiert. In den meisten Fällen wurde eine Enzymmenge von 1 U Restriktionsenzym pro μg DNA verwendet.

2.2.6.2 Ligation von DNA-Enden zu zirkularen Produkten

Bei der Ligation von zwei DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Produkt wurde das kleinere DNA-Insert-Fragment in einem 3-5 fach molaren Überschuß zum Vektorfragment eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit 2 U T4-DNA-Ligase in T4 DNA-Ligase-Puffer über Nacht bei 15°C in einem Gesamtvolumen von 15-30 μl . Der Ligationsansatz wurde direkt zur Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen eingesetzt.

2.2.7 Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von DNA-Fragmenten

2.2.7.1 Fällung von DNA mit Ethanol

Die Ethanolfällung diente der Konzentrierung und der Reinigung von DNA. Durch die Erhöhung der Konzentration an monovalenten Kationen und dem gleichzeitigen Entzug der die DNA umgebenden Hydrathülle durch Ethanol kam es zur Fällung.

Zu der DNA-haltigen Lösung wurde 1/10 Vol. 7 M Ammoniumacetat-Lösung gegeben, 3 Volumen 96% Ethanol *p.A.* zugesetzt und für eine Stunde bei -20°C inkubiert und die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (HETTICH-Kühlzentrifuge, 12000 UpM, 15 Minuten, 4°C). Anschließend wurde die DNA mit 500 μl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.7.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA in präparativen Mengen wurde in Agarosegelen (Dimension 125 x 80 x 7,5 mm), die 1,5% (w/v) Agarose in TAE-Puffer und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid enthielten, durchgeführt. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 0,25-0,5 Vol. Sucrosefarbmarker versetzt und die Elektrophorese bei konstanter Spannung von 100 V für ca. 60 min durchgeführt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die

aufgetrennten DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht, ausgeschnitten und zur weiteren Verwendung mittels Glasmilchreinigung aus dem Gel isoliert.

2.2.7.3 Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen mit Hilfe von Glasmilch

Diese Methode der Reinigung von DNA beruht auf der Auflösung der Agarosegelmatrix und Denaturierung der DNA durch chaotrope Salze (z.B. Natriumjodid oder Natriumperchlorat) und anschließender Bindung der einzelsträngigen DNA an Glaspartikel. Von dieser Matrix können DNA-Fragmente mit mehr als 100 bp-Länge bei niedriger Ionenstärke eluiert werden.

Das DNA-enhaltende Agarosestück wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen und durch Zugabe von mindestens 3 Vol. (angenommene Dichte des Agarosestückes: 1 g/ml) NaJ-Lösung und 30minütiger Inkubation bei 50°C aufgelöst. Danach wurden je nach DNA-Menge 12 µl Glasmilch zugesetzt und zur Bindung der DNA an die Glaspartikel 10-20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Glasmilch wurde abzentrifugiert und dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen. Durch Zusatz von 10-30 µl Wasser und Inkubation bei 50°C für 5 min wurde die DNA eluiert und durch langsames Abkühlen auf RT renaturiert. Anschließend wurde die Glasmilch abzentrifugiert und der DNA-haltige Überstand weiter verwendet. Zur Reinigung von DNA aus Lösungen wurde anstatt des Agarosestückes die DNA-haltige Lösung direkt in die Prozedur eingesetzt.

Unter Verwendung der oben beschriebenen Glasmilch ermöglichte diese Methode eine effektive Präparation von DNA-Fragmenten von 100 bp bis 12,5 kb.

2.2.7.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA durch Absorptionsspektroskopie beruht auf der Absorption von UV-Licht durch die Nucleobasen. Die zu messende DNA-Probe wurde mit Wasser auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm) gegen Wasser gemessen.

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg dsDNA/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260} = 33 \text{ µg ssDNA/ml}$$

1 OD₂₆₀ entspricht bei ssDNA einer Konzentration von ~100 pmol Basen/µl. Nach Division durch die Anzahl der Basen pro Molekül erhielt man so die molare Konzentration eines DNA-Moleküls, z.B. Oligonukleotids, in der Küvette. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors erhielt man anschließend die Konzentration der DNA-Probe. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ ist ein Maß für die Reinheit der DNA-Lösung; ein Verhältnis von weniger als 2,0 deutet auf Verunreinigungen der DNA durch Protein oder Phenol hin.

Geringere DNA-Mengen wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel über ihre Fluoreszenz-Intensität unter UV-Licht durch Vergleich mit DNA-Standards bekannter Konzentration quantifiziert.

2.2.8 Untersuchung der Dimersierungseigenschaften verschiedener ToxR'-Fusionsproteine mittels TOXCAT-Assay

Mithilfe des TOXCAT-Assays lassen die Dimersierungseigenschaften von ToxR'-Fusionsproteinen in vivo anhand der Vermittlung von Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol nachweisen. Dazu wird der Transporterstamm Chr3, der das *cat*-Gen, welches für die Chloramphenicol-Acetyltransferase kodiert, unter Kontrolle des *ctx*-Promotors trägt, mit den zu untersuchenden ToxIVBKII-Konstrukten transformiert und mit je 50 µl des Transformationsansatzes 5 ml dYT/Kan³³ beimpft. Diese Vorkulturen wurden ü.N. bei 37°C auf dem Roller inkubiert (als Negativkontrolle wurden zudem untransformierte Chr3-Zellen derselben Behandlung unterzogen). Am nächsten Tag wurden die Hauptkulturen (je 5 ml dYT/Amp⁵⁰/Kan³³/1 % Arabinose/2 % Glucose mit je 50 µl der Vorkulturen beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37°C inkubiert. Je 50 µl der Hauptkulturen wurden LB/ Amp⁵⁰/Kan³³/1 % Arabinose/2 % Glucose-Platten ausgestrichen, welche ansteigende Konzentrationen (in 30 µl-Schritten von 0-180 µg/ml) an Chloramphenicol enthielten. Wurde der Einfluss von Benzoesäure auf die Dimerisierungseigenschaften der ToxR'-Fusionsproteine untersucht, wurden ausserdem je 50 µl der Hauptkulturen auf Platten derselben Zusammensetzung mit zusätzlich je 5 mM Benzoesäure ausgestrichen. Nach Inkubation ü.N. bei 37°C wurde ausgewertet, bis zu welcher Chloramphenicolmenge die jeweiligen Zellen zu wachsen in der Lage waren.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Präparation der periplasmatischen Proteine aus *E. coli* im analytischen Maßstab

Durch osmotischen Schock wurden die periplasmatischen Proteine aus *E. coli* präpariert (Neu und Heppel, 1965). Dazu wurden 2 ml einer 5 ml oder 50 ml stationären Übernachtskultur (28-37 °C, 150 Upm) geerntet (Hettich MikroRapidK, 12000 Upm, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 300 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen, für 20 min unter Schütteln bei 4 °C inkubiert und erneut abzentrifugiert (Hettich MikroRapidK, 12000 Upm, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 100 µl Schockpuffer aufgenommen, für 20 min unter Schütteln bei 4 °C inkubiert und abzentrifugiert (Hettich MikroRapidK, 12000 Upm, 5 min, 4 °C). Der Überstand mit den periplasmatischen Proteinen wurde abgenommen und mittels PAGE (siehe Abschnitt 2.3.5) analysiert.

2.3.2 Präparation der periplasmatischen Proteine aus *E. coli*

Aus einer 50 ml Übernachtskultur (37 °C, Schüttler, 160 Upm) wurden 20 ml Zellsuspension in einen 1 l Kolben dYT/Amp¹⁰⁰/0,2 % Glucose überimpft und bei einer Temperatur von 37°C bei 80 Upm geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,9-2,0 wurde mit 100 µl aTc (2 mg/ml) induziert und für weitere 2 h unter Schütteln inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (Hettich Erntezentrifuge, 4000 Upm, 30 min, 4 °C). Die weiteren Schritte der Präparation wurden auch bei 4 °C durchgeführt. Das Zellpellet aus 1 l Kultur wurde in 100 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen, in GSA Bechern bei 150 Upm resuspendiert und anschließend zentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor, 9000 Upm, 12 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 100 ml Schockpuffer versetzt und in GSA Bechern bei 150 Upm inkubiert. Nach Zentrifugation (Sorvall GSA-Rotor, 10000 Upm, 12 min, 4 °C) wurden die im Überstand befindlichen periplasmatischen Proteine einer Ammoniumsulfatfällung für 2 h unterzogen (65g (NH₄)₂SO₄/100ml, d.h. 90% gesättigte Ammoniumsulfatlösung).

Nach Zentrifugation (Sorvall GSA-Rotor, 12000 Upm, 45 min, 4 °C) wurden die pelletierten Proteine in 15-20 ml IMAC-Startpuffer pro 1 l Ausgangskultur aufgenommen, und die unlöslichen Bestandteile erneut abzentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 15000 Upm, 30 min, 4 °C). Die erhaltenen periplasmatischen Proteine wurden zur affinitätschromatographischen Reinigung des jeweiligen Proteins über immobilisierte Metall-ionen (IMAC) eingesetzt.

2.3.3 Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC)

IMAC wird zur Reinigung von Molekülen angewendet, die eine Affinität zu chelatierten Metallionen aufweisen. So bildet z.B. die Aminosäure Histidin Komplexe mit zweiwertigen Übergangsmetallen. Die Reinigung eines Proteins mit sechs am Carboxyterminus aneinander gereihten Histidinen kann daher mithilfe von Nickelionen, die an einer Sepharosematrix immobilisiert sind, erfolgen.

Als Säulenmaterial wurde „Chelating Sepharose® Fast Flow“ (Pharmacia Biotech) verwendet. Zum Packen der Säule wurden 4 ml dieses Materials verwendet. Zur Beladung der Säule mit Ni²⁺-Ionen wurden 2 Säulenvolumen einer 100 mM NiCl₂ Lösung zugegeben. Überschüssige Ni²⁺-Ionen wurden durch Waschen mit fünf Säulenvolumen Wasser entfernt. Nach Equilibrierung der Säule mit drei Volumen Startpuffer wurde die zu reinigende Proteinlösung zugegeben und anschließend mit drei Volumen Startpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Moleküle zu eluieren. Zur Elution des den Hexa-Histag tragenden Proteins wurde je ein Volumen einer Imidazol-Lösung steigender Konzentration auf die Säule gegeben und in Greinerröhrchen aufgefangen. Von jeder Fraktion wurden 60 µl in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 20 µl Proteinprobenpuffer versetzt und nach Erhitzen auf 99°C für 5 min zur PAGE eingesetzt. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Denaturierung ü.N. bei 4°C gegen 5 l

8 M Harnstoff in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,7 dialysiert. Danach wurden die Fraktionen renaturiert, indem zweimal gegen 5 l 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,7 dialysiert wurde (jeweils bei 4°C ü.N.) Die Proteinlösung wurde dann auf 1 ml Fraktionen aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Vor jedem Einsatz des Proteins wurde eine Fraktion aufgetaut, für 10 min bei 4°C 12000 Upm abzentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

2.3.4 Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Aminosäuren Tryptophan aber auch Tyrosin, Phenylalanin und Disulfidbrücken (Cystine) absorbieren Licht in einem Bereich von 250 bis 300 nm.

Auf dieser Grundlage kann nach Pace et al. (1995) kann für Proteine bekannter Aminosäurezusammensetzung der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{280} berechnet werden:

$$\epsilon_{280} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) = \sum \text{Trp} \cdot 5500 + \sum \text{Tyr} \cdot 1490 + \sum \text{Cystin} \cdot 125 \quad [2.1]$$

Demnach beträgt $\epsilon_{280}(\text{HisJ})$ 17545 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ und $\epsilon_{280}(\text{LAO})$ 24535 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes konnte nun über den berechneten molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ_{280}) und die gemessene Absorption (A) bei 280 nm die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung kann nun der berechnete molare Extinktionskoeffizient (ϵ_{280}) sowie die gemessene Absorption (A) der Lösung bei 280 nm in das Lambert-Beersche Gesetz eingesetzt werden:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad \Leftrightarrow \quad c = \frac{A}{\epsilon \cdot d} \quad [2.2]$$

A = Absorption

c = Konzentration (M)

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Pharmacia-Midget-Anlage, Dimension 100 x 60 x 0.75 mm) mit PAGE-Laufpuffer nach der Methode von Laemmli (1970) aufgetrennt. Trenngele enthielten 15% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (Gewichtsverhältnis 30 : 0,8), 375 mM Tris-HCl (pH 8,8) und 0,1% (w/v) SDS. Sammelgele enthielten stets 5% Acrylamid/Bisacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8 und 0,1% SDS. Die Proben wurden in Protein-Probenpuffer bzw.

Harnstoff-Proteinprobenpuffer 5 min bei 99 °C denaturiert und nach dem Auftragen wurden die Proteine in ca. 1 h bei konstanter Stromstärke von 20 mA aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit „Coomassie Brilliant Blue“ gefärbt (15 min in PAG-Färbelösung, 15-60 min in PAG-Entfärbelösung I und weiter in Entfärbelösung II; Weber und Osborn, 1969) oder auf Nitrocellulose transferiert (siehe Abschnitt 2.3.6).

2.3.6 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran

Die Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen (siehe Abschnitt 2.3.5) wurden auf Nitrocellulose-Membranen (Towbin *et al.*, 1979) nach dem „Semi-dry“-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) transferiert. Auf zwei Lagen Filterpapier (3 mm Filterpapier) wurde die Nitrocellulose-Membran, das betreffende Gel und zwei weiteren Lagen Filterpapier gelegt. Die Komponenten vorher mit Transferpuffer getränkt wurden. Dieser Aufbau wurde zwischen zwei Graphitelektroden (LKB-Nova-Blot) gepreßt und die Proteine elektrophoretisch (15-30 min, 13 V, ca. 4 mA/cm²) transferiert. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Nitrocellulose-Membran in 25 ml Ponceau-S-Lösung (Ponceau-S-Konzentrat 1:10 mit H₂O verdünnt) gefärbt. Die Membran wurde bis zur vollständigen Entfärbung mit PBS-Tween-Puffer gewaschen.

2.3.7 Immunochemischer Nachweis von transferierten Proteinen auf Nitrocellulose-Membran

Die Nitrocellulose-Membran wurde in 20 ml Blocklösung für 30 min geschwenkt und anschließend dreimal je 20 min mit PBS Puffer gewaschen. Dann wurde in 20 ml verdünnter Antiserum-Lösung (in PBS-Puffer) 16 h bei RT leicht geschwenkt und anschließend dreimal je 20 min mit 20 ml PBS-Tween-Puffer gewaschen. Danach wurde die Membran 2 h mit 20 ml einer verdünnten Lösung eines Alkalische Phosphatase-konjugiertem Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antiserums (1 : 5000 in PBS Puffer verdünnt) inkubiert, dreimal 30 min mit PBS-Tween-Puffer gewaschen und dreimal kurz mit deionisiertem Wasser geschwenkt um restliches Tween zu entfernen. Die Membran wurde anschließend in 12,5 ml Western-Blot-Reaktionspuffer bei RT inkubiert. Nach Auftreten der spezifischen Färbung wurde die Reaktion durch Waschen mit deionisiertem Wasser gestoppt.

2.3.8 Messung der β -Galaktosidase-Aktivität im *E. coli* Zell-Lysat

Mithilfe des β -Galaktosidase-Assays wurde die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. In diesem Verfahren wird in Zell-Lysaten die Umsetzung des β -Galaktosidasesubstrats

o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) zu Galaktose und o-Nitrophenyl photometrisch bei 402 nm verfolgt.

Mithilfe des V_{\max} -Wertes und der OD_{620} lässt sich dann die Aktivität der β -Galaktosidase in Miller Units (MU) bestimmen.

Zur Messung der *ctx*-Promotor-Aktivierung wurde der *E. coli*-Stamm FHK12 (Kolmar *et al.*, 1995a) mit dem zu untersuchenden pHKToxR'-Derivat transformiert und über Nacht bei 37°C auf Selektivagar inkubiert. Von der mit ca. 400-500 Kolonien dicht bewachsenen Platte wurde ein Z-förmiger Abstrich über 50-80 Kolonien durchgeführt und in 3 ml dYT Cm²⁵ transferiert und für 4 h bei 37 °C auf dem Roller inkubiert. Als Hauptkulturen wurden dreimal 5 ml dYT-Medium, versetzt mit 25 μ g/ml Chloramphenicol und 0,3 mM IPTG, wurden mit 5 μ l Zellsuspension beimpft und 10 bis 12 h bei 30°C unter Schütteln (150 Upm) inkubiert.

Für die Untersuchung des Einflusses niedermolekularer Verbindungen auf die Dimersierungseigenschaften von ToxR'-Fusionsproteinen, wurden den Hauptkulturen jeweils entsprechende Mengen der in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,7 gelösten Substanzen zugegeben. In der ersten Runde an Experimenten wurde den Hauptkulturen je eine Spatelspitze der Substanzen zugesetzt, in späteren Experimenten wurden unterschiedliche Konzentrationen an Ligand genau eingestellt, diese betragen dann 1 mM, 5 mM, 10 mM und 20 mM. Die mit Liganden versetzten Kulturen wurden genauso weiterbehandelt, wie die ligandenfreien Kulturen.

Nach Inkubation ü. N. wurden je 15 μ l dieser Kulturen auf eine Mikrotiterplatte (NUNC, 96U Microwell Plate) transferiert und mit 100 μ l Chloroform-gesättigtem Z-Puffer versetzt. Die OD_{620} der Zellsuspension wurde über den ELISA-Reader (Modell SLT340ATTC) bestimmt.

Nach Zugabe von 50 μ l SDS-haltigen Z-Puffer (0,4% (w/v) SDS) wurden die Zellen durch 10 minütige Inkubation bei 28°C lysiert. Nach Zugabe von 50 μ l einer frisch angesetzten ONPG-Lösung (0,4% (w/v) ONPG (Sigma N1127) in Z-Puffer) wurde die durch die β -Galaktosidase katalysierte Hydrolyse des ONPG über Extinktionsänderung bei 402 nm am ELISA-Reader verfolgt.

Aus der maximalen Steigung der Reaktionskurve und der zuvor bestimmten OD_{620} der Zellsuspension wird die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität (Miller Units) nach folgender Formel berechnet (Miller, 1972):

$$\text{Miller Units} = 2000 \cdot \frac{V_{\max}}{O.D._{620}} \quad [3.1]$$

2.4 Biophysikalische Charakterisierung der HisJ-Varianten

2.4.1 Erstellung von Kalibrierungskurven zur Bestimmung der Konzentration ^3H -markierter Liganden mittels Szintillationszählung

Um die Konzentration der tritiummarkierten Liganden L-Histidin, L-Arginin und L-Lysin mittels Szintillationszählung bestimmen zu können, wurden zunächst Kalibrierungskurven erstellt, anhand derer sich die Konzentration an Ligand über die *counts per minute* (cpm) errechnen liess. Hierfür wurden Konzentrationsreihen der entsprechenden Liganden erstellt und von jedem Ansatz bekannter Ligandenkonzentration je 2 μl in 5 ml Quicksafe A Scintillation Liquid im Scintillation Analyzer vermessen. Das Programm für die Messung war dabei wie folgt:

Count Time:	5 min
Cycles:	1
2 Sigma Coincidence:	off
#Counts per Vial:	1
Radionucleotide:	^3H
Data Mode	cpm

Die gemessenen cpm wurden gegen die eingesetzten Ligandenkonzentrationen aufgetragen und mittels SigmaPlot eine lineare Gerade durch die Werte gefittet. Anhand der von dem Programm berechneten Funktion für diese Gerade liess sich eine mittlere Aktivität der Liganden von $3,62 \times 10^{16}$ cpm/mol bestimmen. Für die Berechnung der Ligandenmenge wurde demnach Gleichung [1.4] verwendet:

$$n(^3\text{H-L-Ligand}) \text{ (mol)} = \frac{1 \text{ mol Ligand} \cdot \text{gemessene cpm}}{3,62 \times 10^{16} \text{ cpm}} \quad [4.1]$$

Die Konzentration des Liganden wurde dann nach Gleichung [4.2] bestimmt:

$$c = \frac{n}{V} \quad [4.2]$$

mit c = Konzentration (M)

n = Stoffmenge (mol)

V = (für die Szintillationsmessung eingesetztes) Volumen (l)

2.4.2 Gleichgewichtsdialyse unter Verwendung ^3H -markierter Liganden zur Bestimmung der Affinitäten der HisJ-Varianten für basische L-Aminosäuren

Für die Gleichgewichtsdialyse zur Bestimmung der Affinitätskonstanten der Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit den basischen L-Aminosäuren wurde stets eine konstante Konzentration von 500 nM an tritiummarkiertem Ligand eingesetzt, dieser wurde aus einer 5 μM Stammlösung vorgelegt. Die endgültige Ligandenkonzentration wurde dann mit unmarkiertem Ligand eingestellt, wobei Konzentrationen bis zu 50 μM (für HisJ und Lysin bis zu 300 μM) gewählt wurden. Aus einer konzentrierten Proteinlösung (100 μM) wurde dann Protein in einer Endkonzentration von 5 μM zugegeben und mit Gleichgewichtsdialysepuffer (10 mM Natriumphosphat, 200 mM NaCl, pH 7,2) auf ein Endvolumen von 100 μl aufgefüllt. Die Proben wurden dann für 3 h bei 25°C inkubiert. Nun wurden je 70 μl der Ansätze in die Probenkammer eines DispoDialyzersTM pipettiert, in die Pufferkammer wurden 70 μl Gleichgewichtsdialysepuffer pipettiert. Die Dialyse wurde unter konstantem Rühren ü.N. bei 4°C durchgeführt. Am nächsten Tag wurden je 2 μl sowohl aus der Proben- als auch aus der Pufferkammer entnommen und in 5 ml Quicksafe A Scintillation Liquid im Scintillation Analyzer vermessen. Das Programm für die Messung war dabei wie folgt:

Count Time:	5 min
Cycles:	1
2 Sigma Coincidence:	off
#Counts per Vial:	1
Radionucleotide:	^3H
Data Mode	cpm

Anhand der cpm wurde über eine zuvor erstellte Kalibrierungskurve (**Abschn**) die Konzentration an ^3H in jeder Kammer ermittelt und durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor an unmarkiertem Ligand konnte dann die jeweils vorliegende Ligandenkonzentration bestimmt werden. Die Konzentration an freiem Ligand entsprach jeweils der Konzentration an Ligand in der Pufferkammer, die Konzentration an gebundenem Ligand berechnete sich nach:

$$[\text{Ligand}_{\text{gebunden}}] = [\text{Ligand}_{\text{Probenkammer}}] - [\text{Ligand}_{\text{Pufferkammer}}]. \quad [5.1]$$

Der Anteil an Rezeptor-Ligandenkomplex berechnete sich nach:

$$\text{Anteil}_{\text{Rezeptor-Ligandenkomplex}} = \text{Anteil}_{\text{Ligand gebunden}} = \text{Anteil}_{\text{gebunden}} = \frac{[\text{Ligand}]_{\text{gebunden}}}{\max[\text{Ligand}]_{\text{gebunden}}} \quad [5.2]$$

Wobei [Ligand]gebunden die nach Formel berechnete Konzentration an gebundenem Ligand darstellt und max[Ligand]gebunden die maximal ermittelte Konzentration an gebundenem Ligand, bei der sich die jeweilige Rezeptorvariante im ligandengesättigten Zustand befand.

Die Werte von in SigmaPlot übertragen und ausgewertet.

2.4.3 Berechnung der K_d -Werte für die Bindung von basischen L-Aminosäuren durch die HisJ-Varianten mittels der über Gleichgewichtsdialyse ermittelten Daten

Für die Bindung eines Liganden durch ein Rezeptorprotein gilt:



wobei [R] die freie Rezeptor-, [L] die freie Ligandenkonzentration und [RL] den Anteil an Rezeptor-Ligandenkomplex darstellt. Nach dem Massenwirkungsgesetz lässt sich Gleichung [6.2] formulieren, wobei k_d die Bindungskonstante darstellt:

$$k_d = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} \quad [6.2]$$

Nun setzt sich die totale Rezeptorkonzentration $[R_t]$ aus der Konzentration an freiem [R] und der an ligandenkomplexiertem [RL] Rezeptor zusammen, woraus sich ergibt:

$$[R] = [R_t] - [RL] \quad [6.3]$$

setzt man [6.3] für [R] in [6.2] ein und formuliert die Gleichung um, erhält man schließlich folgende Gleichung (nach Hulme, E. C. and Birdsall, N.J., 1992):

$$[RL] = \frac{[R_t] \cdot [L]}{(k_d + [L])} \quad [6.4]$$

(Die genaue Herleitung dieser Formel ist im Anhang B aufgeführt)

Diese Gleichung entspricht der Formel für eine hyperbolische Kurve nach:

$$y = \frac{a \cdot x}{(b + x)} \quad [6.5]$$

Trägt man nun den Anteil an Rezeptor-Ligandenkomplex (welcher dem Anteil an gebundenem Liganden entspricht, da die Ligandenbindung durch HisJ einer 1:1 Stöchiometrie folgt) gegen die freie Ligandenkonzentration auf, erhält man eine hyperbolische Kurve, die Sättigung in maximaler Ligandenbindung erreicht und deren Halbmaximalwert dem K_d -Wert für die jeweilige Rezeptor-Ligandeninteraktion entspricht. Die mittels Gleichgewichtsdialyse ermittelten Werte für den Anteil an Rezeptor-Ligandenkomplex und freier Ligandenkonzentration wurden in SigmaPlot übertragen und die K_d -Werte mittels nonlinearer Regresseion iterativ nach der Methode der kleinsten Quadrate errechnet (Marquard-Levenberg-Algorithmus; Marquard, 1963).

2.4.4 Fluorimetrische Messung der Konformationsänderung von HisJ

Im Fluoreszenz-Spektrophotometer Hitachi F-4500 wurde die Emission von HisJ bei einer bestimmten Anregungswellenlänge gemessen. Ein Anstieg des Emissionsmaximums bei 330 nm bedeutet eine Konformationsänderung von HisJ, hervorgerufen durch eine Schließbewegung der beiden Domänen, die durch das Binden eines Liganden hervorgerufen wird. HisJ wurde dabei, soweit nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 1 μ M in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,7), eingesetzt. Es wurden nun ansteigende Konzentrationen von Liganden (aus Stammlösungen von 1 μ M bis 100 mM in Kaliumphosphatpuffer, pH 6,7) zugegeben und ca. 2 h bei RT inkubiert. Dann wurde die Fluoreszenz am Fluoreszenzspektrometer vermessen. Folgende Einstellungen wurden dafür unter den Menüpunkten *Instrument-* und *Scanparameter* vorgenommen:

<i>Scanmode:</i>	Emission	(Emissionsmessung)
<i>Data mode:</i>	Fluoreszenz	(Messung eines Fluoreszenzsignals)
<i>Scan Speed:</i>	240 nm/min	
<i>Sampling intervall:</i>	0,2 nm	(Auflösung)
<i>Response:</i>	auto (s)	(Empfangszeit)
<i>Ex-slit:</i>	5 nm	(Anregungsbandbreite)
<i>Em-slit:</i>	5 nm	(Emissionsbandbreite)
<i>Shutter control:</i>	on	
<i>Excitement:</i>	295 nm	
<i>Scan range:</i>	300-400 nm	

Die Fluoreszenz bei 330 nm wurde notiert und zur Auswertung in Sigma Plot® übertragen.

2.4.5 Berechnung der K_d -Werte für die Bindung von niederaffinen Liganden durch die HisJ-Varianten mittels der über Fluorezenzspektroskopie ermittelten Daten

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten der Wechselwirkung der Proteine mit niedrigaffinen Liganden wurde der Anteil an Ligandenkomplexiertem Protein gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration aufgetragen. Der Anteil an ligandenkomplexiertem Rezeptor berechnete sich nach:

$$\text{Anteil gebunden} = \frac{\Delta F_{330}}{\Delta F_{\text{total}}} = \frac{F_{330} - F_{\text{frei}}}{F_{\text{max}} - F_{\text{frei}}} \quad [7.1]$$

Wobei ΔF_{330} den Wert der Tryptophanfluoreszenz bei 330 nm der jeweils betrachteten Probe minus dem Wert der Tryptophanfluoreszenz bei 330 nm des ligandenfreien Rezeptors (F_{frei}) darstellt und ΔF_{total} den Wert der Tryptophanfluoreszenz bei 330 nm des ligandengesättigten Rezeptors (F_{max}) minus den Wert der Tryptophanfluoreszenz bei 330 nm des ligandenfreien Rezeptors (F_{frei}).

Für die Bindungskonstante k_d gilt (nach Hulme, E. C. and Birdsall, N.J., 1992), bereits in Abschnitt 2.4.3 aufgeführte Formel [6.4]:

$$[\text{RL}] = \frac{[\text{R}_t] \cdot [\text{L}]}{(k_d + [\text{L}])} \quad [6.4]$$

Wobei

$[\text{RL}]$ = Konzentration an Rezeptor-Ligandenkomplex (= Anteil an ligandenkomplexiertem Rezeptor)

$[\text{R}_t]$ = totale (eingesetzte Rezeptorkonzentration)

$[\text{L}]$ = freie Ligandenkonzentration (die Falle niederaffiner Liganden mit der eingesetzten Ligandenkonzentration $[\text{L}_t]$ gleichzusetzen ist, wenn gilt $[\text{R}_t] \ll [\text{L}_t]$)

k_d = Bindungskonstante der betrachteten Interaktion

(Die genaue Herleitung dieser Formel ist im Anhang B aufgeführt)

Diese Gleichung entspricht der Formel für eine hyperbolische Kurve nach:

$$y = \frac{a \cdot x}{(b + x)} \quad [6.5]$$

Nach Formel wurden von Sigma Plot® durch die Daten eine hyperbolische Kurve gefittet, deren Halbmaximalwert dem K_d -Wert der Wechselwirkung entspricht.

2.4.6 Probenvorbereitung zur Messung von Denaturierungskurven

Zur Messung der Denaturierungs- und Renaturierungskurven wurde das Protein auf eine Konzentration von 5 μM in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,7) eingestellt. Eine Verdünnungsreihe mit ansteigender Harnstoffkonzentration in 0,1 M Schritten und 50 mM Schritten in der Transitionsphase bei einem Endvolumen von 1 ml und wurde erstellt. Die Verdünnungsreihen wurden für 4 h bei 25 °C inkubiert und die Proben anschließend im Fluoreszenz Spektrophotometer bei 25 °C gemessen (siehe Abschnitt 2.4.8).

Für die Denaturierung in Anwesenheit von Liganden wurde das Protein zunächst mit 5 mM einer 100 mM Stammlösung des entsprechenden Liganden versetzt, für 3 h bei 25 °C inkubiert und dann zur Denaturierung wie oben beschrieben mit entsprechenden Harnstoffkonzentrationen versetzt, wiederum für 4 h bei 25 °C inkubiert und die Proben im Fluoreszenzspektrometer bei 25 °C gemessen.

2.4.7 Probenvorbereitung zur Messung von Renaturierungskurven

Eine konzentrierte Proteinlösung (100 μM) wurde zunächst komplett denaturiert, indem sie ü.N: bei 4°C gegen 8 M Harnstoff in Kaliumphosphatpuffer, pH 6,7 dialysiert wurde. Nach einer Denaturierung wurde dann ebenfalls wie zur Aufnahme der Denaturierungskurve unter Abschnitt 2.4.5 beschrieben eine Verdünnungsreihe mit ansteigender Harnstoffkonzentration und einer Proteinkonzentration von 1,5 μM in einem Endvolumen von 1 ml erstellt und die einzelnen Proben wurden für 16 h bei 25 °C renaturiert. Die Proben wurden wiederum fluorimetrisch vermessen.

2.4.8 Fluoreszenzmessung der De- und Renaturierungskurven

Im Fluoreszenz Spektrophotometer Hitachi F-4500 wurde die Emission einer Proteinprobe bei einer bestimmten Anregungswellenlänge gemessen. Folgende Einstellungen wurden dafür unter Menüpunkten *Instrument-* und *Scanparameter* eingeben:

<i>Scanmode:</i>	Emission	(Emissionsmessung)
<i>Data mode:</i>	Fluoreszenz	(Messung eines Fluoreszenzsignals)
<i>Scan Speed:</i>	240 nm/min	
<i>Sampling intervall:</i>	0,2 nm	(Auflösung)
<i>Response:</i>	auto (s)	(Empfangszeit)
<i>Ex-slit:</i>	5 nm	(Anregungs-Bandbreite)
<i>Em-Slit:</i>	5 nm	(Emissions-Bandbreite)
<i>Shutter control:</i>	on	
<i>Excitement:</i>	295 nm	
<i>Scan Range:</i>	325-335 nm	

Es wurde jeweils die Fluoreszenz bei 330 nm notiert und manuell zur Auswertung in Sigma Plot^R übertragen.

2.4.9 Mathematische Behandlung der Faltungs-Thermodynamik - Berechnung der freien Entfaltungsenergie $\Delta G_D^{H_2O}$, $[Urea]_{1/2}$ und m-Werte

Die reversible Entfaltung des HisJ bei steigenden Konzentrationen an denaturierenden Harnstoff kann thermodynamisch durch ein Zweizustandsmodell beschrieben werden (Pace *et al.*, 1989; Pace 1990). Das unter Abschnitt 2.4.6 erhaltene Meßsignal, also die detektierte Fluoreszenz (F) des singulären Tryptophans (Trp130) im HisJ bei der jeweiligen Harnstoffkonzentration setzt sich aus der Trp-Fluoreszenz des gefalteten Zustandes (f_F) und der Trp-Fluoreszenz des entfalteten Zustandes (f_U) zusammen. Daraus folgt:

$$f_F + f_U = 1 \quad [8.1]$$

Für die Gleichgewichtskonstante der Entfaltung (K_U) bei einer gegebenen Harnstoffkonzentration gilt daher:

$$K_U = \frac{F_F - F}{F - F_U} \quad [8.2]$$

Wobei F für das gemessene Fluoreszenzsignal, F_U für den Anteil der Fluoreszenz von HisJ im entfalteten und F_F für den Anteil der Fluoreszenz im gefalteten Zustand steht.

Zwischen dem Fluoreszenzsignal sowohl im gefalteten als auch im entfalteten Zustand besteht eine lineare Abhängigkeit zu der eingesetzten Harnstoffkonzentration ($[Urea]$) (Horovitz, 1992):

$$F_F = a \cdot [Urea] + b \quad [8.3]$$

$$F_U = c \cdot [Urea] + d \quad [8.4]$$

Die Berechnung der Gibbs-Energie der Entfaltung (ΔG_U) bei den jeweiligen $[Urea]$ ergibt durch Einsetzen der Gleichung [8.2] in die Gleichung [8.5]:

$$\Delta G_U = -RT \cdot \ln(K_U) \quad [8.5]$$

$$\Delta G_U = -RT \cdot \ln \frac{(F_F - F)}{(F - F_U)} \quad [8.6]$$

Desweiteren wurde empirisch gefunden, daß die freie Enthalpie der Entfaltung (ΔG_U) eines Proteins in Gegenwart von denaturierenden Agenzien wie Harnstoff oder Gdn-HCl linear von dessen Konzentration abhängt (Pace, 1986):

$$\Delta G_U = \Delta G_U^{\text{H}_2\text{O}} - m \cdot [\text{Urea}] \quad [8.7]$$

$\Delta G_U^{\text{H}_2\text{O}}$ ist der Wert der freien Enthalpie der Entfaltung eines Proteins in Abwesenheit von Harnstoff und m die Steigung von ΔG_U bei der Zugabe an Harnstoff. Aus den Gleichungen [8.6] und [8.7] folgt, daß sich der $\Delta G_U^{\text{H}_2\text{O}}$ -Wert eines Proteins berechnen läßt, wenn der m -Wert (m) und die Harnstoffkonzentration, bei der das Protein zur Hälfte entfaltet vorliegt ($[\text{Urea}]_{1/2}$), bekannt sind:

$$0 = \Delta G_U^{\text{H}_2\text{O}} - m \cdot [\text{Urea}]_{1/2} \quad [8.8]$$

$$\Delta G_U^{\text{H}_2\text{O}} = m \cdot [\text{Urea}]_{1/2} \quad [8.9]$$

Über Einsetzen von [8.9] in [8.7], [8.3] und [8.4] in [8.6], gleichsetzen von [8.6] und [8.7] sowie Auflösen nach F ergibt sich die Gleichung [8.10] mit sechs Unbekannten, die den Verlauf des Fluoreszenzsignals (F) bei ansteigender Ureakonzentration beschreibt

$$F = a \cdot [\text{Urea}] - (a \cdot [\text{Urea}] + b - (c \cdot [\text{Urea}] - d)) \cdot \frac{\exp\left\{\frac{m \cdot [\text{Urea}] - [\text{Urea}]_{1/2}}{RT}\right\}}{1 + \exp\left\{\frac{m \cdot [\text{Urea}] - [\text{Urea}]_{1/2}}{RT}\right\}} \quad [8.10]$$

Aus den Messwerten (siehe Abschnitt 2.4.7 und 2.4.8) können nach Abzug der Leerwerte über nichtlineare Regression mit Hilfe von SigmaPlot die sechs Parameter iterativ nach der Methode der kleinsten Quadrate errechnet werden (Marquard-Levenberg-Algorithmus; Marquard, 1963).

Aus den Parametern m und $[\text{Urea}]_{1/2}$ ergibt sich nach Gleichung [8.9] direkt der Wert der freien Enthalpie der Entfaltung des Proteins in Wasser. Der ΔG_U -Wert bei einer beliebigen Harnstoffkonzentration des Proteins erhält man aus den nach [8.10] berechneten Parametern a , b , c , und F -Werten durch die Kombination von [8.3] und [8.4] und [8.6]:

$$\Delta G_U = -RT \cdot \ln \left\{ \frac{(a \cdot [\text{Urea}] + b - F)}{(F - c \cdot [\text{Urea}] - d)} \right\} \quad [8.11]$$

Zum graphischen Vergleich der De- und Renaturierungskurven der HisJ-Varianten, wurden die gemessenen F-Werte bzw. die nach Gleichung [8.10] berechneten F-Werte in den Anteil an entfaltetem Protein nach Gleichung [8.12] umgerechnet und gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen.

$$f_U = \frac{(a \cdot [\text{Urea}] + b - F)}{(a \cdot [\text{Urea}] + b - c \cdot [\text{Urea}] - d)} \quad [8.12]$$

2.5 Mathematische Methoden

2.5.1 Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen

Für die Bestimmung der K_d -Werte der Interaktion der Proteinvarianten mit verschiedenen Liganden, sowie für De- und Renaturierungsstudien wurden jeweils drei unabhängige Parallelexperimente durchgeführt und anhand der so erhaltenen Daten jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen für die ermittelten Werte berechnet.

Für die Berechnung der Mittelwerte galt dabei:

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n} \quad [9.1]$$

mit n = Anzahl der unabhängig ermittelten Werte und x_i = Jeder einzelne, unabhängig ermittelte Wert.

Für die Berechnung der Standardabweichung galt:

$$\sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum_i (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}} \quad [9.2]$$

2.6 Computergestützte Planung und Auswertung von Experimenten

Strukturdaten von Proteinen wurden der *Brookhaven Protein Data Bank* (Bernstein *et al.*, 1977) entnommen. Für die Generierung von Modellstrukturen der GCN-Varianten GCN^{L5G} und GCN^{Ala} wurde das Insight II Programm verwendet. Im *Builder*-Modus wurden basierend auf der Kristallstruktur des wt-GCN4-Leucinheptadenmotivs (Ellenberger *et al.*, 1992) der Leucinrest an #7 gegen einen Glycinrest ausgetauscht und so eine Modellstruktur des GCN^{L5G} erzeugt, sowie die Leucinreste an den Positionen #14 und #15 gegen Alaninreste ausgetauscht und so eine Modellstruktur des GCN^{Ala} erzeugt.

3 Ergebnisse zur gezielten Modifikation der Bindungseigenschaften des HisJ

3.1 Planung der Vorgehensweise

Vor der Generierung eines Repertoires für beliebige niedermolekulare Liganden durch Randomisierung der an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäurereste des HisJ sollte zunächst untersucht werden, ob sich das HisJ als Basis für ein solches Rezeptorrepertoire eignet. d.h., ob Modifikationen der Bindungstasche ohne drastische Einbußen der Stabilität und/oder generellen Funktionsweise des Proteins vorgenommen werden können. Weiterhin ist es für das Vorhaben interessant, zu analysieren, ob sich die Bindungseigenschaften des HisJ bereits durch relativ geringe Veränderungen, also z. B. einen einzigen Aminosäureaustausch, messbar verändern lassen.

Es schien naheliegend, dass die Affinitäten des HisJ für strukturell dem Histidin verwandte Moleküle, u.z. den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, durch geringfügige Modifikation der Bindungstasche, erhöht werden können. Dies sollte durch Erzeugung einer HisJ-Variante, die sich vom wt-HisJ in nur einem einzigen Rest unterscheidet, versucht werden. Als Modellprotein wurde hierfür das LAOBP aus *E. coli* gewählt.

3.1.1 Das LAOBP aus *E. coli* als Modellprotein für die Generierung einer HisJ-Variante mit erhöhter Affinität für Arginin und Lysin

Bei LAOBP (Lysin-, Arginin-, Ornithin-Bindeprotein) handelt es sich wie bei HisJ um ein periplasmatisches Rezeptorprotein, welches Teil eines ABC-Transportsystems ist. Während HisJ den Transport von Histidin ins Zellinnere ermöglicht, ist LAOBP für die Beförderung von Lysin, Arginin und Ornithin durch die Cytoplasmamembran zuständig, wobei es seine Liganden an den membranständigen HisQMP-Komplex weiterleitet, über den sie in den cytoplasmatischen Raum geschleust werden. Unter allen bekannten periplasmatischen Rezeptorproteinen ist das LAOBP das dem HisJ am nächsten verwandte Protein: es ist auf Aminosäureebene zu 70% mit dem HisJ sequenzidentisch (Higgins & Ames, 1981), besteht ebenfalls aus 238 Aminosäuren und besitzt mit 27000 Da dieselbe relative Molmasse. Selbst die an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäurereste sind in beiden Proteinen identisch, mit einer Ausnahme: das LAOBP besitzt an Position #52 ein Phenylalanin, das HisJ ein Leucin. Ein Sequenzalignment beider Proteine ist in Abb. 12 dargestellt.

HisJ	1	AIPQNIRIGT	DPT	Y	A	P	F	E	S	K	N	S	Q	G	E	L	V	G	F	D	I	D	L	A	K	E	L	C	K	R	I	N	T	Q	C	T	F	V	E	N	50											
LAOBP	1	ALPQTVRIGT	DTT	Y	A	P	F	S	S	K	D	A	K	E	F	I	G	F	D	I	D	L	G	N	E	M	C	K	R	M	Q	V	K	T	W	V	A	S	50													
HisJ	51	P	D	A	L	I	P	S	L	K	A	K	K	I	D	A	I	M	S	S	L	S	I	T	E	K	R	Q	Q	E	I	A	F	T	D	K	L	Y	A	A	D	S	R	L	V	V	A	K	N	S	100	
LAOBP	51	D	E	D	A	L	I	P	S	L	K	A	K	K	I	D	A	I	I	S	S	L	S	T	T	D	K	R	Q	Q	E	I	A	F	S	D	K	L	Y	A	A	D	S	R	L	I	A	A	K	G	S	100
HisJ	101	D	I	Q	T	V	E	S	L	K	G	K	R	V	G	V	L	Q	G	T	T	Q	E	T	F	G	N	E	H	W	A	P	K	G	I	E	I	V	S	Y	Q	G	D	N	I	Y	S	D	L	150		
LAOBP	101	P	I	Q	T	L	E	S	L	K	G	K	H	V	G	V	L	Q	G	S	T	Q	E	A	Y	A	N	D	N	W	R	T	K	G	V	D	V	V	A	Y	A	N	Q	D	L	I	Y	S	D	L	150	
HisJ	151	T	A	G	R	I	D	A	A	F	Q	D	E	V	A	A	E	G	F	L	K	Q	P	V	G	K	D	Y	K	F	G	G	P	S	V	K	D	E	K	L	F	G	V	G	T	G	M	G	L	R	200	
LAOBP	151	T	A	G	R	L	D	A	A	L	Q	D	E	V	A	A	S	E	G	F	L	K	Q	P	A	G	K	E	Y	A	F	A	G	P	S	V	K	D	K	K	Y	F	G	D	G	T	G	V	G	L	R	200
HisJ	201	K	E	D	N	E	L	R	E	A	L	N	K	A	F	A	E	M	R	A	D	G	T	Y	E	K	L	A	K	K	Y	F	D	F	D	V	Y	G	G	238												
LAOBP	201	K	D	T	E	L	K	A	A	F	D	K	A	L	T	E	L	R	Q	D	G	T	Y	D	K	M	A	K	K	Y	F	D	F	N	V	Y	G	D	238													

Abbildung 12: Sequenzalignment von HisJ und LAOBP aus *E. coli*. Die Aminosäuren der Bindungstaschen sind farbig unterlegt. Dabei sind jene Reste gelb unterlegt, in denen sich die Rezeptorproteine nicht unterscheiden. Der Rest an Position #52, an dem sich in HisJ ein Leucin, in LAOBP ein Phenylalanin befindet, ist grün unterlegt. Das hellblau unterlegte Aspartat an Position #11 ist nur der Wechselwirkung mit den Liganden Arginin und Lysin beteiligt, für die Bindung von Histidin spielt es keine Rolle (Oh *et al.*, 1994b).

Das in beiden Proteinen an Position #11 gelegene Aspartat (in Abb. 12 hellblau unterlegt) spielt nur bei der Bindung von Arginin und Lysin eine Rolle, indem es über seine Seitenkettencarboxygruppe eine Salzbrücke zu der Guanidiniumgruppe des gebundenen Arginin, bzw. der ϵ -Aminogruppe des gebundenem Lysin herstellt, an der Bindung von Histidin ist dieser Rest nicht beteiligt (Oh *et al.*, 1994b).

Da die beiden Rezeptoren hinsichtlich den Resten ihrer Bindungstasche (in Abb. 12 gelb unterlegt) bis auf den Rest an Position #52 (in Abb. 12 grün unterlegt) identisch sind, erscheint es wahrscheinlich, dass diesem Rest eine wichtige Rolle bei der Ligandendiskriminierung zukommt, da beide Proteine zwar in der Lage sind, die Liganden des jeweils anderen Rezeptors zu binden, jedoch z.T. mit stark unterschiedlichen Affinitäten, wie von Wolf *et al.*, (1995) und Nikaido *et al.* (1992) mittels Gleichgewichtsdialyse gezeigt wurde (Tab. 1).

Tabelle 1: K_d -Werte (μM) für die Bindung der basischen L-Aminosäuren durch HisJ und LAOBP aus *Salmonella typhimurium* (Wolf, *et al.*, 1995; Nikaido, *et al.*, 1992)

	HisJ ¹⁾	LAOBP ²⁾
L-Histidin	0,03	0,5
L-Arginin	0,7	0,014
L-Lysin	300	0,015

1) Wolf, *et al.*, (1995)

2) Nikaido, *et al.*, (1992)

So bindet HisJ Histidin mit einer gegenüber LAOBP um den Faktor 17 erhöhten Affinität, welches seinerseits eine stark erhöhte Affinität für Arginin und Lysin aufweist (im Vergleich zu HisJ jeweils um den Faktor 50 bzw. 20.000). Dies deutet darauf hin, dass über einen Phenylalaninrest an Position #52 eine hohe Affinität mit Arginin bzw. Lysin bewirkt wird, während ein Leucinrest an dieser Position die Bindung von Histidin zu begünstigen scheint.

Die Struktur von LAOBP wurde sowohl in der offenen, ligandenfreien, als auch in der geschlossenen, ligandenkomplexierten (jeweils im Komplex mit Arginin, Lysin, Ornithin und Histidin) gelöst (Oh *et al.*, 1993; Oh *et al.*, 1994b). Die Struktur von HisJ wurde auf Basis der LAOBP-Struktur durch *Molecular Replacement* bestimmt, eine Überlagerung beider Strukturen (wobei ausschliesslich die an der Ligandenbindung beteiligten Reste dargestellt sind), zeigt Abb. 13.



Abbildung 13: Überlagerung der an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren des HisJ mit gebundenem Histidin (Yao *et al.*, 1994) und des LAOBP mit gebundenem Lysin (Oh *et al.*, 1993). Die Reste des HisJ sind orange, das gebundene Histidin rot dargestellt; die Reste des LAOBP sind hellblau, das gebundene Lysin dunkelblau dargestellt. An Position #52 ist der einzige Rest erkennbar, in dem sich die Bindungstaschen beider Proteine unterscheiden. In HisJ dieser Rest ein Leucin, in LAOBP ein Phenylalanin.

Für die Generierung einer HisJ-Variante mit erhöhter Affinität für Arginin und Lysin bietet es sich also an, das Leucin an Position #52 gegen ein Phenylalanin auszutauschen. Die Erzeugung, Reinigung und Charakterisierung einer HisJ^{L52F}-Variante ist in den folgenden Abschnitten beschrieben. Das HisJ^{L52F} wurde hinsichtlich seiner biochemischen Charakteristika mit gereinigtem wt-HisJ verglichen, die Bindungsstudien wurden zudem mit gereinigtem *E. coli* LAOBP durchgeführt, da alle von (Wolf *et al.*, 1995) und (Nikaido *et al.* 1992) erzielten Ergebnisse auf Experimenten mit LAOBP und HisJ aus *Salmonella typhimurium* beruhen und Daten über die entsprechenden *E. coli*-Rezeptoren nicht vorliegen. Da aber die Planung des Projektes aufgrund der Sequenz- und Strukturdaten der *E. coli* Proteine vorgenommen wurde, erscheint es sinnvoll, die ebenfalls auf dem *E. coli* HisJ basierende Variante HisJ^{L52F} mit verwandten Rezeptorproteinen aus demselben Organismus zu vergleichen, um mögliche Abweichungen im Bindungsverhalten aufgrund von Unterschieden in Sequenz und/oder Struktur zwischen den *E. coli* und den *S. typhimurim* Proteinen ausschließen zu können.

3.2 Klonierung der HisJ-Varianten und des LAOBP

3.2.1 Amplifizierung und Klonierung des wt-*hisJ* aus *E. coli*

Für die Klonierung des *hisJ*-Gens in den Expressionsvektor pASK75 wurde das Gen mittels PCR aus chromosomaler DNA des *E. coli* Stammes HS 3018 (Shuman, 1982) amplifiziert (zur Präparation chromosomaler *E. coli* DNA siehe Abschnitt 2.2.3.1). Als Primer dienten die Oligonukleotide HisJDOWN (der 5' die *blunt*-Schnittstellen *StuI* und *PvuII* besitzt) und HisJ6HUP (der 3' eine *BglII*-Schnittstelle trägt, gefolgt von sechs Kodonen für die Aminosäure Histidin, einem *ochre*-Stopcodon und einer *HindIII*-Schnittstelle). Die PCR wurde wie unter Abschnitt 2.2.5 beschrieben, durchgeführt, die *Annealing*-Temperatur wurde gemäss Formel [1.1], (Abschnitt 2.2.5) berechnet und betrug 55°C.

Das PCR-Produkt wurde nach einer Ethanol-fällung (Abschnitt 2.2.7.1) über die Schnittstellen *StuI* und *HindIII* in den Expressionsvektor pASK75 (Skerra, 1994) einligiert (Abschnitte 2.2.6.1 und 2.2.6.2). Auf diese Weise wurde der Vektor pASKHisJ6H (Abb. 8, Abschnitt 2.1.2.4) erzeugt. In diesem Vektor befindet sich 5' des *hisJ*-Gens eine *ompA*-Signalsequenz für die Translokation der Polypeptidkette in das Periplasma und 3' des *hisJ*-Gens vor dem Stop-Kodon sechs Kodone für die Aminosäure Histidin, wodurch eine Reinigung des Proteins über IMAC ermöglicht wird. Nach der Ligation wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α (Hanahan, 1983) mit dem Konstrukt transformiert (Abschnitt 2.2.2.1) und auf Selektivagar (Amp⁵⁰) ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden vier der auf den Platten gewachsenen Kolonien in 50 ml dYT/Amp⁵⁰ angeimpft und nach Inkubation bei 37°C ü.N. einer präparativen Plasmidpräparation (Abschnitt 2.2.3.2) unterzogen.

Um zu überprüfen, ob das *hisJ*-Gen korrekt amplifiziert und kloniert worden war, wurde die Plasmid-DNA im Göttinger Genomlabor sequenziert. Als Sequenzprimer wurden die Oligonukleotide pASKdown und pASKup verwendet, die jeweils ca. 50 bp vor, bzw. hinter dem *hisJ*-Gen binden.

Die Plasmid-DNA aller vier analysierten Klone enthielt das korrekte *hisJ*-Gen, einschliesslich des C-terminalen Hexa-Histags.

3.2.2 Erzeugung und Klonierung des *hisJ*^{L52F}-Gens

Als Template für die *hisJ*^{L52F}-Variante diente der Vektor pASKHisJ6H. Die Mutation von Leucin zu Phenylalanin an Position #52 wurde mittels PCR über das Oligonukleotid hisJL52F eingeführt. Im *hisJ*-Gen befindet sich 90 bp hinter dem Startcodon eine singuläre *EcoRV*-Site. Der Mutageneseprimer hisJL52F wurde so definiert, dass er in einem Bereich von fünf Basenpaaren 5' der *EcoRV*-Site bis acht Basenpaaren 3' des L#52-Kodons mit dem *hisJ*-Gen identisch ist, jedoch statt des für die Aminosäure #52 kodierenden Kodons ctg für Leucin, das Kodon ttt für Phenylalanin trägt. Als Gegenprimer für die Amplifikation wurde das Oligonukleotid HisJBglup gewählt. Die PCR wurde wie unter Abschnitt 2.2.5 beschrieben durchgeführt, die *Annealing*-Temperatur wurde gemäss Formel [1.1], Abschnitt 2.2.5) berechnet und betrug 58°C.

Das PCR-Produkt wurde mit Ethanol gefällt (Abschnitt 2.2.7.1) und anschliessend über die Schnittstellen *EcoRV* und *BglIII* in den Expressionsvektor pASKΔHisJ90-714 inkloniert (Abschnitte 2.2.2.1 und 2.2.6.2.) Die Mutagenese und die Klonierung sind schematisch in Abb. 14 dargestellt.

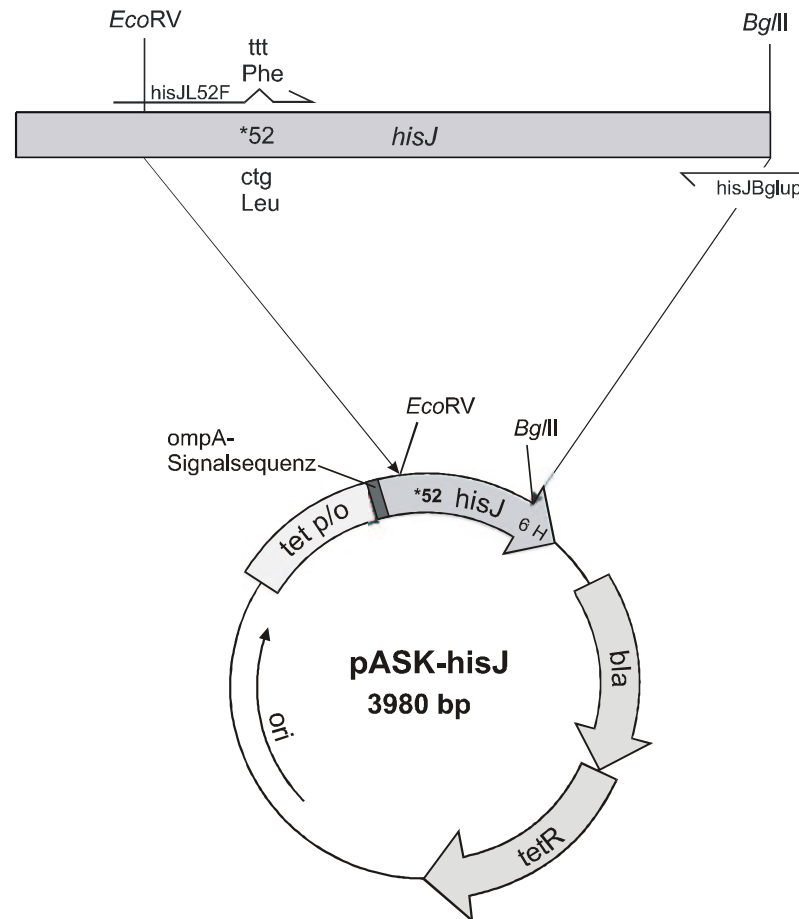


Abbildung 14: Erzeugung und Klonierung des *hisJ*^{L52F}-Gens. Über das Oligonukleotid *hisJL52F* wurde an der für die Position kodierenden Stelle im *hisJ*-Gen das Kodon ttt für Phenylalanin eingeführt. Das PCR-Produkt nach Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *Bg/II* in den Vektor pASKΔ90-714HisJ, aus dem zuvor mit denselben Restriktionsenzymen das entsprechende Fragment ausgeschnitten worden war, einligiert und auf diese Weise der Vektor pASKHisJ^{L52F}6H erzeugt.

Der so erzeugte Vektor pASKHisJ^{L52F}6H ist mit dem Vektor pASKHisJ6H identisch, ausser, dass er ein ttt für Phenylalanin anstatt eines ctg für Leucin an der für die Position #52 kodierenden Stelle im *hisJ*-Gen besitzen sollte. Die Transformation des *E. coli* Stamms DH5α (Hanahan, 1983), die Plasmidpräparation und die Sequenzierung des mutagenisierten *hisJ* wurde analog zu der unter Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Die Sequenzanalyse ergab, dass drei von vier präparierten Plasmiden das Kodon ttt für Phenylalanin an der gewünschten Position trugen, nur ein Klon wies hier die Wildtypsequenz (ctg für Leucin) auf.

3.2.3 Klonierung des *argT*-Gens aus *E. coli*

Um das für die Mutagenese des HisJ als Modellprotein dienende LAOBP hinsichtlich seiner Affinitäten für die basischen Aminosäuren mit den HisJ-Varianten vergleichen zu

können, sollte auch dieses Rezeptorprotein aus *E. coli* gereinigt werden. Dafür wurde das für LAOBP kodierende Gen *argT* über die Oligonukleotide LAOdown und LAOup mittels PCR aus genomischer DNA des *E. coli*-Stamms HS 3018 amplifiziert, über die Schnittstellen *StuI* und *BglIII* in den Vektor pASK Δ HisJ einkloniert und so das Plasmid pASKLAO6H erzeugt. Nach Transformation des *E. coli*-Stammes DH5 α mit dem Vektor wurden vier Kolonien einer Plasmidpräparation und anschließender Sequenzanalyse unterzogen. Alle vier Klone enthielten den pASK-Vektor mit der korrekten *argT*-Sequenz. (Die Vorgehensweise der Klonierung des *argT*-Gens entsprach der unter Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Klonierung des *hisJ*-Gens.)

3.3 Expression und Reinigung der HisJ-Varianten und des LAOBP

3.3.1 Untersuchung der Akkumulation der HisJ6H-Varianten und des LAOBP im Periplasma von *E. coli*

In den pASK-Vektoren stehen die Gene *hisJ*^(L52F) bzw. *argT* unter der Transkriptionskontrolle des *tet*-Promotors, ausserdem befindet sich auf diesen Plasmiden auch das Strukturgen für den *tet*-Repressor, welcher die *tet*-Promotor-/Operatorregion bindet und so die Transkription der unter Kontrolle dieser Region stehenden Gene reprimiert (Skerra, 1994). Durch Induktion mit Anhydrotetracyclin (aTc) wird der Repressor von der *tet*-Promotor-/Operatorregion abgelöst und somit die Transkription der HisJ-Varianten ermöglicht. Um für die Reinigung der Proteinvarianten einschätzen zu können, wie stark die Akkumulation der HisJ-Varianten und des LAOBP zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion im Periplasma von *E. coli* ist, wurden analytische Präparationen der periplasmatischen Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion mittels SDS-Page (im Falle des LAOBP) bzw. immunochemischer Analyse unter Verwendung eines α -HisJ-Antikörper (im Falle des HisJ und des HisJ^{L52F}) auf Anwesenheit und Menge der jeweiligen Rezeptorvarianten untersucht. Dazu wurden CaCl₂-kompetente Zellen des Expressionsstamms HS 3018 (Shuman, 1982) jeweils mit den Plasmiden pASKHisJ6H, pASKHisJ^{L52F}6H bzw. pASKLAO6H transformiert (Abschnitt 2.2.2.1) und auf LBamp¹⁰⁰-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37°C ü.N. wurde je eine Kolonie pro Variante isoliert und in 5 ml dYT/Amp¹⁰⁰ ü.N. auf dem Roller inkubiert. Von diesen Kulturen wurde je ein 50 ml dYT/Amp¹⁰⁰-Kolben mit 500 μ l angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 37°C geschüttelt. Dann wurden von jeder Kultur 2 ml entnommen, abzentrifugiert und das die Zellen enthaltende Pellet auf Eis gelagert. Die 50 ml Kulturen wurden dann mit 50 μ l aTc (200 μ g/ml) induziert und weiter bei 37°C geschüttelt. Nach je 1 h, 2 h und 3 h wurden 2 ml-Aliquots von den Kulturen entnommen, abzentrifugiert und auf Eis gelagert, dann wurden die periplasmatischen Proteine wie unter Abschnitt 2.3.1 beschrieben, präpariert.

Je 15 μl der periplasmatischen Proteinextrakte wurden auf ein 12,5%-SDS-Gel aufgetragen und über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.5) analysiert. Dann wurden die Proteine, der Kulturen, die das HisJ-, bzw. das HisJ^{L52F} exprimierten wie unter Abschnitt 2.3.6 beschrieben auf eine Nitrozellulosemembran transferriert und die HisJ-Varianten immunochemisch nachgewiesen (Abschnitt 2.3.7), das Ergebnis ist in Abb. 15 gezeigt.

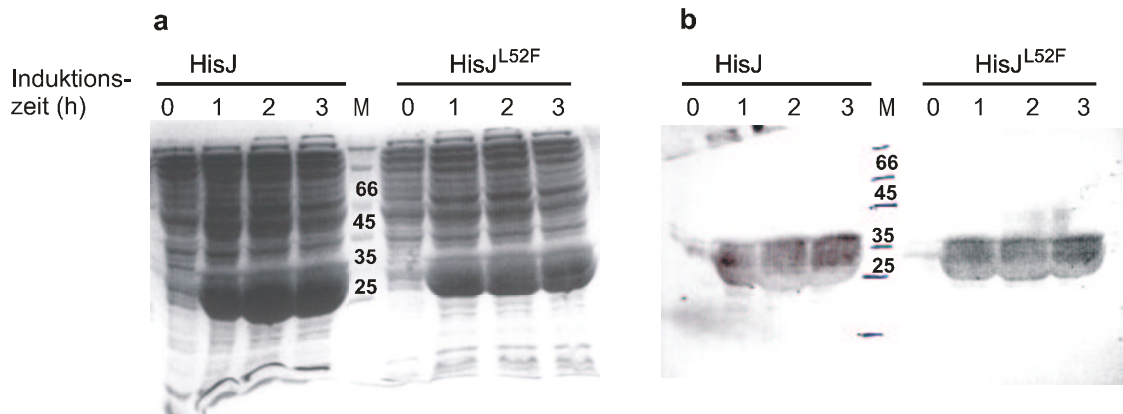


Abbildung 15: Nachweis der Akkumulation der HisJ-Varianten im Periplasma des *E. coli*-Stammes HS 3018 nach Induktion mit 50 μl aTc (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Links (a): Gelelektrophoretische Analyse, 12,5%-iges SDS-PAA-Gel, *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. Rechts (b): Immunochemischer Nachweis der HisJ-Varianten mit einem HisJ-spezifischem Antikörper. M: Molmassenstandard ($M_r \times 10^{-3}$). Es wurden je 15 μl aus 300 μl periplasmatischen Proteinextraktes aufgetragen. Die Induktionszeit gibt den Zeitpunkt in h nach der Induktion an, zu dem das Wachstum der Zellen gestoppt und die periplasmatischen Proteine präpariert wurden.

Vor der Induktion mit aTc nur ist eine schwache HisJ- bzw. HisJ^{L52F}-Bande zu erkennen, die vermutlich dem von dem Expressionstamm chromosomal kodierten HisJ entspricht, welches ebenfalls im Periplasma vorliegt. Bereits 1 h nach Induktion mit aTc ist eine deutliche Akkumulation der HisJ-Varianten im Periplasma zu erkennen, die auch im weiteren Wachstumsverlauf kaum weiter ansteigt.

Die HisJ^{L52F}-Variante akkumuliert in ungefähr denselben Mengen wie das wt-HisJ und ein starker Abbau durch periplasmatische Proteasen ist nicht zu beobachten.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich die eingeführte Mutation nicht negativ auf die Faltung des Proteins auswirkt. Die Präparationen der Kulturen, die das Plasmid pASKLAO6H enthielten, wurden ebenfalls einer SDS-PAGE unterzogen, allerdings wurde auf einen immunochemischen Nachweis verzichtet, da kein Antikörper gegen LAOBP vorlag und der α -HisJ-Antikörper das LAOBP nicht erkennt. Das Ergebnis ist in Abb. 16 dargestellt.

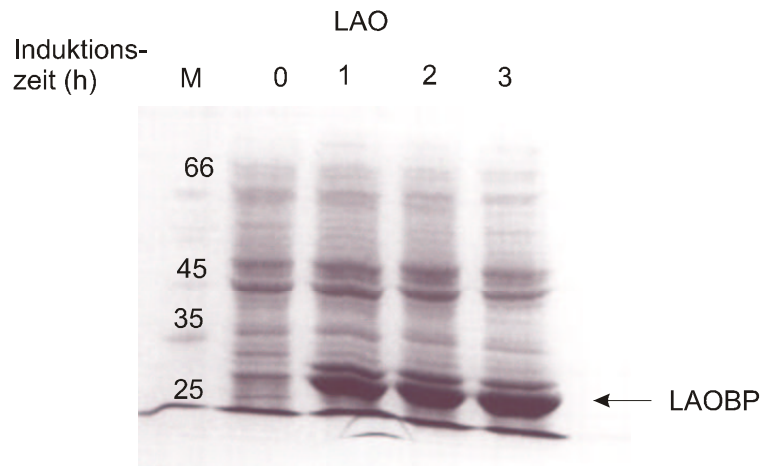


Abbildung 16: Nachweis der Akkumulation von LAOBP im Periplasma des *E. coli*-Stammes HS 3018 nach Induktion mit 50 μ l aTc (200 μ g/ml). Gelelektrophoretische Analyse, 12,5%-iges SDS-PAA-Gel, *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. M: Molmassenstandard ($M_r \times 10^{-3}$). Es wurden je 15 μ l aus 300 μ l periplasmatischen Proteinextraktes aufgetragen. Die Induktionszeit gibt den Zeitpunkt in h nach der Induktion an, zu dem das Wachstum der Zellen gestoppt und die periplasmatischen Proteine präpariert wurden.

Auch LAOBP akkumuliert bereits eine Stunde nach Induktion mit aTc in deutlichen Mengen im Periplasma, auch hier ist keine nennenswerte Steigerung der Akkumulation über einen Zeitraum von bis zu drei Stunden nach der Induktion erkennbar.

3.3.2 Reinigung der HisJ-Varianten und des LAOBP

Für die Reinigung der beiden HisJ-Varianten bzw. des LAOBP wurde je ein Liter dYT/Amp¹⁰⁰ mit 20 ml einer Vorkultur des Expressionsstammes HS 3018 (Shuman, 1982), der das entsprechende pASK-Konstrukt trug, angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9-1,0 bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Kulturen mit 100 μ l aTc (2 mg/ml) induziert und für weitere 2 h inkubiert. Nun wurden die periplasmatischen Proteine wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben, präpariert und anschliessend die HisJ-Varianten sowie LAOBP mittels ihres C-terminalen Hexa-Histag über IMAC (Abschnitt 2.3.3) gereinigt. Abb. 17 zeigt SDS-Gelbilder, auf denen die verschiedenen Schritte der Reinigung zu sehen sind.

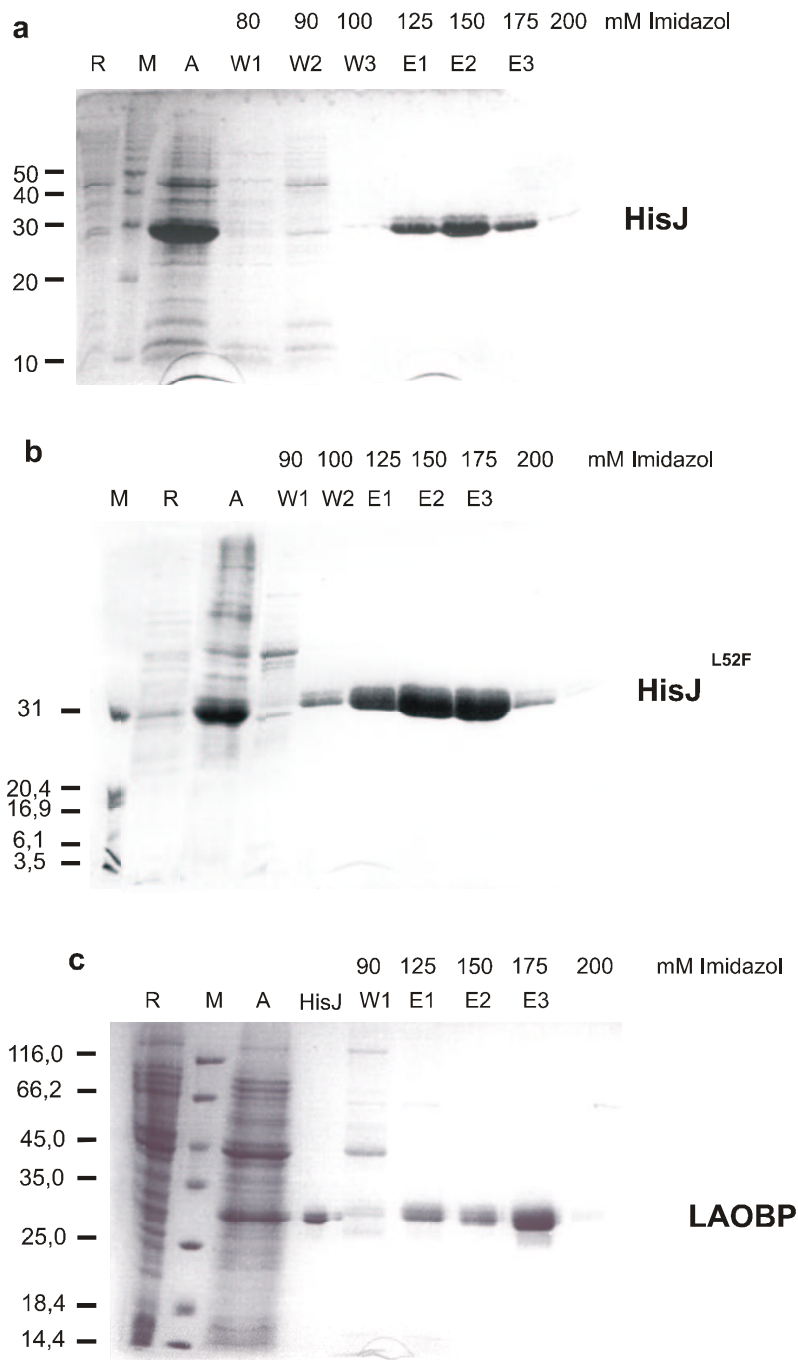


Abbildung 17: Gelelektrophoretische Analyse der Reinigung von HisJ (a), HisJ^{L52F} (b) und LAOBP (c) nach Akkumulation im Periplasma des *E. coli*-Stammes HS 3018 (Shuman, 1982). 12,5%-ige SDS-PAA-Gele, *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. M: Molmassenstandard ($M_r \times 10^{-3}$). R: Rohextrakt der periplasmatischen Proteine vor der Induktion mit aTc (Auftrag: 15 μ l aus 300 μ l periplasmatischer Proteinpräparation); A: Säulenauftrag (15 μ l aus 20 ml periplasmatischer Proteinpräparation, die nach 2 h Induktion mit aTc aus einer 1 l Bakterienkultur angefertigt wurde); W1-W3: Waschschrte mit je 5 ml Imidazol angegebener Konzentration (Auftrag: 15 μ l aus 5 ml); E1-E3: Elutionsfraktionen mit je 5 ml Imidazol angegebener Konzentration (Auftrag: 15 μ l aus 5 ml). In (c) wurde als Kontrolle ausserdem in Spur 4 gereinigtes HisJ (Auftrag: 5 μ l einer HisJ-Lösung der Konzentration 100 μ M). Alle Rezeptorvarianten besitzen eine relative Molmasse von 30000.

Die HisJ-Varianten sowie LAOBP eluieren bei Imidazolkonzentrationen von 125-175 mM. Diese Fraktionen wurden jeweils vereinigt und ü.N. bei 4°C gegen 5 l 8 M Harnstoff dialysiert. Auf diese Weise wurden die Proteine denaturiert und möglicherweise noch gebundene Liganden entfernt. Für die Renaturierung wurden die Fraktionen zweimal

gegen je 5 l 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,7 dialysiert. Anschliessend wurden die Proteinkonzentrationen unter Verwendung der Formeln [2.1] und [2.2] (Abschnitt 2.3.4) bestimmt. Alle drei Proteinvarianten konnten mit einer Ausbeute von ca. 15 mg pro Liter Bakterienkultur gereinigt und für die nachfolgend beschriebenen biochemischen Untersuchungen eingesetzt werden.

3.4 Bestimmung der Faltungstabilität der ligandenfreien HisJ-Varianten

Um zu untersuchen, ob die Mutation L52F Auswirkungen auf die Stabilität des HisJ hat, wurden die freien Entfaltungsenergien ($\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ -Werte) beider Proteinvarianten durch Aufnahme der De- und Renaturierungskurven bestimmt (Abschnitte 2.4.6 bis 2.4.9). Hierfür wurden je drei Parallelansätze gleicher Harnstoff- und Proteinkonzentration angesetzt und fluorimetrisch vermessen. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen und mit dem Analyseprogramm SigmaPlot mittels nichtlinearer Regression nach der Formel [8.10] eine Kurve durch die Auftragspunkte gefittet (Abschnitt 2.4.9).

$$F = a \cdot [\text{Urea}] - (a \cdot [\text{Urea}] + b - (c \cdot [\text{Urea}] - d)) \cdot \frac{\exp\left\{\frac{m[\text{Urea}] - [\text{Urea}]_{1/2}}{RT}\right\}}{1 + \exp\left\{\frac{m[\text{Urea}] - [\text{Urea}]_{1/2}}{RT}\right\}} \quad [8.10]$$

Exemplarisch sind die Denaturierungskurven des wt-HisJ sowie des HisJ^{L52F}, basierend auf den Daten je eines der drei Ansätze, in Abb. 18 dargestellt.

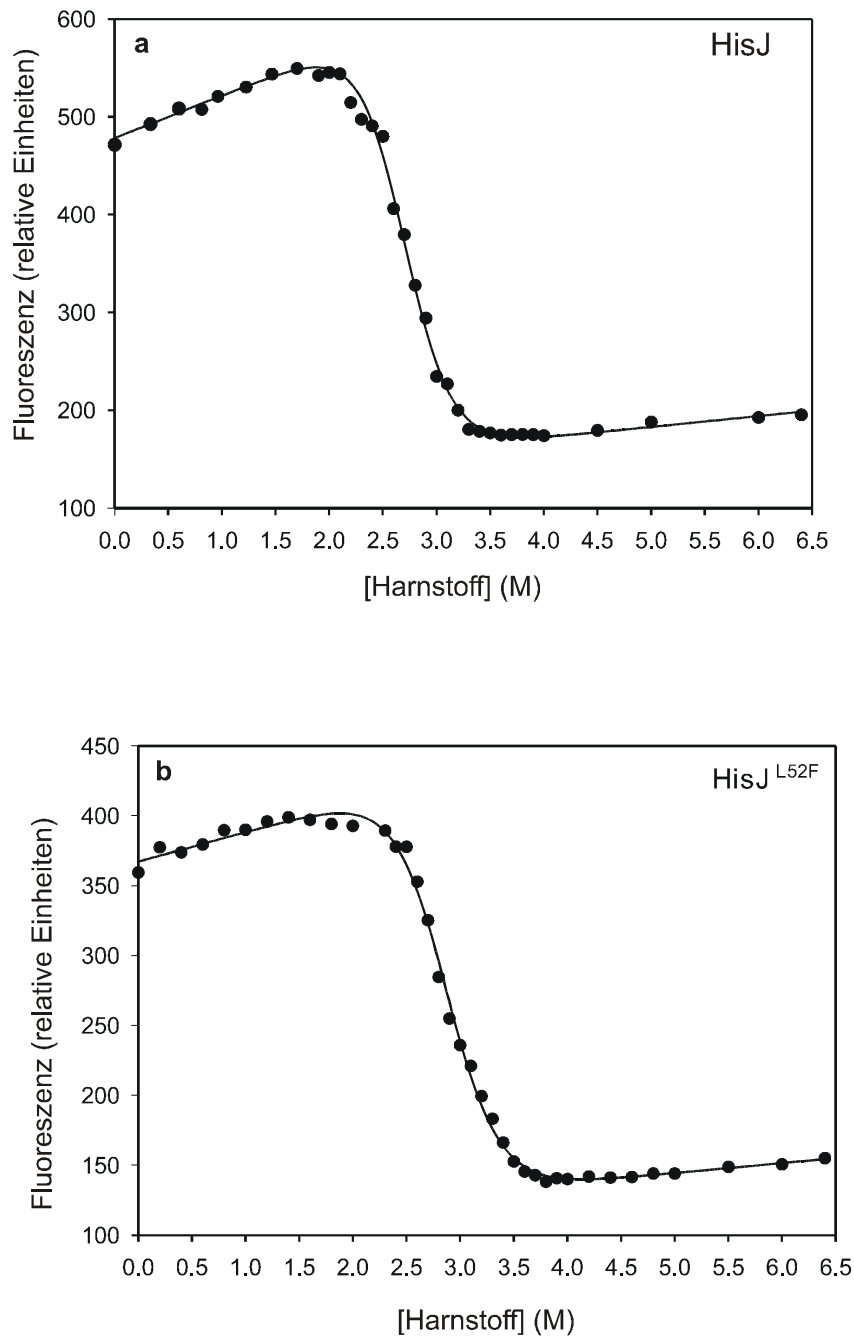


Abbildung 18: Denaturierung des wt-HisJ (a) und des HisJ^{L52F} (b). Aufgetragen sind die Fluoreszenzmesswerte der Proteinvarianten bei 330 nM gegen die eingesetzte Harnstoffkonzentration. Die Kurven wurden mit dem Analyseprogramm SigmaPlot mittels nichtlinearer Regression nach der Formel [8.10] durch die Messwerte gefittet. Als Puffer wurde 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,7 verwendet, die Anregungswellenlänge zur Fluoreszenzmessung betrug 295 nM.

Anhand mehrerer Messpunkte können die ΔG_U -Werte bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen in der Transitionsphase ermittelt nach der Formel

$$\Delta G_U = -RT \cdot \ln(K_U) = -RT \cdot \ln \frac{(F_F - F)}{(F - F_U)} \quad [8.6]$$

aus den von SigmaPlot berechneten Parametern a,b,c und d nach Formel [8.11], (Abschnitt 2.4.9.) berechnet werden.

$$\Delta G_U = -RT \cdot \ln \left\{ \frac{(a \cdot [\text{Urea}] + b - F)}{(F - c \cdot [\text{Urea}] - d)} \right\} \quad [8.11]$$

Die freie Energie der Entfaltung zeigt einen linearen Verlauf mit steigender Harnstoffkonzentration. Durch Extrapolation dieser Geraden lässt sich bei 0 M Harnstoff die freie Entfaltungsenergie ($\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$) in Abwesenheit von Denaturierungsmittel bestimmen. In Abb. 19 sind die Ergebnisse der De- und Renaturierungsstudien beider HisJ-Varianten dargestellt, in Tab. 2 die berechneten $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ -Werte zusammengefasst.

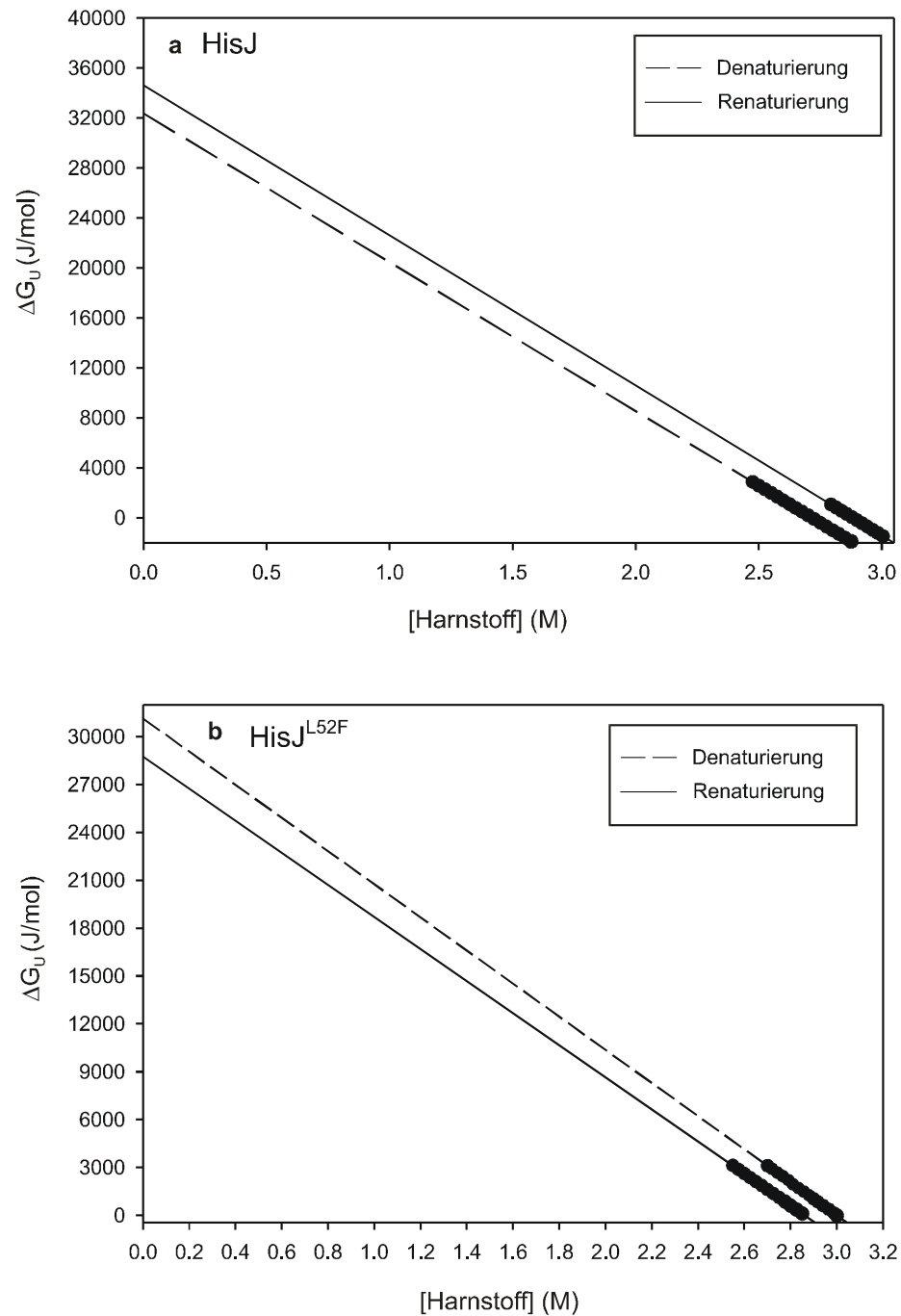


Abbildung 19: Bestimmung der ΔG^{H_2O} -Werte des wt-HisJ (a) und des HisJ^{L52F} (b). Aus den Messpunkten der Transitionsphase wurden nach Gleichung [8.11] die ΔG_U -Werte berechnet und gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen. Durch Extrapolation der Gerade gegen 0 M Harnstoff wurde der ΔG^{H_2O} -Wert in Abwesenheit von Denaturierungsmittel bestimmt. Die gestrichelten Geraden wurden basierend auf Denaturierungsstudien, die durchgezogenen Linien basierend auf Renaturierungsstudien erstellt.

Tabelle 2: $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ -Werte (kJ/mol) der reversiblen Entfaltung der HisJ-Varianten nach Gleichung [8.11]. Angegeben sind die Mittelwerte dreier unabhängiger De- bzw. Renaturierungsstudien, sowie die Standardabweichungen vom Mittelwert.

	HisJ	HisJ ^{L52F}
Denaturierung	-31,6 ± 2,8	-29,9 ± 2,6
Renaturierung	-33,4 ± 3,3	-30,7 ± 3,1

Die Daten zeigen, dass sich die Faltungstabilität von HisJ^{L52F} mit $-29,9 \pm 2,6$ kJ/mol (Denaturierung) bzw. $-30,7 \pm 3,1$ kJ/mol (Renaturierung) nicht wesentlich von der des wt-HisJ ($-31,6 \pm 2,8$ kJ/mol bzw. $-33,4 \pm 3,3$ kJ/mol) unterscheidet. Daraus kann geschlossen werden, dass der Austausch von Leucin nach Phenylalanin an Position #52 nicht zu einer drastischen Änderung der konformationellen Stabilität des HisJ führt.

3.5 Untersuchung der Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit verschiedenen Liganden

3.5.1 Untersuchung der Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit basischen L-Aminosäuren mittels Fluoreszenzspektroskopie

Ein Verfahren, die Wechselwirkung von HisJ mit verschiedenen Liganden zu untersuchen, ist die Fluoreszenzspektroskopie. Dabei macht man sich die bereits unter Abschnitt 1.3 erwähnte Konformationsänderung, die HisJ während der Ligandenbindung erfährt, zunutze. Diese lässt sich aufgrund der Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des singulären Tryptophanrestes an Position #130 nachweisen: regt man das Trp130 mit Licht der Wellenlänge 295 nm an und nimmt das Emissionsspektrum auf, so ergibt sich eine für HisJ charakteristische Emissionskurve mit einem Maximum bei 330 nm. Dieses Maximum fällt umso höher aus, je mehr HisJ-Moleküle im ligandenkomplexierten Zustand vorliegen und steigt nicht mehr an, wenn HisJ mit gebundenem Ligand gesättigt ist (Miller *et al.*, 1983; Wolf *et al.*, 1995, 1996)

Ob HisJ mit einem Liganden wechselwirkt, lässt sich also einfach ermitteln, indem man den Liganden im Überschuss mit dem Protein inkubiert, die Tryptophanfluoreszenz misst und sie mit der des ligandenfreien HisJ vergleicht. Bei einer Sättigung des Proteins mit Ligand sollte das Maximum des Emissionsspektrums im Vergleich zu dem des freien Proteins deutlich erhöht sein.

Um die Funktionalität der HisJ-Varianten zu überprüfen und eine qualitative Aussage über ihre Fähigkeiten, die basischen Aminosäuren Histidin, Arginin und Lysin zu binden, treffen zu können, wurden beide Varianten mit einem hohen Überschuss an den entsprechenden Liganden (jeweils 1 mM Ligand bei einer Rezeptorkonzentration von 1 μM)

inkubiert und dann die Tryptophanfluoreszenz bestimmt (Abschnitt 2.4.4). Zum Vergleich wurden ausserdem die freien Rezeptoren und als Negativkontrolle die HisJ-Varianten nach Inkubation mit je 1 mM Serin fluorimetrisch vermessen. Bei dieser Messung sollte keine Erhöhung der Tryptophanfluoreszenz festzustellen sein, da Serin kein natürlicher Ligand von HisJ ist.

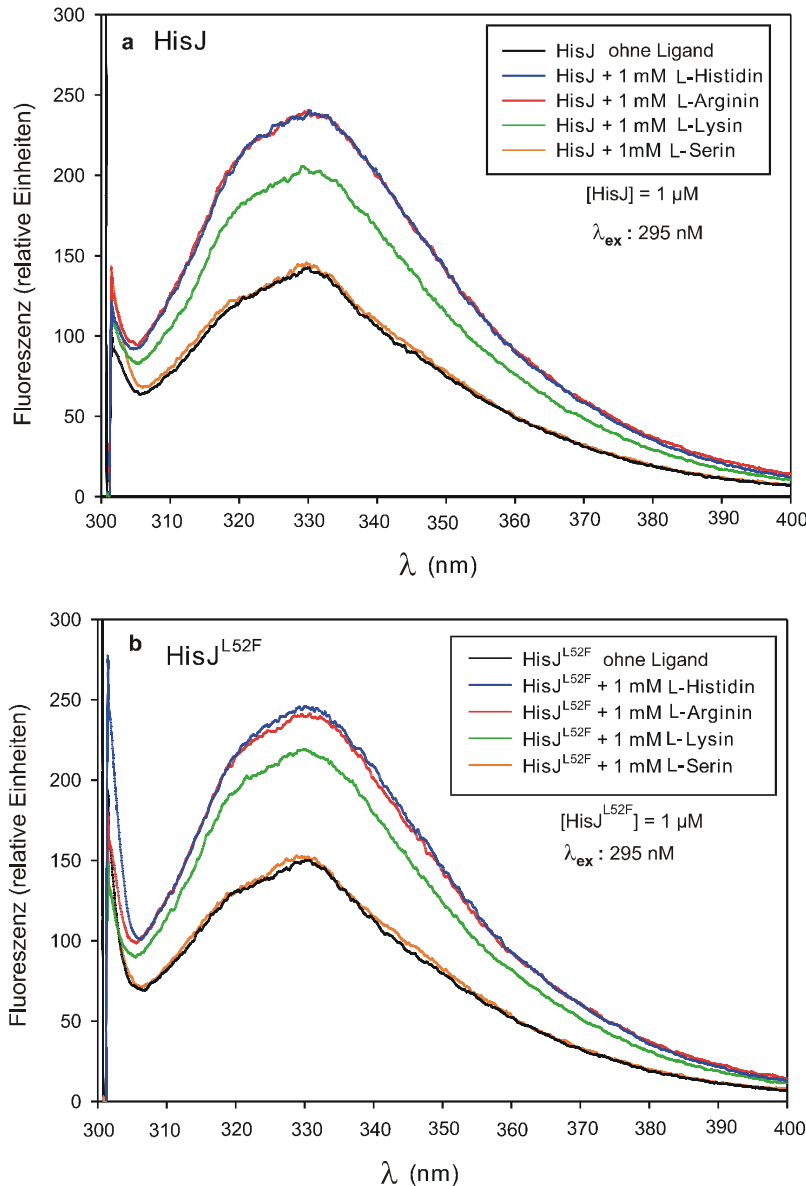


Abbildung 20: Untersuchung der Wechselwirkung des wt-HisJ (a) und des HisJ^{L52F} (b) mit verschiedenen L-Aminosäuren mittels Fluoreszenzspektroskopie. Es wurden konstante Rezeptorkonzentrationen von 1 μM eingesetzt und die Fluoreszenzspektren nach Inkubation mit verschiedenen Liganden, bzw. ohne Zusatz von Ligand, nach Anregung des singulären Tryptophanrestes an #130 aufgenommen. Aufgetragen wurden die Fluoreszenzwerte in relativen Einheiten gegen die Wellenlänge (λ) in nm. Erhöhung der Tryptophanfluoreszenz gegenüber der ohne Ligandenzusatz vermessenen Probe kann als Interaktion der HisJ-Variante mit dem entsprechenden Liganden interpretiert werden. Angegeben sind die auf Interaktion mit den HisJ-Varianten untersuchten L-Aminosäuren, sowie die Konzentration, in der sie eingesetzt wurden. Als Puffer wurde 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,7 verwendet, die Anregungswellenlänge (λ_{ex}) betrug 295 nm.

Wie erwartet, zeigen beide HisJ-Varianten keine nennenswerte Änderung der Tryptophanfluoreszenz nach Zugabe von Serin, was bedeutet, dass diese Aminosäure selbst bei hoher Konzentration nicht von den HisJ-Varianten gebunden wird. Bei Zusatz von Histidin bzw. Arginin zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Tryptophanfluoreszenz, jeweils um das ca. 1,7-fache des Grundwertes. Auch die Zugabe von Lysin bewirkt eine Erhöhung der Tryptophanfluoreszenz, allerdings in beiden Fällen nur um das 1,45-fache.

Selbst bei noch höheren Lysinkonzentrationen konnte keine weitere Steigerung der Tryptophanfluoreszenz beobachtet werden.

Beide HisJ-Varianten zeigen eine ligandenkonzentrationsabhängige Erhöhung der Tryptophanfluoreszenz, d.h., es ist möglich, die Rezeptoren mit Liganden zu titrieren, bis eine Sättigung erreicht wird. Als Beispiel sind in Abb. 21 die Titrations der HisJ-Varianten mit Lysin gezeigt (aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden ausser der ligandenfreien Form nur vier Lysinkonzentrationen ausgewählt).

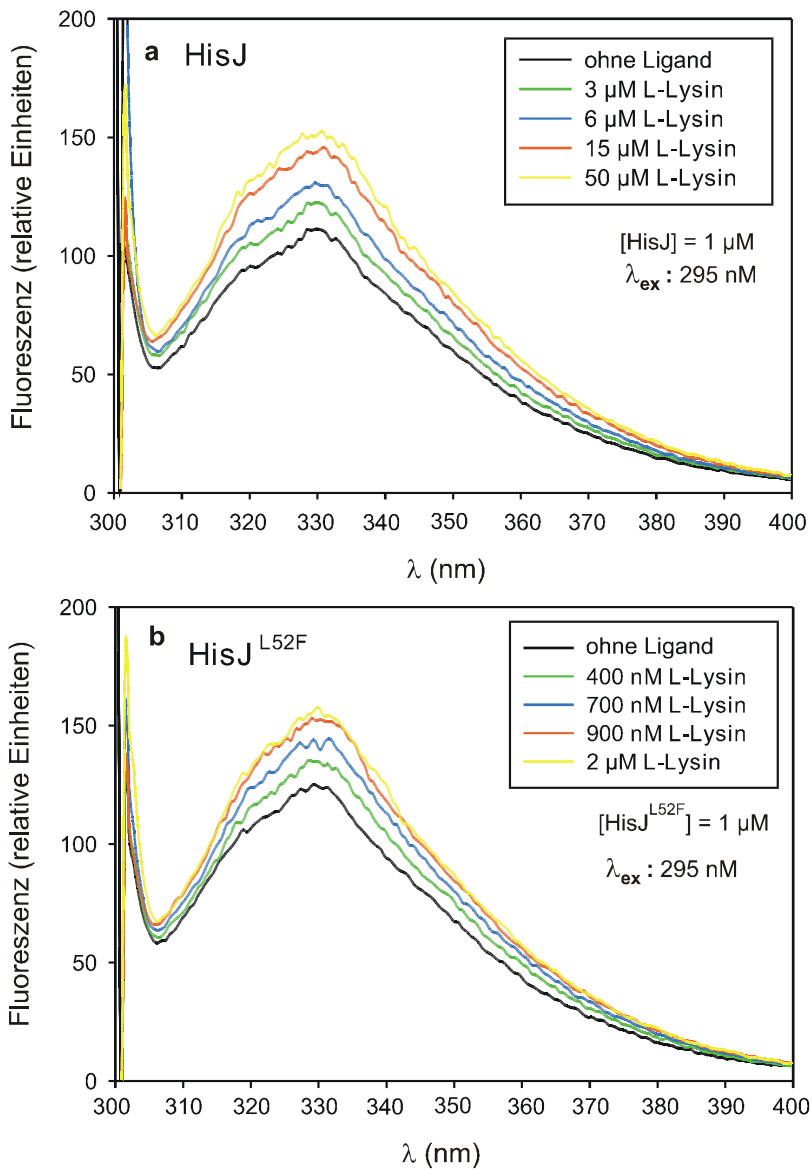


Abbildung 21: Titration der HisJ-Varianten mit L-Lysin. **a:** wt-HisJ; **b:** HisJ^{L52F}. Die Rezeptorvarianten wurden bei konstanter Konzentration von 1 µM mit ansteigenden Konzentrationen an L-Lysin inkubiert und die Fluoreszenzspektren aufgenommen. Aufgetragen wurden die Fluoreszenzwerte in relativen Einheiten gegen die Wellenlänge (λ) in nm. Angegeben ist die jeweils eingesetzte L-Lysin-Konzentration. Als Puffer wurde 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,7 verwendet, die Anregungswellenlänge (λ_{ex}) betrug 295 nm.

Wie zu erkennen, erreicht die Fluoreszenz des wt-HisJ ihren maximalen Wert erst bei vergleichsweise hohen Lysinkonzentrationen (50 µM), während HisJ^{L52F} bereits bei einer Lysinkonzentration von 2 µM mit Ligand abgesättigt ist. Aus den Fluoreszenzwerten lässt sich der Anteil an gebundenem Ligand nach Formel [7.1] (Abschnitt 2.4.5) ermitteln:

$$\text{Anteil gebunden} = \frac{\Delta F_{330}}{\Delta F_{\text{total}}} = \frac{F_{330} - F_{\text{frei}}}{F_{\text{max}} - F_{\text{frei}}} \quad [7.1]$$

Wobei ΔF_{330} den Wert der Tryptophanfluoreszenz bei 330 nm der jeweils betrachteten Probe minus dem Wert der Tryptophanfluoreszenz bei 330 nm des ligandenfreien Rezeptors (F_{frei}) darstellt und ΔF_{total} den Wert der Tryptophanfluoreszenz bei 330 nm des ligandengesättigten Rezeptors (F_{max}) minus den Wert der Tryptophanfluoreszenz bei 330 nm des ligandenfreien Rezeptors (F_{frei}). Trägt man den Anteil an gebundenem Ligand gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration auf, erhält man eine hyperbolische Kurve, wie in Abb. 22 zu sehen.

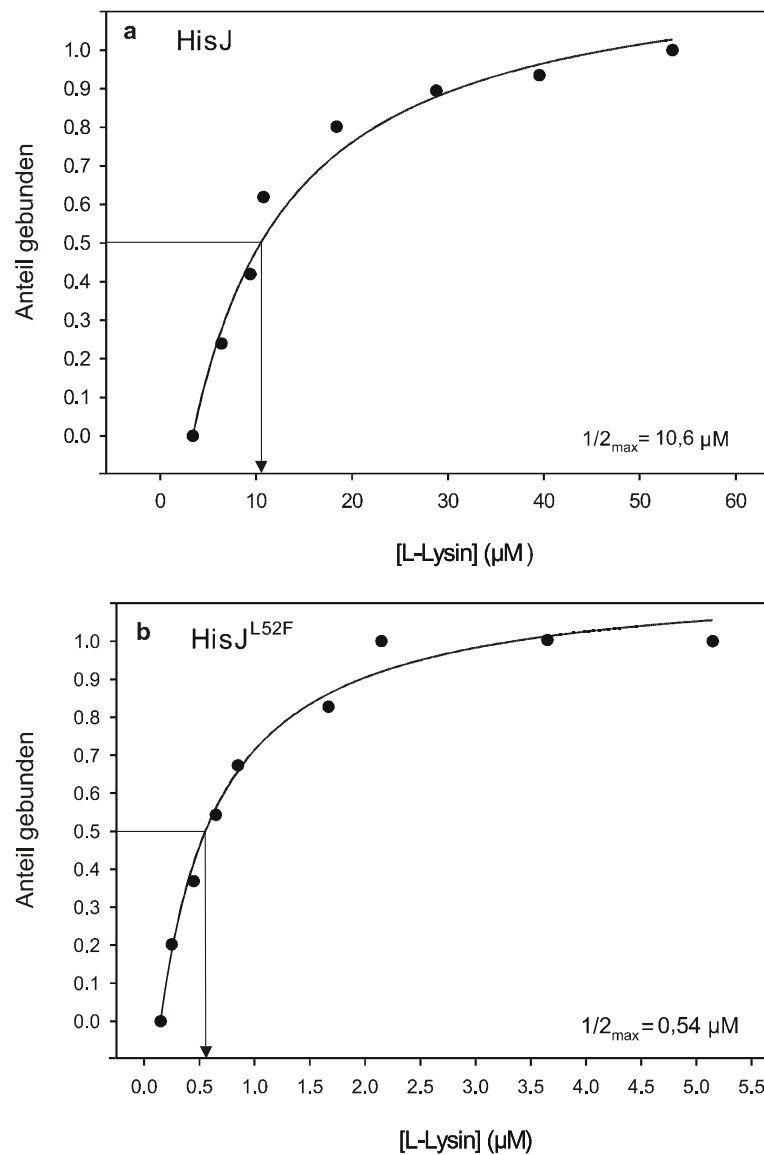


Abbildung 22: Auftragung des Anteils an durch die HisJ-Varianten gebundenem L-Lysin gegen die eingesetzte L-Lysinkonzentration. **a:** Bindung von L-Lysin durch das wt-HisJ, **b:** Bindung von L-Lysin durch HisJ^{L52F}. Der Anteil an gebundenem L-Lysin wurde anhand der Fluoreszenzwerte bei 330 nm nach Formel [7.1] berechnet und gegen die eingesetzte L-Lysinkonzentration aufgetragen. Mit dem Programm SigmaPlot wurden die Kurven mittels nichtlinearer Regression nach Formel [6.5] durch die Punkte gefittet. Die resultierende hyperbolische Kurve erreicht ein Maximum bei der L-Lysinkonzentration, bei der die entsprechende HisJ-Variante mit Ligand abgesättigt ist. Der Halbmaximalwert dieser Kurve wurde von SigmaPlot berechnet und ist jeweils angegeben.

Die Kurven wurden mit dem Programm SigmaPlot mittels nichtlinearer Regression iterativ nach der Methode der kleinsten Quadrate errechnet (Marquard-Levenberg-Algorithmus; Marquard, 1963). Das Programm berechnet ebenfalls die Ligandenkonzentration, bei der die Kurve ihren Halbmaximalwert erreicht, mittels dieses Parameters lassen sich Rückschlüsse auf die Affinität der jeweiligen HisJ-Variante für den entsprechenden Liganden ziehen. Wie in Abb. 22 zu erkennen, erreicht die Kurve der Titration des wt-HisJ mit Lysin ihren Halbmaximalwert bei einer eingesetzten Lysinkonzentration von 10,6 μM , wohingegen die Kurve der Titration von HisJ^{L52F} mit Lysin bereits bei einer Konzentration von 0,54 μM ihren Halbmaximalwert erreicht. Somit deutet sich bereits an, dass HisJ^{L52F} eine höhere Affinität für Lysin aufweist als das wt-HisJ, da es sich bei niedrigeren Lysinkonzentrationen mit diesem Ligand absättigen lässt.

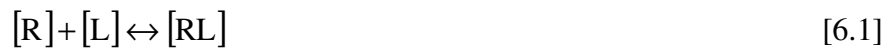
Dennoch lässt sich mit dieser Methode kein quantitativer Wert für die Affinität der beiden Proteinvarianten für basische L-Aminosäuren ermitteln. Titriert man die Proteine mit L-Histidin und L-Arginin erhält man in allen vier Fällen Halbmaximalwerte von ca. 0,5 μM (~500 nM). Wie in Tabelle 1 dargestellt, liegen die Bindungskonstanten laut Wolf *et al.*, (1995) und Nikaido *et al.*, (1992) z. T. wesentlich niedriger. Allerdings lassen sich mit dieser Art der Messung derart niedrige K_d -Werte nicht ermitteln, da sie so unempfindlich ist, dass HisJ-Konzentrationen von mindestens 1 μM eingesetzt werden müssen. Da der K_d -Wert diejenige freie Ligandenkonzentration darstellt, bei der die Hälfte der Rezeptormoleküle ligandenkomplexiert vorliegt, lassen sich bei eingesetzter Rezeptorkonzentration von 1 μM keine Bindungskonstanten im unteren nanomolaren Bereich ermitteln. (Als Beispiel: bei einer Rezeptorkonzentration von 1 μM , wie sie üblicherweise für die Fluoreszenzmessungen verwendet wurde, liegen bei einer vorgegebenen Ligandenkonzentration von 30 nM – selbst unter der Voraussetzung, dass jedes Ligandenmolekül gebunden wird – nur 3 % der Rezeptormoleküle ligandenkomplexiert vor, für 50 % Rezeptor-Ligandenkomplex müsste die Ligandenkonzentration mindestens 500 nM betragen).

Ein weiteres Problem bei der Messung der Tryptophanfluoreszenz ist die Tatsache, dass hier der Zustand des Rezeptors (ligandenfrei oder ligandenkomplexiert) betrachtet wird. Die Menge des gebundenen Liganden lässt sich nicht ermitteln. Es wird stets nur die eingesetzte Ligandenkonzentration betrachtet, der K_d -Wert berechnet sich allerdings über die freie Ligandenkonzentration (nach Hulme, E. C. and Birdsall, N.J., 1992).

Für die Ermittlung der Bindungskonstanten wird also eine Methode benötigt, bei der der Zustand des Liganden (frei oder gebunden) detektiert werden kann. Eine solche Methode stellt die Gleichgewichtsdialyse mit radioaktiv markierten Liganden dar, die im Folgenden zur Ermittlung der K_d -Werte für die Bindung der basischen L-Aminosäuren durch die HisJ-Varianten eingesetzt wurde.

3.5.2 Bestimmung der Affinitätskonstanten für die Wechselwirkung der HisJ-Varianten und des LAOBP mit basischen L-Aminosäuren mittels Gleichgewichtsdialyse

Für die reversible Bindung eines Liganden durch ein Rezeptorprotein gilt (siehe auch Abschnitt 2.4.3):



wobei [R] die freie Rezeptor-, [L] die freie Ligandenkonzentration und [RL] den Anteil an Rezeptor-Ligandenkomplex darstellt. Nach dem Massenwirkungsgesetz lässt sich Gleichung [6.2] formulieren, wobei k_d die Bindungskonstante (K_d -Wert) darstellt:

$$k_d = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} \quad [6.2]$$

Nun setzt sich die totale Rezeptorkonzentration $[R_t]$ aus der Konzentration an freiem [R] und an ligandenkomplexiertem [RL] Rezeptor zusammen, woraus sich ergibt:

$$[R] = [R_t] - [RL] \quad [6.3]$$

setzt man [3] für [R] in [6.2] ein und formuliert die Gleichung um, erhält man schließlich folgende Gleichung:

$$[RL] = \frac{[R_t] \cdot [L]}{(k_d + [L])} \quad [6.4]$$

Diese Gleichung entspricht der Formel für eine hyperbolische Kurve nach:

$$y = \frac{a \cdot x}{(b + x)} \quad [6.5] \quad (\text{nach Hulme, E. C. and Birdsall, N.J., 1992})$$

Trägt man nun den Anteil an Rezeptor-Ligandenkomplex (welcher dem Anteil an gebundenem Liganden entspricht, da die Ligandenbindung durch HisJ einer 1:1 Stöchiometrie folgt, wie die von Yao *et al.*, (1994) gelöste Kristallstruktur des HisJ im Komplex mit L-Histidin zeigt, gegen die freie Ligandenkonzentration auf, erhält man eine

hyperbolische Kurve, die Sättigung in maximaler Ligandenbindung erreicht und deren Halbmaximalwert dem K_d -Wert für die jeweilige Rezeptor-Ligandeninteraktion entspricht. Eine Möglichkeit, die Konzentration an freiem und gebundenem Ligand zu ermitteln, ist die Gleichgewichtsdialyse. Dabei werden Rezeptor und Ligand bis zur Ausbildung eines Bindungsgleichgewichtes inkubiert und anschliessend einer Dialyse unterzogen, bei der der Ligand die Dialysemembran passieren kann, der Rezeptor (sowie durch den Rezeptor gebundene Ligandenmoleküle) jedoch nicht. Auf diese Weise werden freie und gebundene Ligandenmoleküle voneinander getrennt und ihre jeweilige Konzentration kann bestimmt werden. Für die Bestimmung der Bindungskonstanten der Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit den basischen L-Aminosäuren wurden Tritium-markierte Liganden eingesetzt ([2,5- ^3H]-L-Histidin, [2,3- ^3H]-L-Arginin und [4,5- ^3H]-L-Lysin), deren Konzentration sich mittels Szintillationsmessung bestimmen lässt (Abschnitt 2.4.1). Für die Bindungsstudien wurden mehrere Ansätze hergestellt, wobei jeweils eine konstante Konzentration an tritiiertem Ligand mit variierenden Konzentrationen an unmarkiertem Ligand gemischt und dann eine konstante Menge an Rezeptor (Endkonzentration jeweils 5 μM) zugegeben wurde (siehe auch Abschnitt 2.4.2). Nach 3 h Inkubation bei RT wurden die Ansätze einer Gleichgewichtsdialyse unterzogen. Dazu wurden je 70 μl der Ansätze in die Probenkammer eines DispoDialyzersTM pipettiert, in die Pufferkammer wurden 70 μl Gleichgewichtsdialysepuffer pipettiert. Zwischen beiden Kompartimenten befindet sich eine Dialysemembran mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa, die es den Liganden ($M_r < 200$ Da) erlaubt, frei zwischen den Kompartimenten zu diffundieren, die Rezeptormoleküle ($M_r = 27$ kDa) jedoch in der Probenkammer zurückhält. Die Dialyse wurde unter konstantem Rühren ü.N. bei 4°C durchgeführt. Am nächsten Tag wurden je 2 μl sowohl aus der Proben- als auch aus der Pufferkammer entnommen und in 5 ml Quicksafe A Scintillation Liquid im *Scintillation Analyzer* vermessen. Über die Anzahl der counts pro Minute wurde die Konzentration an Ligand nach Formeln [4.1] und [4.2], (Abschnitt 2.4.1) in jedem Kompartiment berechnet. Die Konzentration an freiem Ligand entsprach jeweils der Konzentration an Ligand in der Pufferkammer, die Konzentration an gebundenem Ligand berechnete sich nach:

$$[\text{Ligand}_{\text{gebunden}}] = [\text{Ligand}_{\text{Probenkammer}}] - [\text{Ligand}_{\text{Pufferkammer}}] \quad [5.1]$$

Der Anteil an Rezeptor-Ligandenkomplex berechnete sich nach:

$$\text{Anteil}_{\text{Rezeptor-Ligandenkomplex}} = \text{Anteil}_{\text{Ligand gebunden}} = \frac{[\text{Ligand}]_{\text{gebunden}}}{\max[\text{Ligand}]_{\text{gebunden}}} \quad [5.2]$$

Wobei $[\text{Ligand}]_{\text{gebunden}}$ die nach den Formeln [4.1] und [4.1], (Abschnitt 2.4.1) berechnete Konzentration an gebundenem Ligand darstellt und $\max[\text{Ligand}]_{\text{gebunden}}$ die maximal ermittelte Konzentration an gebundenem Ligand, bei der sich die jeweilige Rezeptorvariante im ligandengesättigten Zustand befand (Abschnitt 2.4.2).

Die über Gleichgewichtsdialyse ermittelten Werte für den Anteil an Rezeptor-Ligandenkomplex und freier Ligandenkonzentration wurden in SigmaPlot übertragen und die K_d -Werte mittels nichtlinearer Regression iterativ nach der Methode der kleinsten Quadrate errechnet (Marquard-Levenberg-Algorithmus; Marquard, 1963). Wie bereits oben erwähnt, erhält man in einer Auftragung des Anteils an Rezeptor-Ligandenkomplex gegen die freie Ligandenkonzentration eine hyperbolische Kurve, deren Halbmaximalwert dem K_d -Wert der betrachteten Interaktion entspricht. Will man die Ergebnisse von Bindungsstudien eines Rezeptors mit verschiedenen Liganden, deren Affinitäten zum Rezeptor sich stark unterscheiden, in einer Abbildung darstellen, empfiehlt es sich, die Werte für die freie Ligandenkonzentration zu logarithmieren, da sich so ein grösserer Konzentrationbereich in einer Darstellung abdecken lässt (Klotz 1989). Es ergibt sich dann eine sigmoidale Kurve, deren Halbmaximalwert dem Exponent zur Basis 10 des K_d -Wertes entspricht. In Abb. 23 sind die Ergebnisse der Bindungsstudien dargestellt, wobei die Messpunkte aus je drei unabhängigen Experimenten zusammengestellt wurden.

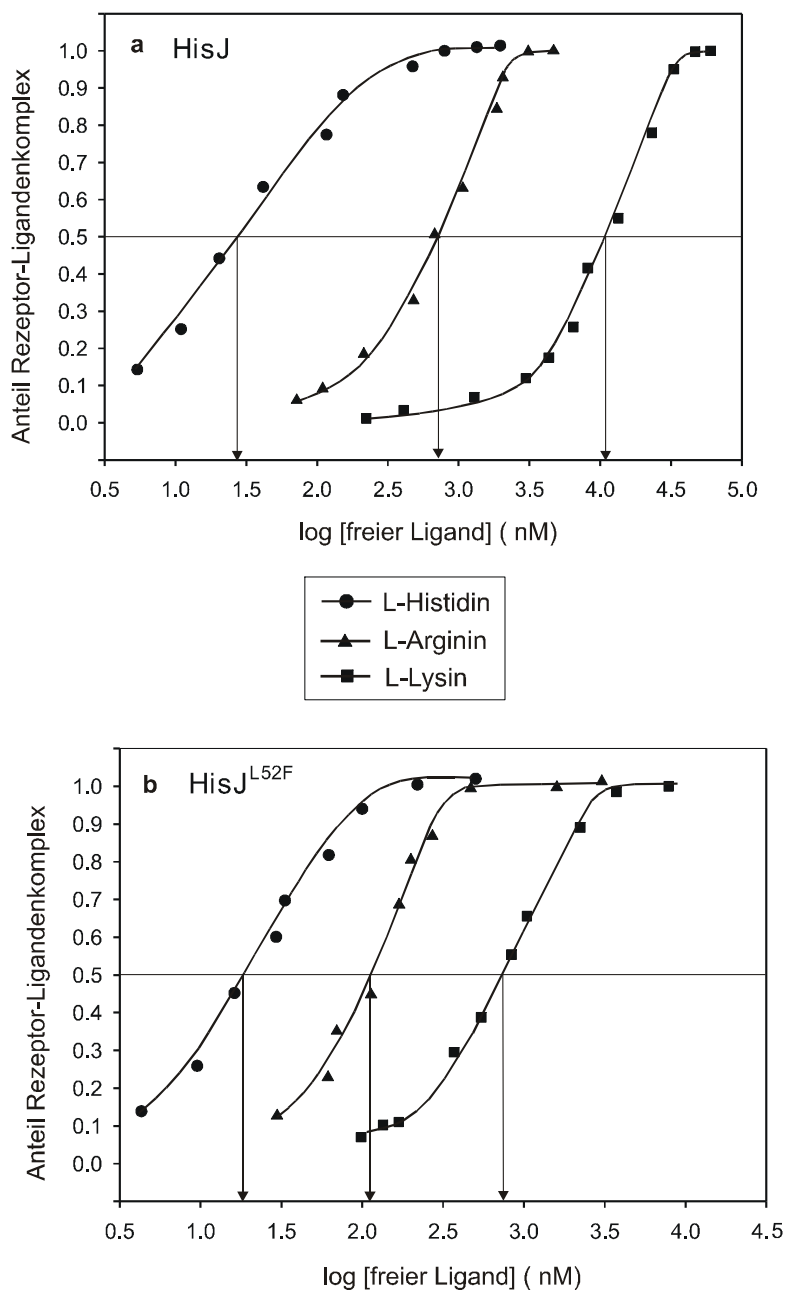


Abbildung 23: Bestimmung der K_d -Werte für die Wechselwirkung des wt-HisJ (a) und des HisJ^{L52F} (b) mit den basischen L-Aminosäuren mittels Gleichgewichtsdialyse unter Verwendung Tritium-markierter Liganden. Der nach Formel [5.2] ermittelte Anteil an Rezeptor-Ligandenkomplex wurde gegen den Logarithmus der freien Ligandenkonzentration aufgetragen. Es ergibt sich eine sigmoidale Kurve, deren Halbmaximalwert dem Exponent zur Basis 10 des K_d -Wertes entspricht. Für die Interaktion der HisJ-Varianten mit folgenden Liganden wurden die K_d -Werte für die Interaktion mit den HisJ-Varianten bestimmt: L-Histidin (geschlossene Kreise), L-Arginin: (geschlossene Dreiecke) und L-Lysin (geschlossene Quadrate). Die eingesetzte Rezeptorkonzentration betrug jeweils 5 μ M, als Puffer wurde 10 mM Natriumphosphat, 200 mM NaCl, pH 7,2 verwendet.

Die K_d -Werte für die jeweiligen Rezeptor-Ligandenwechselwirkungen wurden in Tab. 3 gemeinsam mit den Literaturwerten zusammengefasst:

Tabelle 3: K_d -Werte (μM) der Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit den basischen L-Aminosäuren. Die K_d -Werte wurden mittels Gleichgewichtsdialyse unter Verwendung tritiummarkierter Liganden bestimmt und nach Gleichung [6.2] berechnet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente, angegeben sind ausserdem die Standardabweichungen vom Mittelwert. Weiterhin sind die Literaturwerte (Wolf *et al.*, 1995; Nikaido *et al.*, 1992) für die Interaktion des HisJ sowie des LAOBP aus *Salmonella typhimurium* aufgeführt.

	HisJ (<i>E. coli</i>)	HisJ (<i>S. typhimurium</i>) Literatur ¹	HisJ ^{L52F} (<i>E. coli</i>)	LAOBP (<i>S. typhimurium</i>) Literatur ²
L-Histidin	0,028 ± 0,006	0,03	0,018 ± 0,003	0,5
L-Arginin	0,77 ± 0,15	0,7	0,12 ± 0,03	0,014
L-Lysin	13,6 ± 2,8	300	0,71 ± 0,18	0,015

1) Wolf, *et al.*, (1995)

2) Nikaido, *et al.*, (1992)

Das HisJ^{L52F} bindet alle drei basischen L-Aminosäuren mit höheren Affinitäten als das wt-HisJ. Die Bindung von L-Arginin ist um den Faktor 6,5 die von L-Lysin sogar um den Faktor 19 erhöht. Dies lässt darauf schliessen, dass die Position #52 im Rezeptor grosse Bedeutung für die Interaktion mit diesen Liganden spielt. Durch Einführung eines Phenylalaninrestes an dieser Position werden die Affinitäten für L-Arginin und L-Lysin deutlich erhöht, wahrscheinlich durch hydrophobe Kontakte des aromatischen Rings des Phenylalanins mit den aliphatischen Seitenketten der Liganden (diese Möglichkeit wird in Abschnitt 5.3.5 eingehender untersucht).

Ein wenig erstaunlich erscheint es zunächst, dass auch L-Histidin von HisJ^{L52F} stärker gebunden wird als vom wt-HisJ (wenn auch nur um den Faktor 1,5). Da das für den Austausch als Modellprotein herangezogene LAOBP, welches an Position #52 ein Phenylalanin besitzt und ansonsten hinsichtlich der an der Ligandenbindung beteiligten Reste identisch mit dem HisJ ist, laut Literatur Histidin mit einer Bindungskonstante von 500 nM bindet, hätte man ebenfalls eine Verminderung der Affinität von HisJ^{L52F} für Histidin erwarten können. Auch die Affinitäten des HisJ^{L52F} für Arginin und Lysin sind zwar im Vergleich zum wt-HisJ verbessert, liegen jedoch deutlich niedriger als die in der Literatur (Wolf *et al.*, (1995) und Nikaido *et al.* (1992)) angegebenen Werte für die Wechselwirkung dieser Liganden mit LAOBP. Um diesem Phänomen weiter nachzugehen, wurde gereinigtes LAOBP ebenfalls hinsichtlich seiner Affinität für L-Histidin, L-Arginin

und L-Lysin mittels Gleichgewichtsdialyse untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 24 dargestellt.

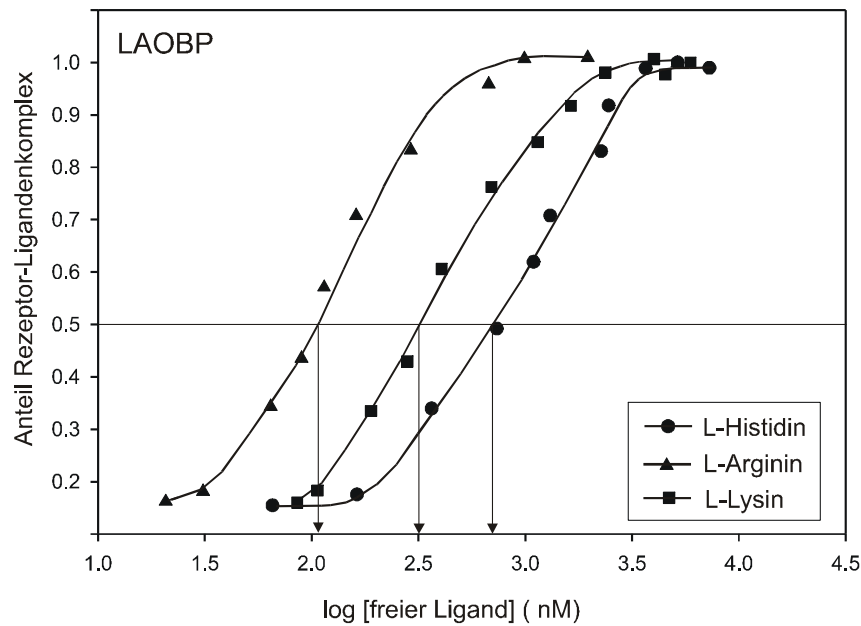


Abbildung 24: Bestimmung der Affinitätskonstanten (K_d -Werte) für die Wechselwirkung des LAOBP mit den basischen L-Aminosäuren mittels Gleichgewichtsdialyse unter Verwendung Tritium-markierter Liganden. Der nach Formel [5.2] ermittelte Anteil an Rezeptor-Ligandenkomplex wurde gegen den Logarithmus der freien Ligandenkonzentration aufgetragen. Es ergibt sich eine sigmoidale Kurve, deren Halbmaximalwert dem Exponent zur Basis 10 des K_d -Wertes entspricht. Für folgende Liganden wurden die K_d -Werte für die Interaktion mit LAOBP bestimmt: L-Histidin (geschlossene Kreise), L-Arginin: (geschlossene Dreiecke) und L-Lysin (geschlossene Quadrate). Die eingesetzte Rezeptorkonzentration lag in bei 5 μ M, als Puffer wurde 10 mM Natriumphosphat, 200 mM NaCl, pH 7,2 verwendet

In Tab. 4 sind die K_d -Werte für die Interaktion der HisJ-Varianten und des LAOBP mit den basischen L-Aminosäuren, sowie die Literaturwerte zusammengefasst.

Tabelle 4: Zusammenfassung aller über Gleichgewichtsdialyse bestimmten K_d -Werte der Interaktion der HisJ-Varianten sowie des LAOBP aus *E. coli* mit den basischen L-Aminosäuren. Die Werte repräsentieren Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente, angegeben sind ausserdem die Standardabweichungen vom Mittelwert. Weiterhin sind die Literaturwerte (Wolf *et al.*, 1995; Nikaido *et al.*, 1992) für die Interaktion des HisJ sowie des LAOBP aus *Salmonella typhimurium* aufgeführt.

	HisJ (<i>E. coli</i>)	HisJ (<i>S. typhimurium</i>) Literatur ¹	HisJ ^{L52F} (<i>E. coli</i>)	LAOBP (<i>S. typhimurium</i>) Literatur ²	LAOBP (<i>E. coli</i>)
L-Histidin	0,028 ± 0,006	0,03	0,018 ± 0,003	0,5	0,73 ± 0,21
L-Arginin	0,77 ± 0,15	0,7	0,12 ± 0,03	0,014	0,1 ± 0,04
L-Lysin	13,6 ± 2,8	300	0,71 ± 0,18	0,015	0,32 ± 0,06

1) Wolf, *et al.*, (1995)

2) Nikaido, *et al.*, (1992)

Die Affinitäten des *E. coli* LAOBP für L-Arginin und L-Lysin entsprechen mit $0,1 \pm 0,04 \mu\text{M}$ für die Interaktion mit L-Arginin und $0,32 \pm 0,06 \mu\text{M}$ für die Interaktion mit L-Lysin eher den Bindungskonstanten des HisJ^{L52F} mit diesen Liganden ($0,12 \pm 0,03 \mu\text{M}$ bzw. $0,71 \pm 0,18 \mu\text{M}$) als den in der Literatur angegebenen von *S. typhimurium* ($0,014 \mu\text{M}$ bzw. $0,015 \mu\text{M}$). Die Wechselwirkung mit L-Histidin liegt mit einem K_d -Wert von $0,73 \pm 0,21 \mu\text{M}$ jedoch eher im Bereich des Literaturwertes ($0,5 \mu\text{M}$) als in dem des HisJ^{L52F} ($0,018 \pm 0,003 \mu\text{M}$). Die Bindung von L-Histidin durch LAOBP ist gegenüber der von L-Arginin und L-Lysin vermindert, wenn auch nicht so deutlich, wie in der Literatur (Wolf *et al.*, 1995; Nikaido *et al.*, 1992) angegeben.

3.5.3 Bestimmung der Affinitätskonstanten für die Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit den basischen D-Aminosäuren mittels Fluoreszenzmessungen

Nachdem festgestellt wurde, dass HisJ^{L52F} zu allen basischen L-Aminosäuren eine höhere Affinität besitzt als das wt-HisJ, sollte der Beitrag der Position #52 zur Ligandenbindung näher untersucht werden, um ein möglichst genaues Verständnis des Ligandenbindungs-Mechanismus zu erhalten. Dies ist vor allem wichtig, wenn nach Erzeugung eines Repertoires an HisJ-Varianten mit Affinitäten für unterschiedliche Liganden eine HisJ-Variante identifiziert ist, welche mit einer abiotischen Substanz hochaffin wechselwirkt. Will man die Affinität für diese Substanz durch gezielte Modifikationen der HisJ-Variante noch verstärken, sind genaue Kenntnisse der Art der Wechselwirkung des wt-HisJ mit seinen natürlichen Liganden von Vorteil. Anhand der Kristallstrukturen des ligandenkomplexierten HisJ (Yao *et al.*, 1994) bzw. LAOBP (Oh *et al.*, 1993, 1994b) lässt sich schliessen, dass der Rest an Position #52 ausschliesslich mit den Seitenkettenatomen der Liganden wechselwirkt. Zu den Atomen der Carboxygruppe des Liganden werden von HisJ zehn und zu denen der α -Aminogruppe drei Kontakte ausgebildet. Zu beiden Gruppen wird je eine Salzbrücke ausgebildet (über das Arg #77 bzw. das Asp #161).

Eine Darstellung des von HisJ, bzw. LAOBP komplexiertem L-Histidin, sowie den Kontakten, die über die Positionen #52, Arg #77 und #Asp 161 hergestellt werden, zeigt Abb. 25.

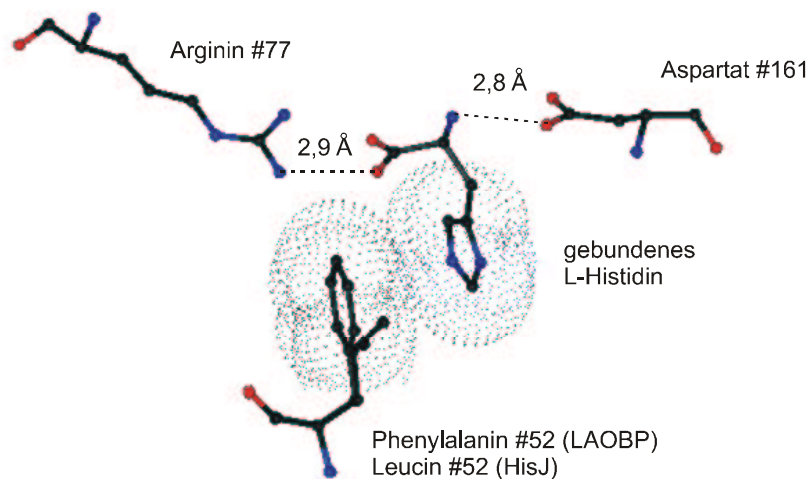


Abbildung 25: Darstellung der Kontakte, die über die Positionen #52, Arg #77 und Asp #161 von HisJ, bzw. LAOBP zu L-Histidin hergestellt werden. Die Abbildung wurde mit dem Graphikprogramm Insight II basierend auf den Kristallstrukturen von HisJ (Yao *et al.*, 1994) und LAOBP (Oh *et al.*, 1993), jeweils im Komplex mit L-Histidin durch Überlagerung der Positionen #52 der Proteine erstellt. Kohlenstoffatome sind schwarz, Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome blau gefärbt. Eingezeichnet sind die Salzbrücken, die zwischen Arg #77 und der Carboxygruppe, bzw. Asp # 161 und der α -Aminogruppe des gebundenem Histidins hergestellt werden. Zur Verdeutlichung der hydrophoben Wechselwirkung des Phe #52 mit dem Imidazolring des Histidins, wurden die van-der-Waals Radien der jeweiligen Seitenketten in Form einer Punktwolke dargestellt.

Um Aufschluss darüber zu erlangen, ob die Kontakte, die das Phenylalanin an Position #52 mit den Seitenkettenatomen der Liganden ausbildet, für die Wechselwirkung von grösserer oder geringerer Bedeutung als die zu der Carboxy- bzw. der α -Aminogruppe hergestellten Salzbrücken, wurden die Affinitäten beider Rezeptorvarianten für die D-Enantiomere der basischen Aminosäuren bestimmt. Es kann angenommen werden, dass HisJ zu diesen Liganden eine im Vergleich zu den L-Enantiomeren verringerte Affinität besitzt, da nicht alle Wechselwirkungen zu den Liganden ausgebildet werden können, d.h. es bleiben nur entweder die Kontakte zu den Seitenkettenatomen und der α -Aminogruppe bzw. der Carboxygruppe oder zu der α -Amino- und der Carboxygruppe erhalten. Bei einer verstärkten Wechselwirkung des F52 zu den Seitenkettenatomen der Liganden sollten die Tendenzen der Affinitäten erhalten bleiben, also HisJ^{L52F} eine deutlich höhere Affinität für D-Histidin, D-Arginin und D-Lysin (in dieser Reihenfolge) aufweisen als das wt-HisJ. Sollten die Kontakte zu der α -Amino- und der Carboxygruppe erhalten bleiben, sind für beide Rezeptorvarianten ähnlich niedrige Affinitäten für die D-Enantiomere zu erwarten. Die K_d -Werte für die Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit den basischen D-Aminosäuren wurden wie unter den Abschnitten 2.4.4 und 2.4.5 beschrieben über Ligandentitration und Aufnahme der Tryptophanfluoreszenz ermittelt.

Wie bereits unter Abschnitt 3.5.1 beschrieben, lässt sich der Anteil an ligandenkomplexiertem HisJ mittels Tryptophanfluoreszenz bestimmen. Zur Bestimmung von K_d -Werten im submikromolaren Bereich eignet sich dieses Verfahren jedoch nicht, da hierbei nicht die Konzentration an freiem Ligand bestimmt werden kann, welche sich im Fall extrem niedriger Bindungskonstanten deutlich von der eingesetzten Ligandenkonzentration unterscheidet (siehe auch Abschnitt 3.5.1). Zur Bestimmung der Bindungskonstanten der Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit den basischen D-Aminosäuren eignet sich die Methode hingegen durchaus, da davon ausgegangen werden kann, dass beide Rezeptoren eine deutlich niedrigere Affinität für die D-Enantiomere ihrer natürlichen Liganden besitzen. Für die Messung der höheren Bindungskonstanten kann die Bestimmung des Anteils an ligandenkomplexiertem HisJ mittels Tryptophanfluoreszenz angewendet werden, da hier wesentlich höhere Ligandenkonzentrationen eingesetzt werden müssen, um eine Absättigung des Rezeptors zu erreichen.

Für $[L_t] \gg [R_t]$ kann angenommen werden, dass $[L_t] \cong [L]$, wobei $[L_t]$ und $[R_t]$ jeweils die eingesetzte Liganden- bzw. Rezeptorkonzentration und $[L]$ die freie Ligandenkonzentration darstellen.

Für Gleichung [6.4]

$$[RL] = \frac{[R_t] \cdot [L]}{(k_d + [L])} \quad [6.4]$$

lässt sich dann $[L_t]$ anstelle $[L]$ einsetzen. Aus einer Auftragung des Anteils an ligandenkomplexiertem $[RL]$ Rezeptor gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration $[L_t]$

ergibt sich eine hyperbolische Kurve, deren Halbmaximalwert dem K_d -Wert der Bindung entspricht. Auf diese Weise wurden bereits Bindungsstudien an anderen periplasmatischen Rezeptorproteinen wie dem Arabinose-Bindeprotein (Miller *et al.*, 1983) oder dem Maltose-Bindeprotein (Wassenberg *et al.*, 2000) durchgeführt. Zudem ergab die fluorimetrische Untersuchung der Wechselwirkung des wt-HisJ mit dem niederaffinen Liganden L-Lysin einen Halbmaximalwert von 10,6 μM , was gut mit dem über Gleichgewichtsdialyse ermittelten K_d -Wert von $13,6 \pm 2,8 \mu\text{M}$ für die Interaktion des wt-HisJ mit L-Lysin übereinstimmt. Diese Tatsache lässt darauf schliessen, dass sich fluorimetrische Titrations für die Bestimmung von Bindungskonstanten der Wechselwirkung von HisJ mit niederaffinen Liganden eignen.

Für die fluorimetrischen Untersuchungen wurden in je drei unabhängigen Ansätzen die HisJ-Varianten mit ansteigender Konzentration an Liganden versetzt und nach Inkubation bei RT die Tryptophanfluoreszenz gemessen (Abschnitt 2.4.4).

Der Anteil an ligandenkomplexierten Rezeptormolekülen wurde unter Verwendung der Formel [7.1], (Abschnitt 2.4.5) bestimmt und gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration aufgetragen, wobei die Halbmaximalwerte sowie deren Mittelwerte und Standardabweichungen mit dem Programm SigmaPlot berechnet wurden.

Die Auftragungen sind Abb. 26 und Abb. 27 dargestellt.

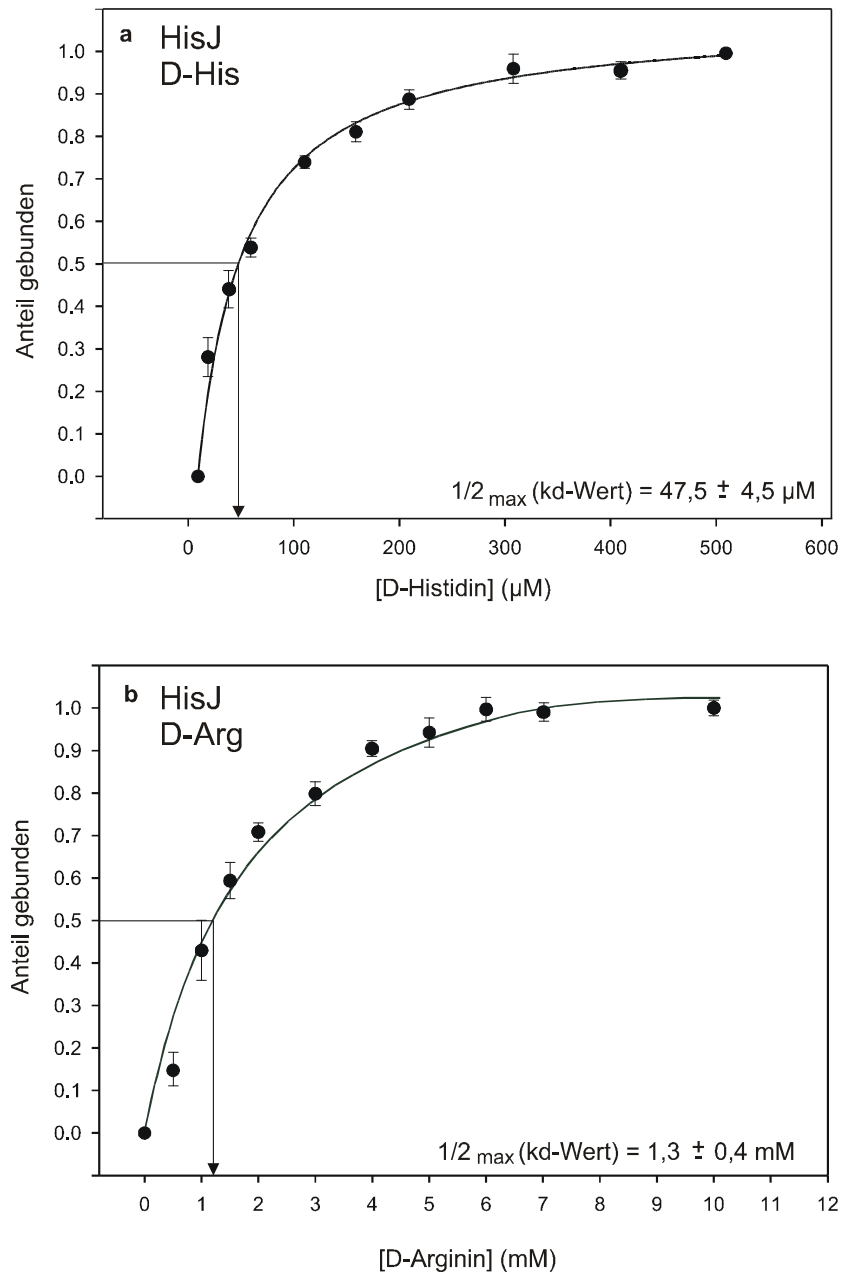


Abbildung 26: Bestimmung der K_d -Werte für die Bindung der basischen D-Aminosäuren durch das wt-HisJ mittels Fluoreszenzspektroskopie. **a:** Bestimmung des K_d -Wert-Wertes der Interaktion von HisJ mit D-Histidin; **b:** Bestimmung des K_d -Wert-Wertes der Interaktion von HisJ mit D-Arginin. Eine Interaktion des wt-HisJ mit D-Lysin konnte nicht detektiert werden. Der Anteil an gebundenem Ligand wurde anhand der Fluoreszenzwerte bei 330 nm nach Formel [7.1] berechnet und gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration aufgetragen. Mit dem Programm SigmaPlot wurden die Kurven mittels nichtlinearer Regression nach Formel [6.4] durch die Punkte gefittet. Die resultierende hyperbolische Kurve erreicht ein Maximum bei der Ligandenkonzentration, bei der das HisJ mit Ligand abgesättigt ist. Der Halbmaximalwert dieser Kurve entspricht dem K_d -Wert der jeweils untersuchten Interaktion, er wurde von SigmaPlot berechnet und ist jeweils angegeben.

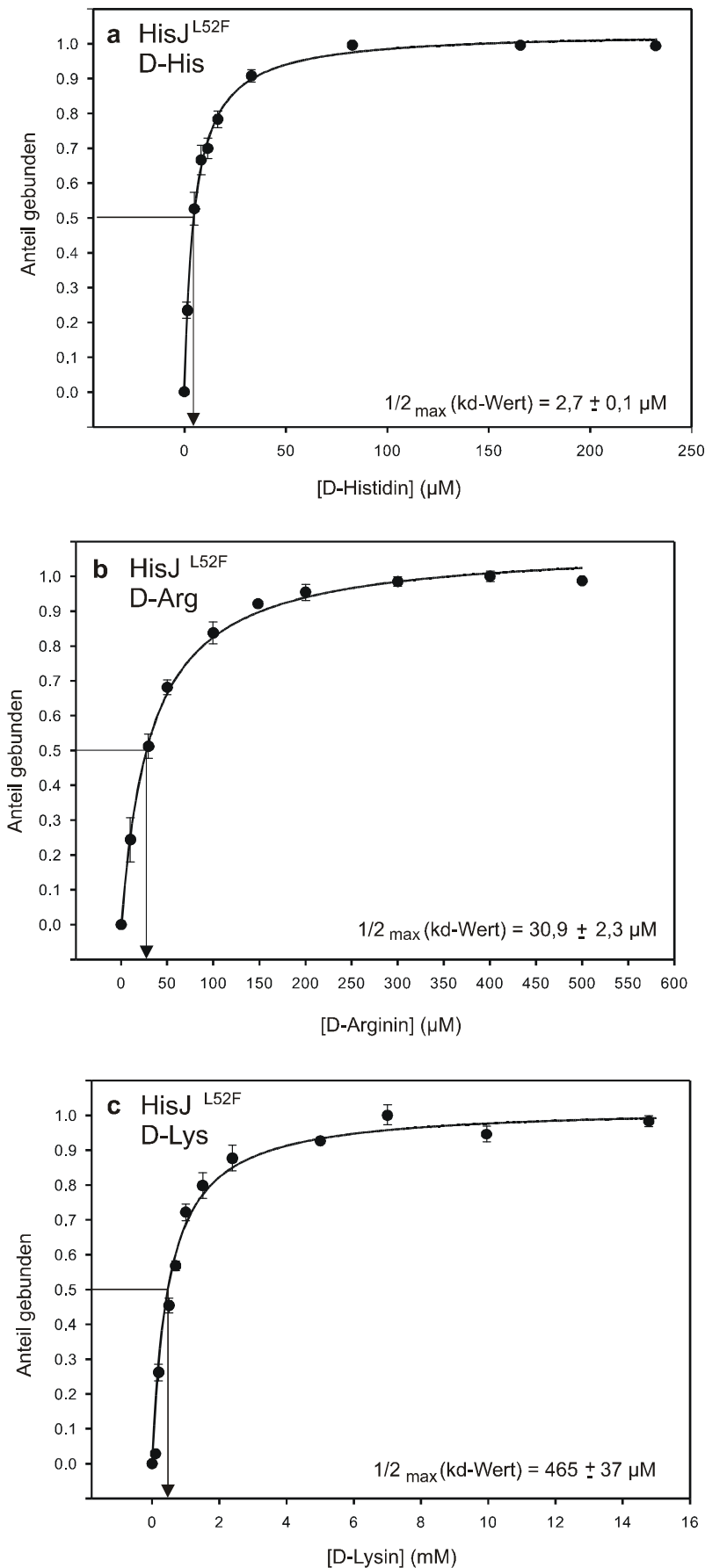


Abbildung 27: Bestimmung der K_d -Werte für die Bindung der basischen D-Aminosäuren durch HisJ^{L52F} mittels Fluoreszenzspektroskopie. **a:** Bestimmung des K_d -Wert-Wertes der Interaktion von HisJ^{L52F} mit D-Histidin; **b:** Bestimmung des K_d -Wert-Wertes der Interaktion von HisJ^{L52F} mit D-Arginin; **c:** Bestimmung des K_d -Wert-Wertes der Interaktion von HisJ^{L52F} mit D-Lysin. Der Anteil an gebundenem Ligand wurde anhand der Fluoreszenzwerte bei 330 nm nach Formel [7.1] berechnet und gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration aufgetragen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert dreier unabhängiger Parallelansätze, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Mit dem Programm SigmaPlot wurden die Kurven mittels nichtlinearer Regression nach Formel [6.4] durch die Punkte gefittet. Die resultierende hyperbolische Kurve erreicht ein Maximum bei der Ligandenkonzentration, bei der das HisJ^{L52F} mit Ligand abgesättigt ist. Der Halbmaximalwert dieser Kurve entspricht dem K_d -Wert der jeweils untersuchten Interaktion, er wurde von SigmaPlot berechnet und ist jeweils angegeben.

Die Halbmaximalwerte, die in diesem Fall den K_d -Werten entsprechen, sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: K_d -Werte (μM) der Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit den basischen D-Aminosäuren. Die K_d -Werte wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie nach Titration mit den entsprechenden Liganden bestimmt und nach Gleichung [6.4] berechnet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente, angegeben sind ausserdem die Standardabweichungen vom Mittelwert.

	HisJ	HisJ ^{L52F}
D-Histidin	47,5 ± 4,5	2,7 ± 0,12
D-Arginin	1320 ± 430	30,9 ± 2,3
D-Lysin	-	465 ± 37,7

Die basischen D-Aminosäuren interagieren mit beiden Proteinvarianten deutlich schwächer als mit den entsprechenden L-Aminosäuren. Dies ist nicht verwunderlich, da die Rezeptoren wichtige Kontakte zu den Atomen ihrer Liganden ausbilden, die im Falle der Bindung der D-Enantiomere nicht alle hergestellt werden können. Allerdings sind die Einbussen in den Bindungsstärken beim wt-HisJ drastischer als bei HisJ^{L52F}: die Affinität des wt-HisJ zu D-Histidin ist gegenüber der zu L-Histidin um den Faktor 1700 vermindert, die von HisJ^{L52F} „nur“ um den Faktor 150. D-Arginin wird von dem wt-HisJ 1700-fach, von HisJ^{L52F} 260-fach schwächer gebunden als L-Arginin. Eine Wechselwirkung des wt-HisJ mit D-Lysin liess sich selbst bei Ligandenkonzentrationen im hoch millimolaren Bereich nicht mehr nachweisen, während die Affinität des HisJ^{L52F} für D-Lysin gegenüber der für L-Lysin „nur“ um das 650-fache vermindert ist.

In den Affinitäten der beiden HisJ-Varianten zu den basischen D- und L-Aminosäuren zeigen sich dieselben Tendenzen: beide Rezeptorproteine wechselwirken mit D-Histidin am stärksten und mit D-Lysin am schwächsten. Die HisJ^{L52F}-Variante weist jedoch speziell für die D-Enantiomere eine deutlich gegenüber dem wt-Protein erhöhte Affinität auf. So ist die Affinität des HisJ^{L52F} zu D-Histidin gegenüber der des wt-HisJ um den Faktor 18 erhöht, während L-Histidin von HisJ^{L52F} nur unwesentlich stärker (um das 1,5-fache) gebunden wird als vom wt-HisJ. D-Arginin wird von HisJ^{L52F} 43-fach, L-Arginin nur 6,5-fach stärker gebunden als vom wt-HisJ.

Diese Ergebnisse weisen auf einen starken Einfluss des Phenylalaninrestes an Position #52 auf die Wechselwirkung mit den Seitenkettenatomen der Liganden hin, den ein Leucin an dieser Position nicht zu leisten vermag. Im Falle des wt-HisJ führt z.B. bereits die Unterbindung des Kontaktes zu der α -Aminogruppe bzw. der Carboxygruppe bei Einsatz von D-Lysin zu einer kompletten Aufhebung der Ligandenbindung. HisJ^{L52F} vermag dagegen D-Lysin noch mit einer Affinitätskonstante im mikromolaren Bereich zu binden, was sich mit starken hydrophoben Interaktionen des Phenylalaninrestes mit der

aliphatischen Seitenkette des Lysins erklären liesse. In ähnlicher Weise werden offenbar ebenfalls sehr starke hydrophobe Kontakte zu den Seitenkettenatomen von Histidin und Arginin ausgebildet.

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass bei der Bindung der D-Enantiomere der basischen Aminosäuren die Kontakte zu den Seitenkettenatomen der Liganden erhalten bleiben, sie geben allerdings keinen Aufschluss darüber, ob die Kontakte zur Carboxy- oder zur α -Aminogruppe unterbrochen werden. Für ein möglichst genaues Verständnis der Art der Wechselwirkung zwischen den Rezeptor-Varianten und den unterschiedlichen Liganden ist es interessant, dieser Frage weiter nachzugehen.

Es existieren bereits Hinweise darauf, dass bei der Bindung der D-Enantiomere die Kontakte zu den Carboxygruppen der Liganden erhalten bleiben, während die zu der α -Aminogruppe nicht mehr hergestellt werden können. Diese ergeben sich aus der Tatsache, dass, wie oben bereits erwähnt, HisJ insgesamt zehn Kontakte zur Carboxygruppe der Liganden, jedoch nur drei zur α -Aminogruppe ausbildet, somit ist eine stärkere Interaktion zur Carboxygruppe zu erwarten. Gestützt wird diese Vermutung durch Experimente der Arbeitsgruppe Ames, die über Kompetitionsassays die K_d -Werte der Bindung verschiedener Histidinderivate durch HisJ bestimmte und zu dem Ergebnis kam, dass N-Acetyl-Histidin (bei dem die Interaktion mit der α -Aminogruppe unterbunden ist) noch mit einer Bindungskonstante von 60 μ M gebunden wird, die Bindung von L-Histidinol (bei dem die Interaktion mit der Carboxygruppe unterbunden ist), jedoch mit einem K_d -Wert von 1400 μ M deutlich erniedrigt ist (Wolf *et al.*, 1996).

Allerdings muss hier angemerkt werden, dass die relativ grosse Acetylgruppe, die N-Acetyl-Histidin am N_α -Atom trägt, sterische Behinderungen hervorrufen könnte und damit auch Kontakte zu anderen Atomen der Liganden beeinträchtigen könnte. L-Histidinol besitzt anstelle der Carboxygruppe eine Hydroxygruppe, zu der auch die Wasserstoffbrücken, die HisJ zur Carboxygruppe des Histidins ausbildet, nicht mehr hergestellt werden können. Geeigneter für die Untersuchung der Rolle, die die beiden Salzbrücken bei der Ligandenbindung spielen, wären Histidinderivate, die dem Histidin strukturell möglichst nah verwandt sind und die Ausbildung aller Wasserstoffbrücken zum Rezeptorprotein erlauben.

3.5.4 Bestimmung der Affinitätskonstanten für die Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit Carboxy- bzw. α -Aminosubstituierten Histidin-Derivaten mittels Fluoreszenzmessungen

Um weiteren Aufschluss darüber zu erhalten, inwieweit die Kontakte, insbesondere die Salzbrücken, welche die Rezeptorvarianten zur Carboxy- bzw. α -Aminogruppe der Liganden ausbilden, zu den Affinitäten der Proteine für die Liganden beitragen, sollte die Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit zwei Histidinderivaten untersucht werden, bei denen jeweils die Carboxy- bzw. die α -Aminogruppe durch eine funktionelle Gruppe substituiert ist. Der Substituent sollte dabei möglichst klein sein (um sterischen Behinderungen vorzubeugen) und nach Möglichkeit auch über Wasserstoffbrücken von den Rezeptorvarianten kontaktiert werden, so dass im Wesentlichen nur die Ausbildung der einer der beiden Salzbrücken (zum Arg #77 bzw. zum Asp #161) unterbunden wird. Für derartige Experimente eignen sich die Histidinderivate der von Wolf *et al.*, (1996) untersuchten Liganden N-Acetyl-Histidin und L-Histidinol aus oben ausgeführten Gründen nicht.

Statt dessen wurden L- β -Imidazolylmilchsäure und L-Histidinamid gewählt, deren Strukturformeln gemeinsam mit der von L-Histidin in Abb. 28 dargestellt sind:

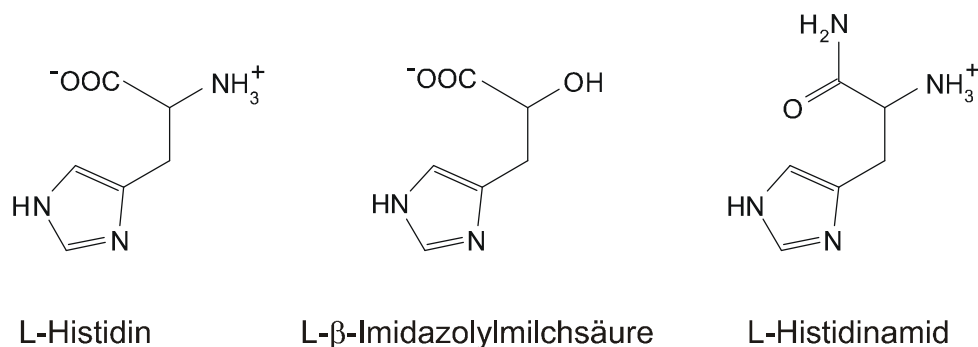


Abbildung 28: Strukturformeln der auf Interaktion mit den HisJ-Varianten getesteten Histidinderivate. Dargestellt sind L-Histidin, sowie L- β -Imidazol-Milchsäure, bei dem die α -Aminogruppe durch eine Hydroxygruppe substituiert ist und L-Histidinamid, das anstelle der Carboxygruppe eine Amidfunktion besitzt.

Bei L- β -Imidazolylmilchsäure handelt es sich um eine Hydroxycarbonsäure, bei der die α -Aminogruppe durch eine Hydroxy-Gruppe substituiert ist. Zu sterischen Behinderungen sollte diese Substitution nicht führen, da die Hydroxygruppe nicht mehr Raum einnimmt, als die α -Aminogruppe. Zudem kann von diesem Molekül zwar keine Salzbrücke mit dem Asp #161 ausgebildet werden, Kontakte zu dem Rezeptor über Wasserstoffbrücken können allerdings erhalten bleiben.

L-Histidinamid besitzt anstelle der Carboxygruppe eine Amidfunktion, die Ausbildung der Salzbrücke zum Arg #77 ist daher nicht mehr möglich, allerdings können auch hier Kontakte in Form von Wasserstoffbrücken mit den HisJ-Varianten hergestellt werden. Die

Bestimmung der Bindungskonstanten dieser beiden Histidinderivate für ihre Wechselwirkung mit den HisJ-Varianten sollte näheren Aufschluss über die Rolle der Salzbrücken, die zwischen den Rezeptoren und der Carboxy- bzw. der α -Aminogruppe ausgebildet werden, ergeben. Anders als bei den D-Enantiomeren der Liganden, bei denen man nicht vorhersagen kann, welche Kontakte erhalten und welche nicht mehr ausgebildet werden können, lässt sich für L- β -Imidazolylmilchsäure und L-Histidinamid annehmen, dass ihre Lage in der Bindungstasche der Rezeptoren der des L-Histidins entspricht und ausschliesslich die Bildung einer Salzbrücke zu der jeweils substituierten Gruppe unterbunden wird. Ein Vergleich der Affinitäten der HisJ-Varianten zu diesen Histidinderivaten kann dann wiederum Aufschluss über die Lage der D-Enantiomere in der Bindungstasche geben.

Die Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit beiden Histidinderivaten wurde nun fluorimetrisch, wie unter den Abschnitten 2.4.4 und 2.4.5 beschrieben, untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 29 und Abb. 30 dargestellt.

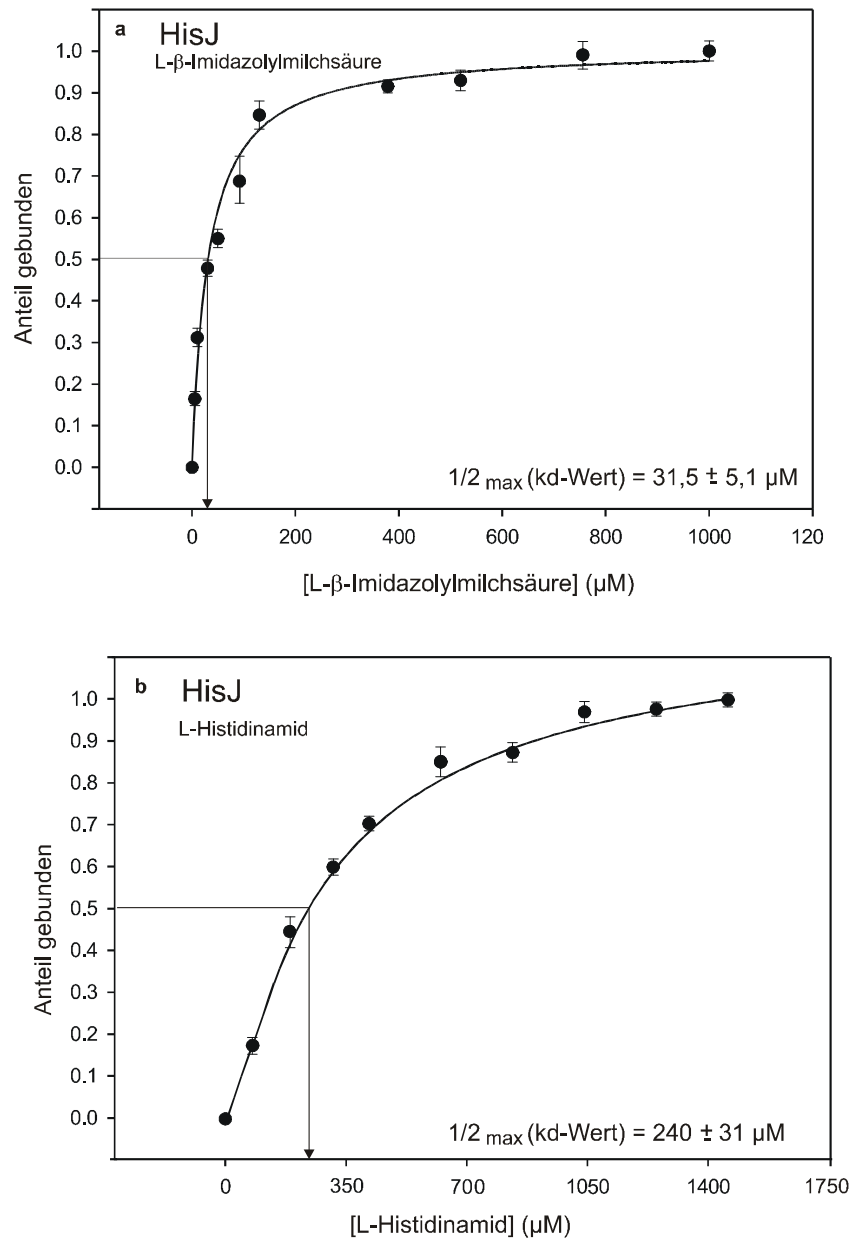


Abbildung 29: Bestimmung der K_d -Werte für die Bindung der α -Amino- bzw. Carboxysubstituierten Histidinderivate durch das wt-HisJ mittels Fluoreszenzspektroskopie. **a:** Bestimmung des K_d -Wert-Wertes der Interaktion von HisJ mit L-β-Imidazolylmilchsäure; **b:** Bestimmung des K_d -Wert-Wertes der Interaktion von HisJ mit L-Histidinamid. Der Anteil an gebundenem Ligand wurde anhand der Fluoreszenzwerte bei 330 nm nach Formel [7.1] berechnet und gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration aufgetragen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert dreier unabhängiger Parallelansätze, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Mit dem Programm SigmaPlot wurden die Kurven mittels nichtlinearer Regression nach Formel [6.4] durch die Punkte gefittet. Die resultierende hyperbolische Kurve erreicht ein Maximum bei der Ligandenkonzentration, bei der das HisJ mit Ligand abgesättigt ist. Der Halbmaximalwert dieser Kurve entspricht dem K_d -Wert der jeweils untersuchten Interaktion, er wurde von SigmaPlot berechnet und ist jeweils angegeben.

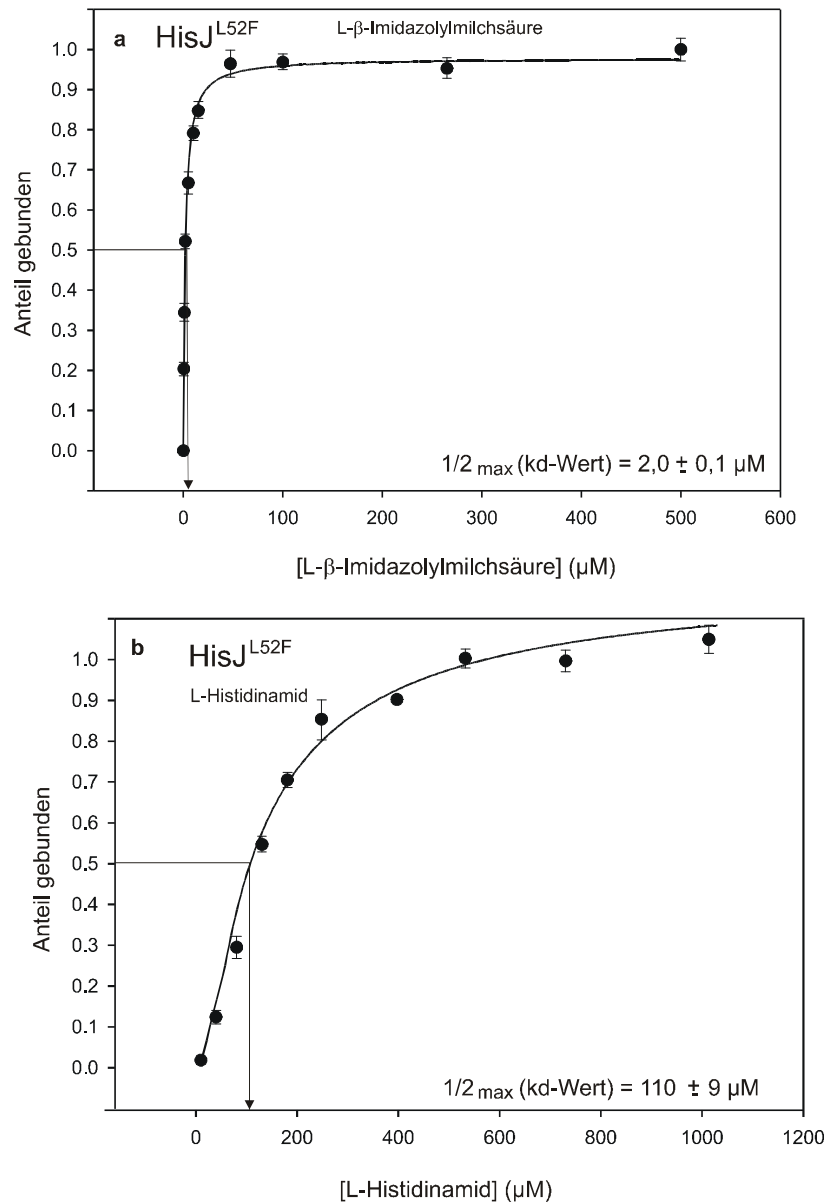


Abbildung 30: Bestimmung der K_d -Werte für die Bindung der α -Amino- bzw. Carboxysubstituierten Histidinderivate durch das HisJ^{L52F} mittels Fluoreszenzspektroskopie. **a:** Bestimmung des K_d - Wertes der Interaktion von HisJ^{L52F} mit L- β -Imidazolylmilchsäure; **b:** Bestimmung des K_d -Wert-Wertes der Interaktion von HisJ^{L52F} mit L-Histidinamid. Der Anteil an gebundenem Ligand wurde anhand der Fluoreszenzwerte bei 330 nm nach Formel [7.1] berechnet und gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration aufgetragen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert dreier unabhängiger Parallelansätze, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Mit dem Programm SigmaPlot wurden die Kurven mittels nicht-linearer Regression nach Formel [6.4] durch die Punkte gefittet. Die resultierende hyperbolische Kurve erreicht ein Maximum bei der Ligandenkonzentration, bei der das HisJ^{L52F} mit Ligand abgesättigt ist. Der Halbmaximalwert dieser Kurve entspricht dem K_d -Wert der jeweils untersuchten Interaktion, er wurde von SigmaPlot berechnet und ist jeweils angegeben.

In Tab. 6 sind die K_d -Werte für die Interaktion der HisJ-Varianten mit L- β -Imidazolylmilchsäure bzw. L-Histidinamid zusammen den K_d -Werten für die Interaktion der HisJ-Varianten mit D-Histidin aufgeführt.

Tabelle 6: K_d -Werte (μM) der Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit L- β -Imidazolylmilchsäure, bzw. L-Histidinamid. Die K_d -Werte wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie nach Titration mit den entsprechenden Liganden bestimmt und nach Gleichung [6.4] berechnet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente, angegeben sind ausserdem die Standardabweichungen vom Mittelwert. Zum Vergleich sind zusätzlich die K_d -Werte der Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit D-Histidin aufgeführt.

	HisJ	HisJ ^{L52F}
D-Histidin	$47,5 \pm 4,5$	$2,7 \pm 0,12$
L- β -Imidazolylmilchsäure	$31,5 \pm 5,1$	$2,0 \pm 0,1$
L-Histidinamid	240 ± 31	110 ± 9

L- β -Imidazolylmilchsäure wird von den HisJ-Varianten mit ähnlichen, allerdings leicht erhöhten Affinitäten gebunden wie D-Histidin (die K_d -Werte betragen $31,5 \pm 5,1 \mu\text{M}$ für die Bindung von L- β -Imidazolylmilchsäure, bzw. $47,5 \pm 4,5 \mu\text{M}$ für die Bindung von D-Histidin durch HisJ und $2,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ für die Bindung von L- β -Imidazolylmilchsäure, bzw. für die Bindung von $2,7 \pm 0,12 \mu\text{M}$ D-Histidin durch HisJ^{L52F}). Dies weist darauf hin, dass bei der Bindung der D-Enantiomere tatsächlich die Kontakte zur Carboxygruppe der Liganden erhalten bleiben, da diese auch bei der Bindung von L- β -Imidazolylmilchsäure ausgebildet werden können. In dem Fall sind bei Bindung der D-Enantiomere die Positionen der α -Aminogruppe und des Wasserstoffatoms im Vergleich zu den L-Enantiomeren miteinander vertauscht. Dass die Wechselwirkungen der HisJ-Varianten mit diesem Histidinderivat im Vergleich zu D-Histidin leicht erhöht ist, liesse sich damit erklären, dass die α -Aminogruppe des D-Histidin, die im Komplex mit dem Rezeptor eine andere Position einnehmen muss als die des L-Histidin, sterische Behinderungen verursachen könnte, was zu einem geringfügigen Einbruch der Affinität führen könnte. So befindet sich in unmittelbarer Nähe des Wasserstoffatoms am C α -Atom des gebundenen Liganden der Rest Gln #122, der mit dem C α -Atom des gebundenen Liganden über einen van-der-Waals Kontakt wechselwirkt (Yao *et al.*, 1994). Der Abstand zu der Amidfunktion des Gln #122 ist mit $1,9 \text{ \AA}$ sehr klein. Sollten bei Interaktion des HisJ mit D-Histidin die Positionen der α -Aminogruppe und des Wasserstoffatoms gegeneinander ausgetauscht sein, wie die Bindungskonstanten für die Interaktion der HisJ-Varianten mit D-Histidin, bzw. den Histidinderivaten nahelegen, sind sterische Behinderungen zwischen der α -Aminogruppe des D-Histidins und der Amidfunktion des Gln #122 sehr wahrscheinlich. Eine Darstellung des von HisJ gebundenem L-Histidin und des sich in unmittelbarer Nähe befindenen Gln #122 ist Abb. 31 gezeigt.

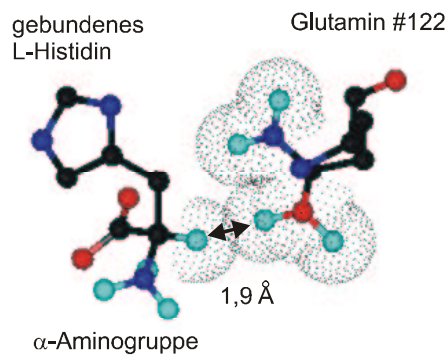


Abbildung 31: Darstellung des von HisJ gebundenen L-Histidin, sowie des sich in unmittelbarer Nähe an Position #122 im Protein befindenden Glutaminrestes. Kohlenstoffatome sind schwarz, Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome dunkelblau und Wasserstoffatome hellblau dargestellt. Zur Verdeutlichung des geringen Abstandes zwischen dem Proton am C α -Atom des gebundenem Histidins und der Amidfunktion des Gln #122, sind die jeweiligen van-der-Waals Radien in Form einer Punktwolke dargestellt. Ausserdem ist der Abstand zwischen den relevanten Wasserstoffatomen angegeben. Ein Austausch der Positionen des Protons am C α -Atom und der α -Aminogruppe, wie er bei Interaktion von HisJ mit D-Histidin zu vermuten ist, führt sehr wahrscheinlich zu sterischen Behinderungen zwischen der α -Aminogruppe des Liganden und der Amidfunktion des Gln #122.

L- β -Imidazolylmilchsäure besitzt anstelle der α -Aminogruppe eine Hydroxygruppe, daher wird die Interaktion mit dem Asp#161 des Rezeptors einfach unterbunden, mit zusätzlichen sterischen Behinderungen ist nicht zu rechnen.

Beide HisJ-Varianten zeigen eine deutlich erniedrigte Affinität für L-Histidinamid (die K_d -Werte betragen $240 \pm 31 \mu\text{M}$ für die Bindung durch wt-HisJ und $110 \pm 9 \mu\text{M}$ für die Bindung durch HisJ^{L52F}). Damit ist die Affinität des wt-HisJ für L-Histidinamid im Vergleich zu der für L- β -Imidazolylmilchsäure um den Faktor 8, die des HisJ^{L52F} sogar um den Faktor 55, vermindert. Offenbar spielt die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen der Carboxygruppe der Liganden und des Arg #77 des Proteins eine wichtige Rolle bei der Interaktion beider Komponenten. Kann dieser Kontakt nun nicht mehr hergestellt werden, kommt es zu drastischen Einbussen der Affinität, die selbst durch die relativ starken Kontakte, die das HisJ^{L52F} über das Phe #52 zu den Seitenkettenatomen der Liganden herstellt, nicht aufgehoben werden, da die Affinität des HisJ^{L52F} für L-Histidinamid nur ca. doppelt so hoch wie die des wt-HisJ ist. Durch Bestimmung der K_d -Werte der Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit den basischen D-Aminosäuren und Carboxy- bzw. α -Aminosubstituierten Histidinderivaten kann demnach die wahrscheinliche Lage der basischen D-Aminosäuren im Komplex mit dem Rezeptor vorhergesagt werden, ohne dass Strukturdaten zu einem HisJ-D-Ligand-Komplex vorliegen.

3.5.5 Einfluss der Interaktion der HisJ-Varianten mit den basischen L-Aminosäuren auf den Entfaltungsprozess der Proteine

Von vielen Rezeptorproteinen ist bekannt, dass ihre Stabilität durch Interaktion mit ihren jeweiligen Liganden erhöht wird. So wurde z.B. von Zhou *et al.* (1995) eine Stabilisierung des Androgen-Rezeptors durch seine Liganden Testosteron und Dihydrotestosteron nachgewiesen. Weiterhin ergaben *in vivo* Untersuchungen der Expression des Vitamin D Rezeptors eine deutliche Stabilisierung des Proteins durch den Liganden 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Wiese *et al.*, 1992). Zudem konnten Müller & Skerra (1994) anhand von Zink bindenden Varianten des Retinol-Bindeproteins zeigen, dass eine Korrelation zwischen dem Ausmass der Proteinstabilisierung durch den Liganden und der Affinitätskonstante der Rezeptor-Ligandenwechselwirkung bestehen kann. Auch die HisJ-Varianten sollten auf mögliche Stabilisierung durch die basischen L-Aminosäuren untersucht werden, um weitere Hinweise auf die Natur der Ligandenbindung zu erhalten. So wurde bei Kreimer *et al.*, (2000) beschrieben, dass sich die beiden HisJ-Domänen unabhängig voneinander falten und verschiedene Liganden in unterschiedlich starkem Ausmass die geschlossene Konformation des Proteins stabilisieren. Somit erscheint es wahrscheinlich, dass Liganden, die hochaffin mit beiden Domänen wechselwirken, auch das gesamte Protein stärker stabilisiert als ein Ligand, der bevorzugt ausschliesslich mit den Resten der Domäne I wechselwirkt und daher keinen stabilisierenden Effekt auf die Domäne II ausüben kann. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden beide HisJ-Varianten nach Inkubation mit den verschiedenen basischen L-Aminosäuren mit unterschiedlichen Konzentrationen an Harnstoff versetzt und die Denaturierung mittels Tryptophanfluoreszenz verfolgt (Abschnitte 2.4.6-2.4.9). Eine Schwierigkeit bei dieser Art Experiment besteht darin, dass sowohl die Ligandenbindung als auch der Denaturierungsprozess anhand desselben Signals detektiert werden, nämlich der Tryptophanfluoreszenz. Diese wird durch Interaktion mit Liganden erhöht (siehe Abschnitt 3.5.1, Abb. 20) und bei Entfaltung des Proteins erniedrigt (siehe Abschnitt 3.4, Abb. 18). Ob eine Abnahme der Tryptophanfluoreszenz in der Transitionsphase also auf Herauslösen des Liganden aus der Bindungstasche oder auf Denaturierung des Proteins zurückzuführen ist, lässt sich nicht bestimmen. Somit handelt es sich nicht um ein für die Bestimmung der freien Entfaltungsenergie $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ notwendiges Zweizustandsmodell (Pace *et al.*, 1989 und Pace 1990), bei dem nur die Zustände „gefaltet“ und „ungefaltet“ vorkommen. Bei Denaturierungsstudien unter Zusatz von Liganden werden mittels Tryptophanfluoreszenz zusätzlich noch die Zustände „ligandenfrei“ und „ligandenkomplexiert“ detektiert. Daraus ergibt sich sozusagen ein Störsignal, welches eine eindeutige Zuordnung zu den Zuständen „gefaltet“ oder „ungefaltet“ unmöglich macht. Daher erschien es wenig sinnvoll, die $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ -Werte für die Denaturierung der HisJ-Varianten in Anwesenheit von Liganden zu bestimmen. Wenn man allerdings annimmt, dass das jeweils höchste gemessene Fluoreszenzsignal den Zustand „nativ/ligandenkomplexiert“ und das jeweils niedrigste den Zustand „denaturiert/ligandenfrei“ anzeigt, kann über Formel [8.11], (Abschnitt 2.4.9) (Pace 1986), der Anteil an entfaltetem Protein bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen

bestimmt und mit den Daten für die ligandenfreien Proteine verglichen werden. Die Fluoreszenzwerte bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen wurden in das Programm SigmaPlot übertragen, welches iterativ nach der Methode der kleinsten Quadrate (Marquard-Levenberg-Algorithmus; Marquard, 1963) unter Verwendung der Formel [8.11]

$$f_u = \frac{(a \cdot [\text{Urea}] + b - F)}{(a \cdot [\text{Urea}] + b - c \cdot [\text{Urea}] - d)} \quad [8.11]$$

den Anteil an entfaltetem Protein bei jeder gegebenen Harnstoffkonzentration berechnet. Die daraus resultierenden Auftragungen des Anteils an entfaltetem Protein gegen die Harnstoffkonzentration ist in Abb. 32 gezeigt. In Tab. 7 sind die $[\text{Urea}]/2$ -Werte, die angeben, bei welcher Harnstoffkonzentration die Hälfte der Rezeptormoleküle im denaturierten vorliegen, zusammengefasst.

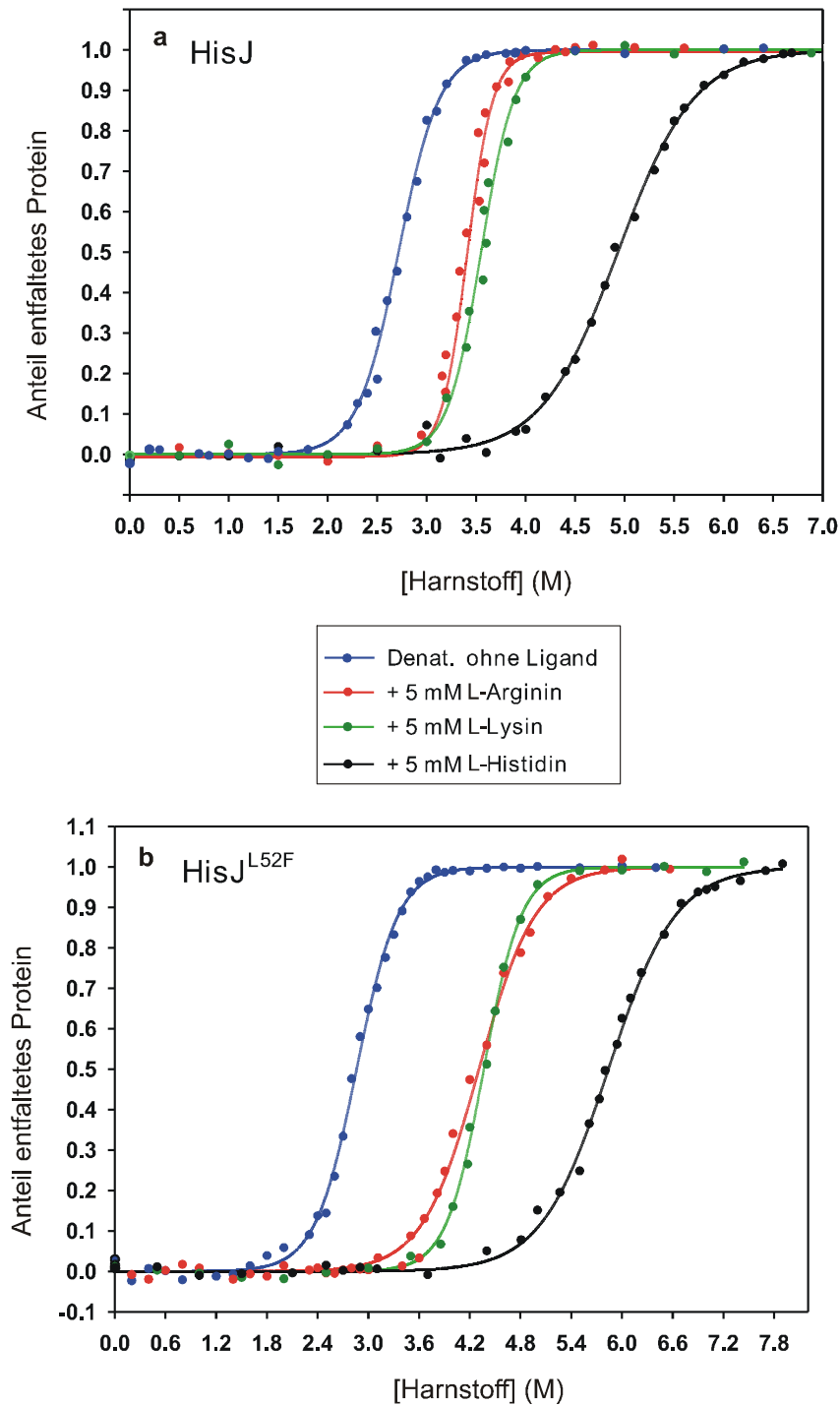


Abbildung 32: Einfluss der basischen L-Aminosäuren auf den Entfaltungsprozess des wt-HisJ (a) und des HisJ^{L52F} (b). Die Rezeptorvarianten wurden nach Inkubation mit L-Histidin (schwarze Kurve), L-Arginin (rote Kurve), L-Lysin (grüne Kurve), bzw. ohne Zusatz von Ligand (schwarze Kurve) mit ansteigenden Harnstoffkonzentrationen inkubiert und der Entfaltungsprozess mittels Aufnahme der Tryptophanfluoreszenz verfolgt. Mit dem Programm SigmaPlot wurde anhand der Messwerte mittels nichtlinearer Regression nach Formel [8.11] der Anteil an entfaltetem Protein berechnet und gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen.

Tabelle 7: Einfluss der Interaktion der HisJ-Varianten mit den basischen L-Aminosäuren auf den Entfaltungsprozess der Proteine. Angegeben sind Harnstoffkonzentrationen (M), bei der jeweils die Hälfte aller Rezeptormoleküle im denaturiertem Zustand vorliegt, berechnet nach Gleichung [8.11]. Die Werte repräsentieren Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente, angegeben sind ausserdem die Standardabweichungen vom Mittelwert.

	HisJ	HisJ ^{L52F}
ohne Ligand	2,71 ± 0,02	2,86 ± 0,02
L-Histidin	4,93 ± 0,06	5,85 ± 0,04
L-Arginin	3,41 ± 0,01	4,33 ± 0,01
L-Lysin	3,51 ± 0,01	4,36 ± 0,02

Im Vergleich zu den ligandenfreien HisJ-Varianten sind z.T. wesentlich höhere Harnstoffkonzentration nötig, um die ligandenkomplexierten Rezeptorvarianten vollständig zu denaturieren. Diese Tatsache lässt darauf schliessen, dass die Interaktion mit Liganden eine Stabilisierung der Proteine bewirkt. Eine eindeutige Korrelation zwischen dem Ausmass der Stabilisierung durch einen bestimmten Liganden und seiner Affinität zu der entsprechenden HisJ-Variante ist jedoch nicht zu erkennen. Eine solche Korrelation ist insofern erkennbar, als dass alle drei Liganden das HisJ^{L52F} stärker stabilisieren als das wt-HisJ und dass L-Histidin auf beide Rezeptorvarianten den höchsten stabilisierenden Effekt ausübt. Diese Tendenzen zeigen sich auch bei den Bindungskonstanten, so besitzt HisJ^{L52F} eine höhere Affinität zu allen drei basischen L-Aminosäuren als wt-HisJ und beide HisJ-Varianten interagieren am stärksten mit L-Histidin. Zwischen den Bindungskonstanten der Wechselwirkung von L-Lysin und L-Arginin mit den HisJ-Varianten und dem Ausmass an Stabilisierung, welches diese Liganden bei den Rezeptoren bewirken, besteht kein eindeutiger Zusammenhang. Beide Liganden vermögen beide HisJ-Varianten jeweils ähnlich stark zu stabilisieren, wobei der stabilisierende Einfluss auf HisJ^{L52F} in beiden Fällen ein wenig höher ist. Die Bindungskonstanten für die Wechselwirkung von L-Lysin und L-Arginin mit den HisJ-Varianten variieren jedoch z.T. erheblich. So ist die Affinität des wt-HisJ für L-Arginin gegenüber L-Lysin um den Faktor 19 erhöht, es bewirkt jedoch mit einem [Urea]/2-Wert von $3,41 \pm 0,01$ M eine weniger starke Stabilisierung als L-Lysin mit einem [Urea]/2-Wert von $3,51 \pm 0,01$ M. Diese Tendenz ist auch im Falle des HisJ^{L52F} zu beobachten: obwohl es eine um den Faktor 6 erhöhte Affinität zu L-Arginin gegenüber L-Lysin aufweist, wird es im Komplex mit L-Lysin mit einem [Urea]/2-Wert von $4,36 \pm 0,02$ M stärker stabilisiert als im Komplex mit L-Arginin, bei dem der [Urea]/2-Wert $4,33 \pm 0,01$ M beträgt. Der Einfluss, den ein Ligand auf den Entfaltungsprozess einer HisJ-Variante ausübt scheint also noch von anderen Parametern als der Affinität, die der Rezeptor für diesen Liganden besitzt, abzuhängen.

4 Ergebnisse zur ligandenvermittelten Dimerstabilisierung anhand zweier Varianten des GCN4-Leucinzipers aus *Saccharomyces cerevisiae*

4.1 Gezielte Austausch von an der Homodimerisierung des GCN4 beteiligten Aminosäureresten zur Destabilisierung des Homodimers

Für die Untersuchung zur ligandenvermittelten Dimerstabilisierung sollten zunächst zwei Varianten des GCN4-Leucinzipers, eines allgemeinen Transkriptionsaktivators aus *Saccharomyces cerevisiae* erstellt werden, die in ihrer Fähigkeit, Homodimere zu bilden, eingeschränkt sind. Da GCN4-Homodimere hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkung von Leucinresten, welche sie an jeder siebten Position besitzen, stabilisiert werden (O'Shea *et al.*, 1989), sollten durch Austausch eines oder mehrerer Leucinreste gegen Aminosäuren mit kleinen Resten, Lücken an den entsprechenden Positionen entstehen und das Homodimer destabilisiert werden. Ziel dieses Teilprojektes war es, aus einer Bibliothek niedermolekularer Substanzen eine Verbindung zu finden, die in der Lage ist, die Lücke in der einer der beiden GCN-Varianten auszufüllen und somit das Homodimer zu stabilisieren. Dass ein solches Verfahren prinzipiell möglich ist, zeigten Guo *et al.*, (2000), indem sie eine Lücke in die Interaktionsfläche zwischen dem human growth hormone (hgh) und dem hgh-Rezeptor einfügten, wodurch die Wechselwirkung beider Proteine drastisch eingeschränkt wurde. Es gelang ihnen weiterhin, verschiedene niedermolekulare Substanzen zu identifizieren, die in Lage waren, diese Lücke auszufüllen und damit die ursprüngliche Dimerisierungstendenz der Proteine wieder herzustellen. Unter Einbeziehung der strukturellen Daten des GCN4 wurde entschieden, dass zwei Bereiche des GCN4 besonders vielversprechend für die Erzeugung einer destabilisierenden Lücke sind. Dabei handelt es sich zum einen um das Leucin an Position #7, welches gegen einen Glycinrest ausgetauscht werden sollte, da Glycin von allen Aminosäuren den kleinsten Rest besitzt und durch Fehlen der Isopropylgruppe des ursprünglich an dieser Position befindlichen Leucinrestes eine genügend grosse Lücke in der Kontaktfläche zweier GCN4-Moleküle entstehen sollte, um eine Destabilisierung des Homodimers zu bewirken. Diese Variante wird im Folgenden als GCN^{L5G} bezeichnet.

Zum anderen sollten zwei direkt aufeinander folgende Leucinreste an den Positionen #14 und #15 gegen Alaninreste ausgetauscht werden. Zwar ist Alanin mit seiner Methylgruppe ein wenig grösser als Glycin, wodurch die entstehende Lücke kleiner ausfällt, allerdings schien es wenig ratsam, zwei aufeinander folgende Glycinreste in das GCN4 einzufügen, da sich dadurch an den entsprechenden Positionen eine Schleife in der Struktur ausbilden, und somit die gesamte Helix destabilisiert werden könnte. Die Ausbildung eines

Homodimers wäre dann womöglich überhaupt nicht mehr möglich und somit wäre auch keine Lücke vorhanden, die von einer niedermolekularen Substanz ausgefüllt werden könnte. Da aber gleich zwei Leucinreste gegen Alanin ausgetauscht werden sollten, entsteht eine Lücke, die sich über einen grösseren Bereich im GCN4-Molekül erstreckt und möglicherweise von einem Liganden anderer Struktur gefüllt werden kann, als die des GCN^{L5G}. Die GCN-Variante, bei die Leucinreste an den Positionen #14 und #15 gegen Alaninreste ausgetauscht sind, wird im Folgenden als GCN^{Ala} bezeichnet.

Von beiden GCN^{mut}-Varianten wurden unter Zuhilfenahme des Graphikprogrammes Insight II Modellkristallstrukturen erstellt, indem im Builder-Modus die entsprechenden Austausche in der Kristallstruktur des wt-GCN4, die von Ellenberger *et al.*, (1992) gelöst wurde, vorgenommen wurden.

Eine Darstellung beider Varianten sowie des wt-GCN sind Abb. 33 gezeigt.

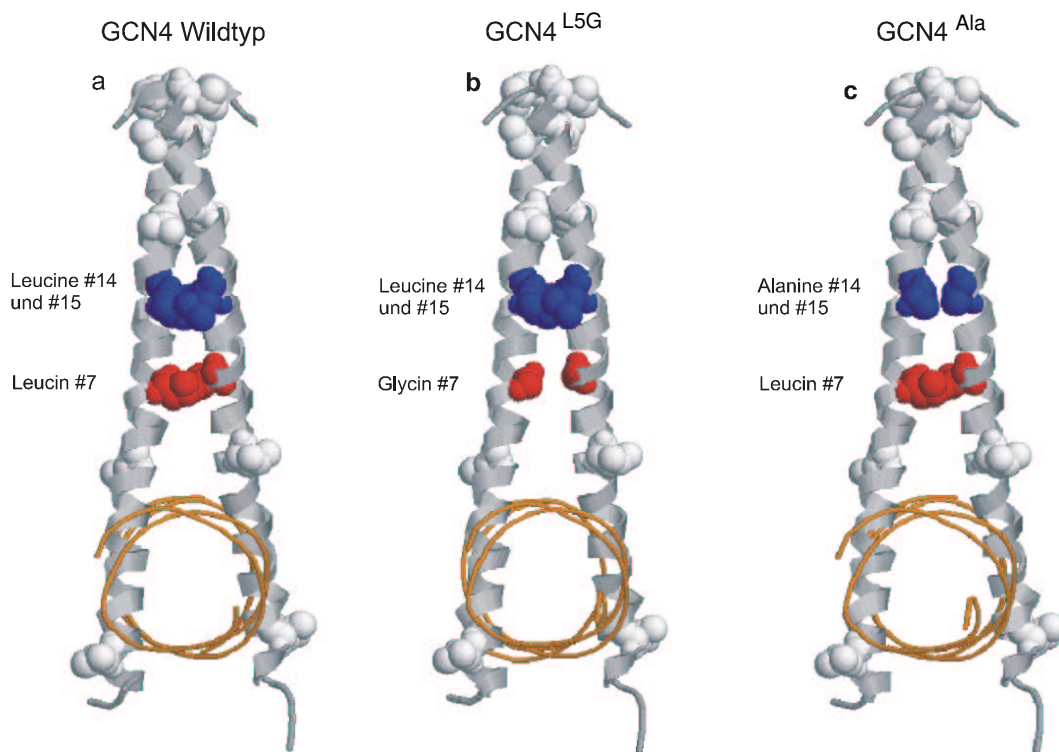


Abbildung 33: Darstellung der Strukturen der GCN4-Leucinzipper-Varianten. **a:** wt-GCN; **b:** GCN^{L5G}; **c:** GCN^{Ala}. Die Strukturen der GCN^{mut}-Varianten wurden ausgehend von der Kristallstruktur des wt-GCN (Ellenberger *et al.*, 1992) unter Zuhilfenahme des Graphikprogrammes Insight II erstellt, indem im Builder-Modus die entsprechenden Austausche in der Kristallstruktur des wt-GCN4 vorgenommen wurden. Die Strukturen sind in Form eines Bändermodells dargestellt, wobei die an jeder siebten Position befindlichen Leucinreste in Form von Kalotten hervorgehoben wurden. Die auszutauschenden Leucinreste an Position #7 und Positionen #14 und #15 sind rot, bzw. blau gefärbt. Die mit dem GCN im Komplex vorliegende DNA ist orange gefärbt.

Deutlich erkennbar sind die durch die Austausche in der Interaktionsfläche der GCN4-Moleküle entstehenden Lücken, aufgrund derer beide GCN^{mut}-Varianten als vielversprechende Kandidaten für GCN-Moleküle mit eingeschränktem Homodimerisierungsverhalten anzusehen sind. Es wurde daher beschlossen, die Varianten GCN^{L5G} und

GCN^{Ala} mittels Mutagenese zu erzeugen und auf ihre Fähigkeit zu homodimerisieren, zu untersuchen.

4.2 Erzeugung der GCN4-Varianten GCN^{L5G} und GCN^{Ala}

Da die Fähigkeit der GCN^{mut}-Varianten zur Homodimerisierung unter Verwendung des ToxR-Systems, mit welchem sich Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* untersuchen lässt (siehe Abschnitt 1.2), wurden die Mutagenesen des *GCN4*-Gens in Plasmiden vorgenommen, in denen das *GCN4* bereits in Fusion mit dem ToxR' vorliegt. Dabei handelt es sich um das Konstrukt pHKToxR'HisJGCN (siehe Abb. 10, Abschnitt 2.1.2.4). Zwischen dem *toxR'*-Gen und dem *GCN4*-Gen befindet sich hier noch das Gen für *hisJ*, es wird als ein tripartites Fusionsprotein, bestehend aus ToxR', HisJ und GCN4 gebildet. Dabei dient das HisJ als Sockel, um eine Lokalisation des GCN4 im Periplasma zu gewährleisten. Der nur aus einer α -Helix bestehende GCN4-Zipper, wäre allein nicht in der Lage im Periplasma zu verbleiben, wie Kolmar *et al.* (1995a) zeigten. Im pHKToxR'HisJGCN, sowie in allen anderen Konstrukten, in denen das GCN4 in Fusion mit ToxR' vorliegt, besteht das für *GCN*-Gen aus 105 bp, die für die Aminosäuren 247-281 des wt-GCN kodieren, welche den für die Homodimerisierung dieses Proteins verantwortlichen Anteil ausmachen. Ausgehend von dem Konstrukt pHKToxR'HisJGCN wurden nun die beiden Vektoren pHKToxR'HisJGCN^{L5G} und pHKToxR'HisJGCN^{Ala} erzeugt. Die entsprechenden Austausch wurde mit der modifizierten QuikChangeTM-Methode (Abschnitt 2.2.6) in die Vektoren eingeführt, unter Verwendung der Mutageneseoligonukleotide GCNL5Gdown und GCNL5Gup (für die Erzeugung der Variante pHKToxR'HisJGCN^{L5G}), bzw. GCNAladown und GCNAladown (für die Erzeugung der Variante pHKToxR'HisJGCN^{Ala}). Diese Oligonukleotide tragen an den auszutauschenden Positionen Kodone für Glycin, bzw. Alanin. Nach PCR, Restriktionsspaltung mit *DpnI* und Transformation (Abschnitt 2.2.2.1) des *E. coli*-Stammes DH5 α (Hanahan, 1983) wurde auf Selektivagar ausplattiert und am nächsten Tag je 4 Klone isoliert, von denen Plasmid-DNA für eine Sequenzanalyse präpariert wurde (Abschnitt 2.2.3.2). Aus den Plasmiden, in die die gewünschten Austausch erfolgreich eingefügt worden waren, wurde die das *hisJGCN* Fusionsgen umfassende Kasette mit *EcoRV* und *HindIII* ausgeschnitten (Abschnitt 2.2.6.1) und in mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen gespaltenen pHKToxR' Δ HisJGCN einligiert (Abschnitt 2.2.6.2). Auf diese Weise sollten Mutationen, die durch die den gesamten Vektor umfassenden PCR der QuikChange Mutagenese möglicherweise zusätzlich in das Plasmid eingeführte, ausserhalb des *GCN*-Gens liegende Mutationen, ausgeschlossen werden.

4.3 Untersuchung der Varianten GCN^{L5G} und GCN^{Ala} auf ihre Fähigkeit zu homodimerisieren

Nun wurden die neuen GCN4-Varianten mittels eines β -Galaktosidase-Aktivitäts-assay (Abschnitt 2.3.8) auf ihre Fähigkeit zu homodimerisieren getestet. Als Kontrollen wurden ausserdem folgende, in der Abteilung bereits vorliegende Konstrukte eingesetzt:

- pHKToxR'REIT39K
- pHKToxR'HisJ
- pHKToxR'HisJGCN

Bei ToxR'REIT39K und ToxR'HisJGCN handelt es sich um Positivkontrollen, beide Proteine zeigen eine starke Tendenz zur Homodimerisierung. Die Variante ToxR'HisJ dient als Negativkontrolle, da HisJ natürlicherweise keine Homodimere ausbildet.

Als weitere Negativkontrolle wurden untransformierte Zellen des Reporterstamms FHK12 (Kolmar *et al.*, 1995a) ebenfalls dem β -Galaktosidase-Assay unterzogen.

Das Ergebnis ist Abb. 34 zu sehen.

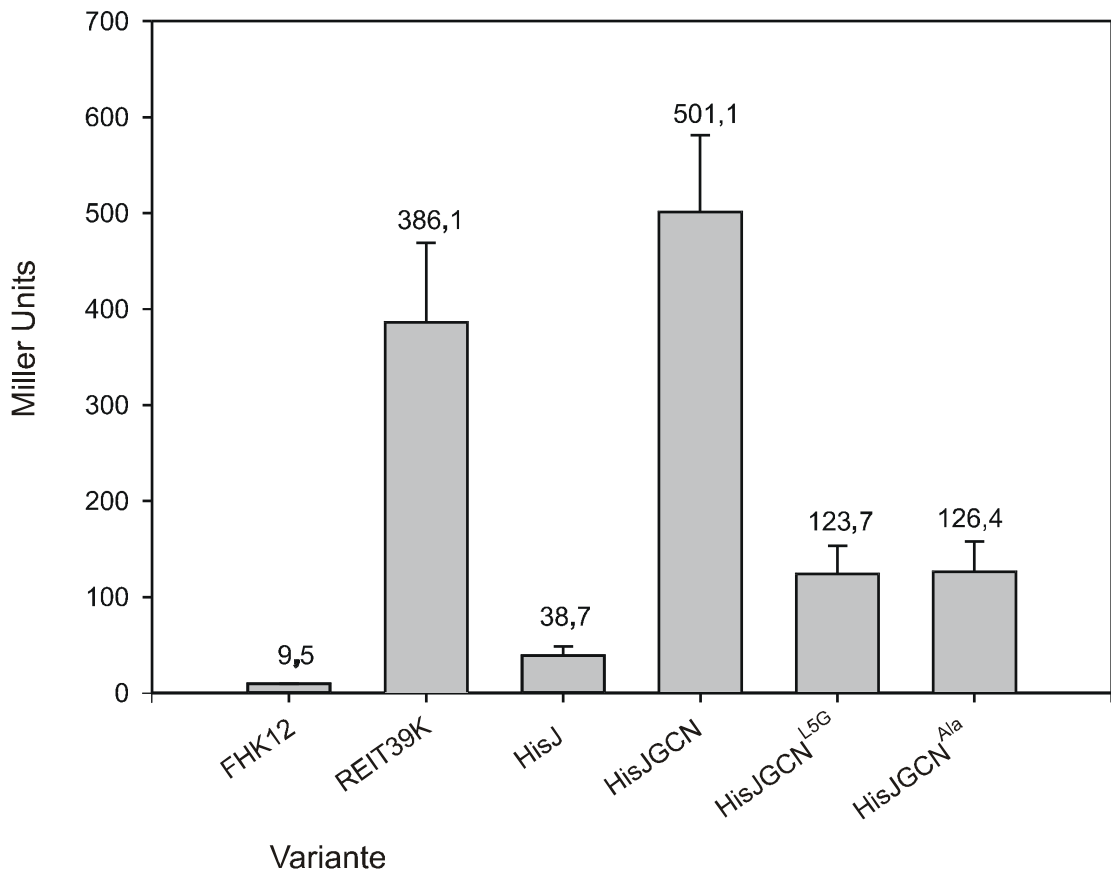


Abbildung 34: β -Galaktosidaseaktivität im Lysat verschiedener ToxR'-Fusionsproteine produzierender *E. coli*-Zellen. Die Höhe des Balkens gibt den Mittelwert von drei unabhängigen Kulturen eines Plattenabstriches an, der genaue Mittelwert in Miller Units ist zusätzlich über dem jeweiligen Balken aufgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen vom Mittelwert der drei Messungen an. Unter „Variante“ ist jeweils aufgeführt, welches Protein jeweils in Fusion mit ToxR' vorlag. Der äussere linke Balken zeigt die Hintergrundaktivität im Lysat des untransformierten Reporterstammes FHK 12 (Kolmar *et al.*, 1995a).

Die beiden Varianten GCN^{L5G} und GCN^{Ala} scheinen tatsächlich eine gegenüber dem wt-GCN eingeschränkte Tendenz zur Bildung von Homodimeren zu besitzen. Die β -Galaktosidase-Aktivität im Lysat von *E. coli* Zellen, welche die Konstrukte ToxR'HisJGCN^{L5G} bzw. ToxR'HisJGCN^{Ala} produzieren, ist gegenüber der von Zellen, die das pHKToxR'HisJGCN (also mit dem wt-GCN-Zipper) tragen um den Faktor vier vermindert. Allerdings scheint durch die Mutationen die Fähigkeit zur Homodimerbildung nicht komplett unterbunden zu sein, da das im β -Galaktosidase-Aktivitätsassay durch die Varianten bewirkte GCN^{L5G} und GCN^{Ala} gemessene Signal gegenüber der Negativkontrolle HisJ noch immer dreifach erhöht ist.

GCN^{L5G} und GCN^{Ala} sind Varianten des GCN-Zippers, die in ihrer Fähigkeit, stabile Homodimere zu bilden, eingeschränkt, aber nicht defizient sind und stellen somit eine geeignete Basis für Untersuchungen zur ligandenvermittelten Dimerstabilisierung dar.

4.4 Durchmusterung einer Bibliothek niedermolekularer Verbindungen auf eine Substanz, zur Stabilisierung der GCN^{mut}-Varianten

Im Institut für Organische Chemie, Abt. Prof. Dr. Laatsch wurden 45 Substanzen ausgesucht, die auf ihre Fähigkeit, die Homodimere der GCN-Mutanten (kurz als GCN^{mut} zusammengefasst) zu stabilisieren, getestet werden sollten. Anhand von computer-generierten Strukturmodellen der GCN-Mutanten konnte vorhergesagt werden, dass nur Substanzen mit einer relativen Molmasse < 150 die durch die Mutationen eingeführten Lücken im GCN-Zipper ausfüllen können. Daher wurde bei der Auswahl der Substanzen auf das Kriterium Grösse besonders Wert gelegt. Weiterhin sollten die Verbindungen nach Möglichkeit wasserlöslich sein und das Wachstum bzw. Stoffwechsel von *E. coli* Zellen – soweit vorhersagbar – möglichst nicht beeinflussen. Die 45 ausgewählten Substanzen sind in Anhang C aufgeführt.

Die Durchmusterung der Bibliothek wurde erneut unter Verwendung des ToxR'-System durchgeführt. Eine Stabilisierung der Homodimere der GCN-Varianten durch eine niedermolekulare Verbindung sollte in Anwesenheit dieser Substanz in einer Erhöhung der β -Galaktosidase-Aktivität im Zell-Lysat von *E. coli* Zellen, welche ein pHKToxR'HisJGCN^{mut}-Konstrukt tragen, resultieren. Für die Durchmusterung wurde von jeder Substanz eine Spatelspitze in 100 μ l 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 gelöst. Von dieser Lösung wurden je 50 μ l zu den Hauptkulturen der die ToxR'HisJGCN^{mut}-Proteine produzierender *E. coli* Zellen gegeben. Als Negativkontrolle wurden ausserdem Zellen ohne Zugabe einer der Verbindungen angezogen und getestet. In einem ersten Assay wurden zunächst nur die Varianten pHKToxR'HisJGCN^{L5G} und pHKToxR'HisJGCN^{Ala} getestet, in späteren Runden sollten auch die Kontrollen auf mögliche Sensitivität für die ausgewählten Substanzen untersucht werden. Ausserdem wurden die Assays nicht mit jeweils drei Parallelkulturen, sondern nur mit einer Hauptkultur durchgeführt. Das Ergebnis der Durchmusterung ist in Abb. 35 dargestellt:

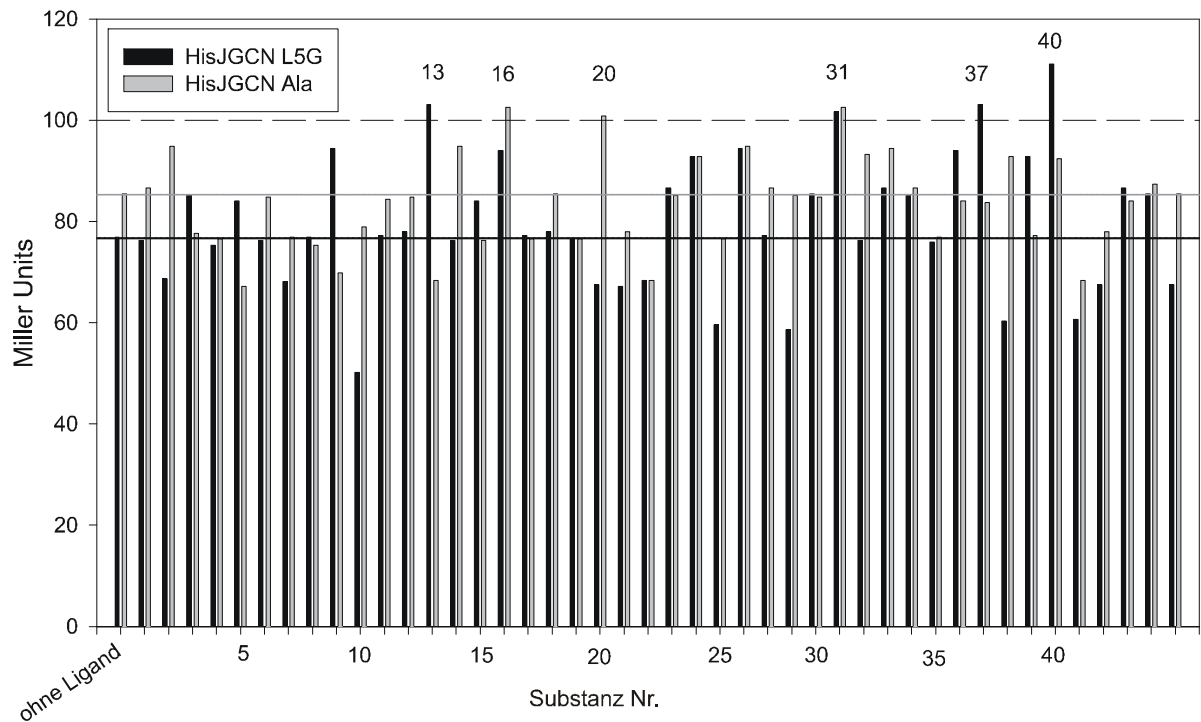


Abbildung 35: Untersuchung einer Substanzbibliothek auf mögliche Stabilisierung der Homodimerbildung GCN^{mut}-Varianten mittels Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität von *E. coli*-Zellen, welche das HisJGCN^{L5G} (schwarze Balken), bzw. das HisJGCN^{Ala} in Fusion mit ToxR' produzieren. Die Höhe der Balken gibt die β -Galaktosidaseaktivität in Miller Units an. Auf der Abszisse ist die Nummer der jeweils zugesetzten Substanz aufgeführt, die beiden äusseren linken Balken geben die Aktivität ohne Zusatz von Ligand an. Der Zusatz folgender Substanzen bewirkte eine Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität im Lysat von Zellen, die eine oder beide GCN^{mut}-Variante in Fusion mit ToxR'HisJ produziert, um mindestens 25 % auf mehr als 100 MU (angezeigt durch die gestrichelte Linie): Nr. 13 (Alaninol), Nr. 16 (C-Alanin-tert-Butylester), Nr. 20 (Methylcystein), Nr. 31 (L-Sorbose), Nr. 37 (para-Hydroxybenzoesäure) und Nr. 40 (Benzoesäure).

Die β -Galaktosidase-Aktivität im Lysat der Zellen, die eines der GCN^{mut}-Konstrukte auf dem ToxR'HisJ-Sockel tragen, liegt bei ca. 80 Miller Units. Eine der getesteten Substanzen erwies sich als toxisch für die Zellen (Nr. 27: 1-Hydroxy-2-Pyridin-thion Natriumsalz). Sechs Substanzen bewirkten einen Anstieg der β -Galaktosidaseaktivität um ca. 25% auf mehr als 100 Miller Units: bei Zellen, die mit dem Konstrukt pHKToxR'HisJGCN^{L5G} transformiert worden waren, bewirkten die Substanzen Nr. 13 (Alaninol), Nr. 37 (p-Hydroxybenzoesäure) und Nr. 40 (Benzoesäure) eine Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität um > 25 %. Bei Zellen, die mit dem Konstrukt pHKToxR'HisJGCN^{Ala} transformiert worden waren, konnte eine Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität um >25 % bei Zusatz der Substanzen Nr. 16 (C-Alanin-tert-Butylester) und 20 (S-Methylcystein) beobachtet werden. Bei Wiederholung des β -Galaktosidaseaktivitäts-Assay zeigte sich, dass die Substanzen Alaninol, C-Alanin-tert-Butylester und S-Methylcystein nicht reproduzierbar die Aktivität der β -Galaktosidase im Lysat von Zellen mit von pHKToxR'HisJGCN^{mut}-Konstrukten erhöhen konnten. Der Effekt, den sie im ersten Experiment scheinbar bewirkten, ist offenbar auf natürliche Schwankungen, dem

ToxR-System als *in vivo*-Verfahren zur Untersuchung von Protein-Proteinwechselwirkungen unterworfen ist, zurückzuführen. L-Sorbose wurde nicht erneut getestet, da es sich hierbei um ein relativ grosses ($M_r = 180,15$) Zuckermolekül handelt, welches wahrscheinlich nicht in die Lücke in den GCN^{mut}-Molekülen passt.

Ähnlich starke Abweichungen, allerdings in Form von Verminderung der β -Galaktosidaseaktivität, sind ebenfalls zu beobachten. So bewirken die Substanzen Nr. 10 (C-N-Methylalanin, Nr. 25 (n-Eikosan), Nr. 29 (α -Norborneol) und Nr. 38 (N-Benzylharnstoff) eine Verminderung der β -Galaktosidaseaktivität um ca. $> 25\%$ bei Zellen, die das ToxRHisJGCN^{L5G}-Fusionsprotein exprimierten, hatten jedoch auf die β -Galaktosidaseaktivität im Lysat von Zellen, die das ToxRHisJGCN^{Ala}-Fusionsprotein exprimierten keinen Einfluss.

Etwas eingehender wurde die Rolle der Substanz Benzoesäure bei einer möglichen Stabilisierung der Homodimere der GCN^{mut}-Moleküle untersucht. Anhand der computergenerierten Kristallstruktur der GCN^{L5G}-Variante konnte gezeigt werden, dass Benzoesäure sich gut in die durch Einführung eines Glycinrestes entstandene Lücke der Variante GCN^{L5G} einmodellieren liess, also durchaus in der Lage sein könnte, die Homodimerbildung dieser Variante zu stabilisieren. Zudem bewirkte in den ersten Tests auch die Zugabe eines Derivates der Benzoesäure (para-Hydroxybenzoesäure) eine Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität im Lysat von mit pHKToxR'HisJGCN^{L5G} transformierten Zellen. Diese Tatsache ist ein Hinweis darauf, dass die strukturellen Eigenschaften der Benzoesäure das Molekül generell befähigen, die Lücke der GCN^{L5G}-Variante auszufüllen.

4.4.1 Untersuchungen zur möglichen Stabilisierung der Homodimere der GCN^{mut}-Varianten durch Benzoesäure mittels β -Galaktosidaseaktivitäts-Assays

Für die Untersuchung zur möglichen Stabilisierung der Homodimere der GCN^{mut}-Varianten mittels β -Galaktosidaseaktivität wurden ausser den GCN^{mut}-Konstrukten auch die Kontrollen (untransformierte FHK12-Zellen, sowie Zellen mit den Konstrukten pHKToxR'REIT39K, pHKToxR'HisJ und pHKToxR'HisJGCN) bezüglich der Wirkung von Benzoesäure im Medium getestet. Der β -Galaktosidaseaktivitäts-Assay wurde wie unter Abschnitt 2.3.8 beschrieben durchgeführt. Von den Vorkulturen wurden je fünfzehn unabhängige Hauptkulturen angeimpft, von denen je drei ohne Zusatz von Benzoesäure inkubiert wurden und je drei mit folgenden Konzentrationen an Benzoesäure versetzt und inkubiert wurden:

- 1 mM
- 5 mM
- 10 mM
- 20 mM

Das Ergebnis der β -Galaktosidaseaktivitäts-Bestimmung ist in Abb. 36 dargestellt.

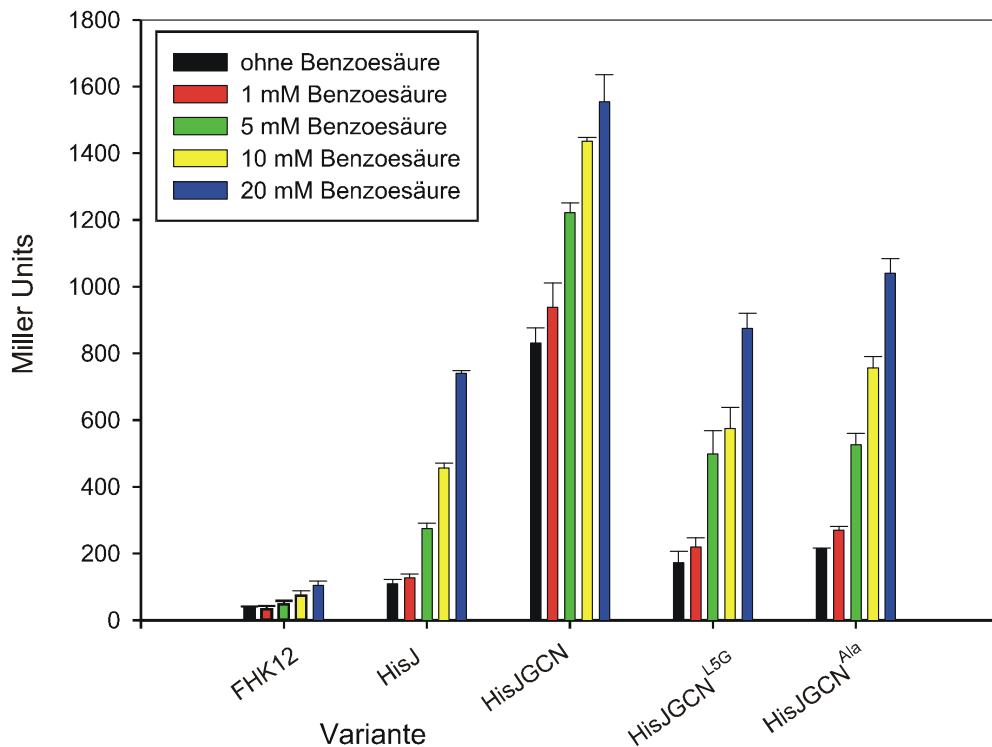


Abbildung 36: Benzoessäure-induzierte Erhöhung β -Galaktosidaseaktivität im Lysat verschiedener ToxR'-Fusionsproteine produzierender *E. coli*-Zellen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Benzoessäurekonzentrationen, die angegeben sind, inkubiert am nächsten Tag die β -Galaktosidaseaktivität im Lysat dieser Zellen gemessen. Die Höhe des Balkens gibt den Mittelwert von drei unabhängigen Kulturen eines Plattenabstriches an, der genaue Mittelwert in Miller Units ist zusätzlich über dem jeweiligen Balken aufgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen vom Mittelwert der drei Messungen an. Unter „Variante“ ist jeweils aufgeführt, welches Protein jeweils in Fusion mit ToxR' vorlag. Der äussere linke Balken zeigt die Hintergrundaktivität im Lysat des untransformierten Reporterstammes FHK 12 (Kolmar *et al.*, 1995b)

Wie zu erkennen, bewirkt der Zusatz von Benzoessäure bei allen Varianten – einschliesslich des untransformierten FHK12 Stamms - eine Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität, und zwar in konzentrationsabhängiger Weise, d.h., je höher die Konzentration an Benzoessäure im Medium, desto höher ist auch die β -Galaktosidaseaktivität im Lysat der *E. coli* Zellen. Dabei reagieren alle Varianten (mit Ausnahme der untransformierten FHK12-Zellen, bei denen der Effekt ein wenig geringer ist) ähnlich stark auf die Anwesenheit von Benzoessäure im Medium, das Signal bei den GCN^{mut}-Konstrukten tragenden Varianten ist nicht stärker erhöht, als das der Kontrollen.

Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass die Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität nicht durch eine Stabilisierung der GCN^{mut}-Homodimere bewirkt wird, sondern dass Benzoesäure andere Einflüsse auf das System hat, die sich in einer erhöhten Aktivität der β -Galaktosidase im Zell-Lysat niederschlägt.

Eine mögliche Erklärung wäre eine direkte Interaktion der Benzoesäure mit der β -Galaktosidase, die die Aktivität dieses Enzyms positiv beeinflusst.

Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurde das Experiment wiederholt, wobei dieses Mal ein weiteres auf ToxR' basierendes Protein-Protein-Wechselwirkungs-Detektions-System gewählt wurde, bei dem nicht β -Galaktosidase, sondern Chloramphenicolacetyltransferase als Reporterenzym fungiert.

4.4.2 Untersuchungen zur möglichen Stabilisierung der Homodimere der GCN^{mut}-Varianten durch Benzoesäure mittels TOXCAT-Assay

Für die Untersuchungen einer möglichen Stabilisierung der GCN^{mut}-Varianten durch Benzoesäure wurden die (Fusions-)Gene *hisJ*, *hisJGCN*, *hisJGCN^{LSG}* und *hisJGCN^{Ala}* in den von Prof. Dr. Dieter Langosch (Institut für Chemie und Physik, TU München) zur Verfügung gestellten Vektor ToxIVBKII (Gurezka & Langosch, 2001) einkloniert. Bei diesem Vektor liegt das *toxR'*-Gen in Fusion mit dem Gen für das Maltose-Bindeprotein (*malE*) mit anschliessendem *myc*-Tag vor, jedoch ist die ToxR-Transmembranregion durch ein Leucinheptadenmotiv (AZ2) ersetzt. Das gesamte Fusionskonstrukt befindet sich unter Kontrolle des *P_{Bad}*-Promotors, die Expression der Fusionsproteine ist also mit Arabinose induzierbar. Zudem besitzt der Vektor das *araC*-Gen, welches für das Arabinose Operon Regulator Protein (AraC) kodiert, welches in Abwesenheit von Arabinose die Transkription der unter Kontrolle des *P_{Bad}*-Promotors stehenden Gene reprimiert, sie in Anwesenheit von Arabinose aktiviert (Greenblatt & Schleif, 1971), sowie das *kan*-Gen, welches eine Resistenz für Kanamycin vermittelt.

In diesem Vektor sollte nun der Bereich, der das Tetraheptadenmotiv, das *malE*-Gen und den *myc*-Tag umfasst, gegen den Bereich des pHKToxR'HisJGCN-Vektors getauscht werden, der für die Transmembranregion und das *hisJGCN*-Fusionsgen kodiert. Für die Amplifizierung dieses Bereichs mittels PCR (Abschnitt 2.2.5) wurden die Oligonukleotide ToxCATGCNdown und ToxCATGCNup gewählt: ToxCATGCNdown bindet im für den cytoplasmatischen ToxR-Anteil kodieren Bereich, in dem sich eine singuläre *EcoRI*-Schnittstelle befindet, ToxCATGCNup zu den letzten für das *GCN*-Gen kodieren bp, und führt 3' des *GCN*-Gens eine *HindIII*-Schnittstelle ein, die für die spätere Umklonierung der anderen Fusionsgene aus den pHK-Vektoren in den ToxIVBKII-Vektor benötigt wird. Ausserdem wird über dieses Oligonukleotid eine *XhoI*-Schnittstelle eingeführt, über welche sich das Konstrukt in den ToxIVBKII-Vektor einklonieren liess.

Unter Einsatz der beiden Oligonukleotide, sowie des Plasmides pHKToxR'HisJGCN als Template wurde der entsprechende Bereich mittels PCR (Abschnitt 2.2.5) amplifiziert, mit *EcoRI* und *XhoI* gespalten (Abschnitt 2.2.6.1) und in das ebenfalls mit diesen

Restriktionsendonukleasen gespaltene Vektorfragment ToxIVBKII Δ AZ2MalEmyc einligiert (Abschnitte 2.2.6.1 und 2.2.6.2). Auf diese wurde das Konstrukt TOXIVBKIIhisJgcn (siehe Abb. 11, Abschnitt 2.1.2.4) erzeugt. Ein Schema der Klonierung ist in Abb. 37 dargestellt.

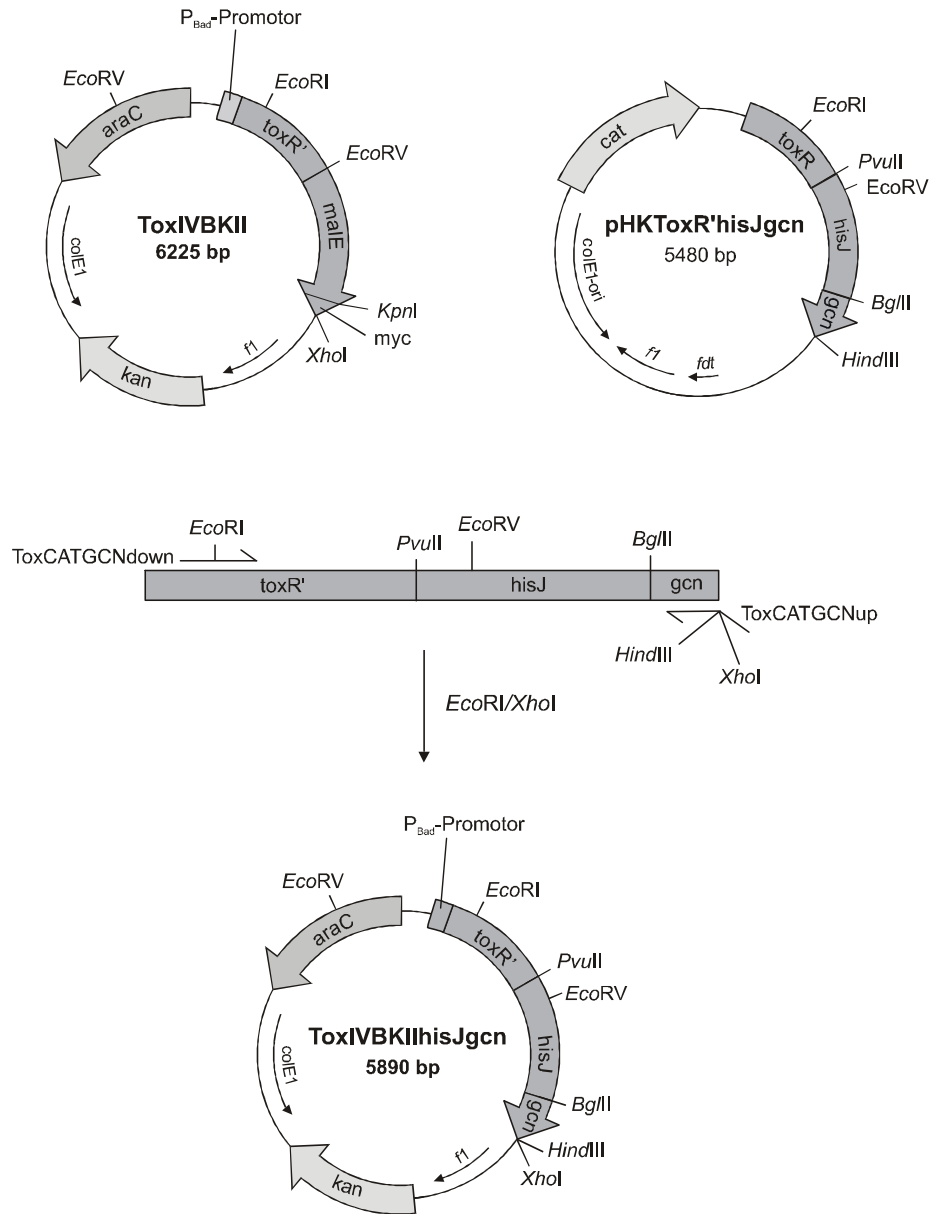


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Erzeugung des Vektor ToxIVBKIIhisJgcn. Ausgehend von dem Vektor pHKToxR'HisJGCN wurde mittels PCR über die Oligonukleotide ToxCATGCNdown und ToxCATGCNup ein Fragment amplifiziert, welches die bp 149-633 des *toxR*-Gens, sowie das *hisJ*- und das *GCN*-Gen umfasste. Das Oligonukleotid ToxCATGCNdown bindet in dem Bereich des *toxR*-Gens, indem sich eine *EcoRI*-Schnittstelle befindet. Über das Oligonukleotid ToxCATGCNup wurden 3' des zu amplifizierenden Fragmentes eine *HindIII* und eine *XhoI*-Schnittstelle eingefügt. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* geschnitten und in den Vektor ToxIVBKII, aus dem zuvor mit denselben Restriktionsenzymen das Fragment *toxR149-633malEmyc* ausgeschnitten worden war einligiert und auf diese Weise der Vektor ToxIVBKIIhisJgcn generiert.

CaCl₂-kompetente Zellen des Stammes DH5α (Hanahan, 1983) wurden dann mit dem Ligationsansatz transformiert (Abschnitt 2.2.2.1) und auf Kan³³-Agar ausplattiert. Von den am nächsten Tag gewachsenen Kolonien wurden zwei gepickt, in 50 ml dYT-Kan³³ angeimpft und nach Inkubation ü.N. die Plasmid-DNA mittels *JetStar*TM präpariert und einer Sequenzanalyse unterzogen.

Beide Klone enthielten die korrekte Sequenz. Nun konnten mittels Kassettenaustausch über *EcoRI* und *HindIII* die Gene *hisJ*, *hisJGCN^{L5G}* und *hisJGCN^{Ala}* von den pHK-Vektoren in den ToxIVBKII-Vektor umkloniert werden. Auch von diesen Konstrukten wurde Plasmid-DNA präpariert und mittels Sequenzanalyse die erfolgreiche Klonierung bestätigt. Nun wurden die unterschiedlichen Varianten auf Vermittlung von Chloramphenicol-resistenz getestet (die genaue Vorgehensweise ist unter Abschnitt 2.2.8 aufgeführt).

Von den Hauptkulturen wurden je 50 µl auf LB/Amp⁵⁰/Kan³³/1% Arabinose/2% Glucose ausgetrichen, wobei den Platten unterschiedliche Mengen Chloramphenicol beigemischt waren. Dabei wurden Platten mit folgende Mengen an Chloramphenicol verwendet:

- Kein Chloramphenicol
- 30 µg/ml
- 60 µg/ml
- 90 µg/ml
- 120 µg/ml
- 150 µg/ml
- 180 µg/ml

Es wurden zudem Plattensätze mit denselben Zusätzen wie oben beschrieben jedoch zusätzlich mit je 5 mM Benzoesäure versetzt, verwendet.

Die Platten wurden ü.N. bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag ausgewertet. Da keine zählbaren Kolonien zu sehen waren, sondern die Bakterien vielmehr in Form eines gleichmässigen Zellrasens auf den Platten wuchsen, wurden die Mengen Chloramphenicol notiert, bis zu der Zellwachstum zu beobachten war.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst:

Tabelle 8: Einfluss von Benzoesäure auf das Wachstum verschiedener ToxR'-Fusionsproteine produzierender *E. coli*-Zellen bei unterschiedlichen Chloramphenicolkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) mittels TOXCAT-Assay.

Maximale Chloramphenicolkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) im Medium, bei der Bakteriumwachstum zu beobachten war.		
Variante	Ohne Zusatz von Benzoesäure im Medium	Bei Zusatz von 5 mM Benzoesäure im Medium
Chr3	30	60
ToxR'HisJ	60	90
ToxR'HisJGCN	150-180	180
ToxR'HisJGCN ^{L5G}	90	120
ToxR'HisJGCN ^{Ala}	90	120

Es zeigt sich, dass das Ergebnis dieses Tests mit dem der β -Galaktosidaseaktivitäts-Assays übereinstimmt: in allen Fällen zeigt sich bei Anwesenheit von Benzoesäure im Medium eine erhöhte Resistenz der Zellen gegen Chloramphenicol. Auch der untransformierte Stamm wuchs bei Zusatz von Benzoesäure bei höheren Chloramphenicolkonzentrationen als in Abwesenheit von Benzoesäure. Damit konnte die Vermutung, dass Benzoesäure direkt die Aktivität der β -Galaktosidase steigert, nicht bestätigt werden. Allerdings kann diese Möglichkeit auch nicht völlig ausgeschlossen werden, da es ebenfalls möglich wäre, dass Benzoesäure auch auf die Chloramphenicol-acetyl-Transferase einen aktivitätssteigernden Einfluss hat. Allerdings müsste sie für eine direkte Interaktion mit diesem Enzym ins Zellinnere gelangen, was über diverse Transportsysteme bewerkstelligt werden könnte). Eingehender werden diese Möglichkeit, sowie weitere mögliche Erklärungen des beobachteten Effekts, unter Abschnitt 6.3 diskutiert.

5 Diskussion zur gezielten Modifikation der Bindungseigenschaften des HisJ

Durch Austausch des in HisJ an Position #52 befindlichen Leucinrestes gegen ein Phenylalanin wurde die Variante HisJ^{L52F} generiert. HisJ^{L52F} zeigt gegenüber dem wt-HisJ bei gleicher konformationeller Stabilität und genereller Funktion z.T. deutlich veränderte Affinitäten für unterschiedliche Liganden. Durch Bestimmung der Bindungskonstanten für die Wechselwirkung mit den basischen L-Aminosäuren, den entsprechenden D-Enantiomeren, sowie Carboxy- und α -Aminosubstituierten Histidinderivaten konnte genaue Kenntnis über den Bindungsmechanismus beider HisJ-Varianten erlangt werden.

Aufgrund der in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse lässt sich vorhersagen, dass HisJ sich generell als Basis für ein Repertoire an Rezeptormolekülen für niedermolekulare Liganden eignet, da sich seine Bindungseigenschaften bereits durch geringfügige Modifikationen drastisch ändern lassen. Durch mehrere Aminosäureaustausche in der Bindungstasche sollte es möglich sein, HisJ-Varianten mit einem breiten Ligandenspektrum zu generieren.

5.1 Auswirkungen der L52F-Mutation auf die konformationelle Stabilität von HisJ

Die über gezielte Mutagenese generierte HisJ-Variante HisJ^{L52F} besitzt bei unveränderter konformationeller Stabilität und generell gleicher Funktionsweise z.T. deutlich andere Bindungseigenschaften als das wt-HisJ.

Die Messung der konformationellen Stabilität beider HisJ-Varianten ergab, dass HisJ^{L52F} mit einem $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ -Wert von $-29,9 \pm 2,6$ kJ/mol (Denaturierung) bzw. $-30,7 \pm 3,1$ kJ/mol (Renaturierung) nicht wesentlich instabiler ist als das wt-HisJ mit einem $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ -Wert von $-31,6 \pm 2,8$ kJ/mol (Denaturierung) bzw. $-33,4 \pm 3,3$ kJ/mol (Renaturierung). Zwar die liegen die $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ -Werte des HisJ^{L52F} die anhand von sowohl De- als auch Renaturierungsstudien bestimmt wurden, ein wenig niedriger als die des wt-HisJ, allerdings sind die Abweichungen nicht so drastisch, dass von eindeutigen Einbruch der Stabilität des HisJ durch Austausch des Leucinrestes an Position #52 gegen ein Phenylalanin gesprochen werden kann.

5.2 Fähigkeit der HisJ-Varianten mit den basischen L-Aminosäuren zu interagieren

Untersuchungen zur qualitativen Ligandenbindung ergaben, dass beide Rezeptorvarianten prinzipiell in der Lage sind, mit den basischen L-Aminosäuren zu wechselwirken. Diese Untersuchungen wurden mittels fluorimetrischer Messung der Änderung der Tryptophanfluoreszenz der Proteine bei Zugabe von Liganden durchgeführt. Bei Zusatz von L-Histidin bzw. L-Arginin zeigt sich in beiden Fällen eine deutliche Erhöhung der Tryptophanfluoreszenz, jeweils um das ca. 1,7-fache des Grundwertes. Auch die Zugabe von L-Lysin bewirkt eine Erhöhung der Tryptophanfluoreszenz, allerdings in beiden Fällen nur um das ca. 1,45-fache. Selbst bei noch höheren Lysinkonzentrationen konnte keine weitere Steigerung der Tryptophanfluoreszenz beobachtet werden.

Wie lässt sich dieses Phänomen erklären? Die Höhe des Emissionsmaximums, also der Tryptophanfluoreszenz, spiegelt den konformationellen Zustand des HisJ wider: die ligandenfreie, offene Konformation zeigt die niedrigste Fluoreszenz, die liganden-gesättigte, geschlossene Konformation die höchste. Die Tatsache, dass die mit Lysin gesättigten HisJ-Varianten eine niedrigere Tryptophanfluoreszenz aufweisen als die mit Histidin bzw. Arginin gesättigten Rezeptoren, deutet darauf hin, dass die Wechselwirkung mit Lysin die geschlossene Konformation nicht vollständig induziert bzw. stabilisiert. Hinweise darauf werden auch in einer Veröffentlichung von Kreimer *et. al.*, 2000 beschrieben. Hier untersuchten die Autoren u.a. den Einfluss verschiedener Liganden (L-Histidin, L-Arginin und L-Lysin) auf die Konformation von HisJ und stellten fest, dass Histidin und Arginin die ligandenkomplexierte, geschlossene Konformation stärker stabilisieren als Lysin, welches in stärkerem Masse als Histidin und Arginin die ligandenkomplexierte, offene Konformation stabilisiert. Sie erklären die Tatsache mit unterschiedlichen Affinitäten der beiden HisJ-Domänen zu den jeweiligen Liganden. So interpretieren die Autoren ihre Ergebnisse dergestalt, dass die grössere Domäne (Domäne I), von der sieben Reste mit dem Liganden wechselwirken, und welche laut ihren Daten auch in höherem Maße von den Liganden stabilisiert wird, zu jeder der drei basischen Aminosäuren sehr starke Kontakte ausbildet. Die kleinere Domäne (Domäne II), von welcher fünf Reste mit dem Liganden wechselwirken, stelle jedoch schwächere Kontakte zu Lysin her, was womöglich damit zusammenhängt, dass die Seitenkette des Lysins kleiner ist als die von Histidin oder Arginin. Aufgrund seiner schwächeren Interaktion der Domäne II, ist Lysin womöglich nicht in der Lage, die Konformationsänderung des HisJ ähnlich stark zu induzieren, bzw. zu stabilisieren wie Histidin und Arginin. Es wäre daher denkbar, dass einige HisJ-Moleküle selbst im mit Lysin gesättigten Zustand in der offenen Konformation vorliegen, in der Lysin ausschliesslich mit Resten der Domäne I wechselwirkt. Dies würde die vergleichsweise niedrige Tryptophanfluoreszenz auch bei hohen Lysinkonzentrationen erklären.

5.3 Affinitäten der HisJ-Varianten für die basischen L-Aminosäuren

Quantitative Untersuchungen zur Ligandenbindung, bei denen mittels Gleichgewichtsdialyse unter Verwendung Tritium-markierter Liganden die Bindungskonstanten für die Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit den basischen L-Aminosäuren bestimmt wurden, ergaben, dass HisJ^{L52F} erhöhte Affinitäten zu allen basischen Aminosäuren besitzt. Das Ziel, durch Austausch des an Position #52 befindlichen Leucins gegen ein Phenylalanin eine HisJ-Variante zu erzeugen, welches L-Arginin und L-Lysin stärker als das Wildtypprotein bindet, wurde erreicht: HisJ^{L52F} hat im Vergleich zum wt-HisJ eine um den Faktor 6,5 erhöhte Affinität für L-Arginin und eine um den Faktor 19 erhöhte Affinität für L-Lysin. Eine Erhöhung der Affinität für L-Arginin und L-Lysin durch Austausch des in HisJ an Position #52 befindlichen Leucins gegen Phenylalanin war zu erwarten, da das für die Mutagenese als Modellprotein hergenommene LAOBP, welches natürlicherweise an Position #52 ein Phenylalanin besitzt, ebenfalls wesentlich höhere Affinitäten für L-Arginin und L-Lysin aufweist. Laut Literatur sind hier die Unterschiede allerdings noch deutlicher: LAOBP besitzt im Vergleich zu HisJ eine um den Faktor 50 und für L-Lysin eine um den Faktor 20.000 erhöhte Affinität. Es erscheint zunächst verwunderlich, dass HisJ^{L52F} ebenfalls eine erhöhte Affinität für L-Histidin besitzt, wenn auch diese Verstärkung der Ligandeninteraktion mit einem Faktor von 1,5 im Vergleich zum wt-HisJ nicht so drastisch ausfällt, wie bei den anderen beiden basischen L-Aminosäuren. Allerdings besitzt LAOBP laut Literaturwerten eine im Vergleich zu HisJ um den Faktor 17 verminderte Affinität für Histidin. Da es sich bei den Literaturwerten um Daten handelt, die nicht auf Experimenten mit den Rezeptorproteinen aus *E. coli* sondern denen aus *Salmonella typhimurium* basieren, wurde das *E. coli* LAOBP ebenfalls kloniert, gereinigt und Bindungsstudien mit den basischen L-Aminosäuren unternommen. Dabei stellte es sich heraus, die Affinitäten des *E. coli* LAOBP für L-Arginin und L-Lysin mit K_d -Werten von $0,1 \pm 0,04 \mu\text{M}$ für die Interaktion mit L-Arginin und $0,32 \pm 0,06 \mu\text{M}$ für die Interaktion mit L-Lysin eher den Bindungskonstanten des HisJ^{L52F} mit diesen Liganden ($0,12 \pm 0,03 \mu\text{M}$ bzw. $0,71 \pm 0,18 \mu\text{M}$) als den in der Literatur angegebenen des *S. typhimurium* ($0,014 \mu\text{M}$ bzw. $0,015 \mu\text{M}$). Die Wechselwirkung mit L-Histidin liegt mit einem K_d -Wert von $0,73 \pm 0,21 \mu\text{M}$ jedoch eher im Bereich des Literaturwertes ($0,5 \mu\text{M}$) als in dem des HisJ^{L52F} ($0,018 \pm 0,003 \mu\text{M}$). Die Bindung von L-Histidin durch LAOBP ist gegenüber der von L-Arginin und L-Lysin vermindert, wenn auch nicht so deutlich, wie in der Literatur angegeben.

Zwar sind die LAOBP-Proteine aus *E. coli* und *S. typhimurium* auf Aminosäureebene zu 96,6 % identisch, so dass nicht mit starken Abweichungen hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften gerechnet werden kann, dennoch scheint es Unterschiede im Bindungsverhalten zu geben. Möglicherweise beruht das unterschiedliche Bindungsverhalten des *E. coli* LAOBP und des *S. typhimurium* LAOBP auf Sequenzabweichungen ausserhalb der Bindungstasche, die Auswirkungen auf den generellen Bindungsmechanismus haben können. Interessant ist auch, dass das Phenylalanin an Position #52 im

LAOBP keine erhöhte Affinität zu L-Histidin bewirkt, dies aber bei HisJ^{L52F} durchaus beobachtet werden kann. Möglich wäre, dass Unterschiede in der Aminosäuresequenz in unmittelbarer Nähe dieser Position für einen abweichenden Hauptkettenverlauf sorgen und sich somit auf die Stärke der Interaktion des Phenylalaninrestes mit dem Liganden auswirken. So besitzt das HisJ an den Positionen #50 und #51 ein Asparagin, bzw. ein Prolin, das LAOBP hingegen ein Serin bzw. ein Aspartat. Möglicherweise wird durch den rigiden Prolinrest im HisJ der an Position #52 befindliche Rest in einer für die Ligandenbindung günstigeren Position gehalten oder der vergleichsweise grosse Aspartatrest, den LAOBP an dieser Stelle trägt, verhindert eine optimale Interaktion des Phe #52 mit dem Imidazolring des Histidin. In einer Überlagerung der Strukturen von HisJ und LAOBP zeigen sich zwar keine Abweichungen im Hauptkettenverlauf, allerdings muss dazu angemerkt werden, dass Yao *et al.*, (1994) die Struktur des HisJ mittels *Molecular Replacement* bestimmten, wobei sie im Wesentlichen den Hauptkettenverlauf der bereits früher gelösten Struktur des LAOBP (Oh *et al.*, 1993) beibehielten, die Reste, in denen sich HisJ und LAOBP unterscheiden austauschten und eine Energieminimierung durchführten. Es wäre durchaus möglich, dass die tatsächlichen strukturellen Verhältnisse des HisJ stärker von denen des LAOBP abweichen, als auch den in der PDB-Datenbank erhältlichen Strukturen ersichtlich ist und dass Sequenz- und Strukturabweichungen inner- und ausserhalb der Bindungstasche sich auf die der Stärke Rezeptor-Ligandenwechselwirkung auswirken können.

Auch die Affinitäten des wt-HisJ für die basischen L-Aminosäuren weichen z.T. von den in der Literatur angegebenen ab: Zwar stimmen die hier gemessenen K_d -Werte der Wechselwirkung mit L-Histidin und L-Arginin mit $0,028 \pm 0,006 \mu\text{M}$ und $0,77 \pm 0,15 \mu\text{M}$ gut mit den Literaturwerten ($0,03 \mu\text{M}$ und $0,7 \mu\text{M}$) überein, ein deutlicher Unterschied zeigt sich jedoch bei der Wechselwirkung mit L-Lysin: hier wurde eine Bindungskonstante von $13,6 \pm 2,8 \mu\text{M}$ bestimmt, der Literaturwert liegt mit $300 \mu\text{M}$ deutlich höher. Diese Abweichung lässt sich kaum damit erklären, dass die Proteine aus unterschiedlichen Organismen stammen, da das *E. coli* HisJ und das *S. typhimurium* HisJ sich nur in vier Aminosäureresten, welche alle ausserhalb der Bindungstasche liegen, unterscheiden, und somit zu 98,3 % sequenzidentisch sind. Bei so hoher Übereinstimmung der Sequenz ist es unwahrscheinlich, dass die Rezeptorproteine so stark in ihrem Bindungsverhalten divergieren, wie sich im Falle der Interaktion mit L-Lysin zeigt. Die gute Übereinstimmung der Bindungskonstanten für die Wechselwirkung der Proteine mit L-Histidin und L-Arginin weist ebenfalls darauf hin, dass die geringfügigen Abweichungen in der Sequenz keinen deutlichen Einfluss auf die Affinitäten der Proteine für ihre jeweiligen Liganden haben. Zu dem von Wolf *et al.*, (1995) und Nikaido *et al.*, (1992) ermittelten K_d -Wert von $300 \mu\text{M}$ für die Interaktion des *S. typhimurium* HisJ mit L-Lysin muss gesagt werden, dass dieses Ergebnis nicht auf Gleichgewichtsdialyse mit markiertem Lysin beruht, sondern auf Kompetitions-Gleichgewichtsdialysen mit markiertem Histidin und unmarkiertem Lysin. Möglicherweise ist diese Methode zu ungenau für eine korrekte Bestimmung der Bindungskonstante. Es ist natürlich ebenfalls nicht auszuschliessen, dass bei den hier durchgeführten Experimenten Fehler unterlaufen sind und der Literaturwert der

tatsächlichen Bindungskonstante entspricht, allerdings ist das unwahrscheinlich, da der Wert mit 300 μM doch extrem stark von den Bindungskonstanten für die Wechselwirkung mit Arginin bzw. Histidin abweicht. Da Lysin strukturell mit Arginin und Histidin verwandt ist, scheint es unwahrscheinlich, dass die Wechselwirkung des HisJ mit dieser Aminosäure so drastisch von der mit den beiden anderen basischen Aminosäuren abweicht, wie in der Literatur beschrieben.

5.4 Affinitäten der HisJ-Varianten für die basischen D-Aminosäuren

Die erhöhte Affinität des HisJ^{L52F} für alle basischen L-Aminosäuren scheint auf verstärkter hydrophober Wechselwirkung des aromatischen Phenylalaninrings mit den Seitenkettenatomen der Liganden zu beruhen, wie Ergebnisse aus Bindungsstudien mit den basischen D-Aminosäuren nahelegen. Diese ergaben, dass die Reihenfolge der Affinitäten grundsätzlich erhalten bleibt, also beide Varianten mit D-Histidin am stärksten und D-Lysin am schwächsten wechselwirken, was daraufhin deutet, dass bei der Interaktion mit den D-Enantiomeren der Liganden die Kontakte zu den Seitenkettenatomen erhalten bleiben, da andernfalls in allen Fällen eine ungefähr gleich starke Verminderung der Affinitäten zu beobachten wäre. Generell ist die Wechselwirkung beider HisJ-Varianten mit den basischen D-Aminosäuren deutlich schwächer als mit den entsprechenden L-Enantiomeren, was nicht weiter verwunderlich ist, da die Rezeptoren wichtige Kontakte zu den Atomen ihrer Liganden ausbilden, die im Falle der Bindung der D-Enantiomere nicht alle hergestellt werden können. Allerdings sind die Einbußen in den Bindungsstärken im Falle des wt-HisJ drastischer als bei HisJ^{L52F}: die Affinität des wt-HisJ zu D-Histidin ist gegenüber der zu L-Histidin um den Faktor 1700 vermindert, die von HisJ^{L52F} „nur“ um den Faktor 150. D-Arginin wird von dem wt-HisJ 1700-fach, von HisJ^{L52F} 260-fach schwächer gebunden als L-Arginin. Eine Wechselwirkung des wt-HisJ mit D-Lysin liess sich selbst bei Ligandenkonzentrationen im hoch millimolaren Bereich nicht mehr nachweisen, während die Affinität des HisJ^{L52F} für D-Lysin gegenüber der für L-Lysin „nur“ um das 650-fache vermindert ist.

Bei den Affinitäten der beiden HisJ-Varianten zu den basischen D-Aminosäuren zeigen sich dieselben Tendenzen, wie bei denen zu den basischen L-Aminosäuren: beide Rezeptorproteine binden D-Histidin am besten und D-Lysin am schlechtesten, wobei sich hier noch grössere Differenzen zeigen: Die Affinität von HisJ^{L52F} zu D-Histidin ist gegenüber der des wt-HisJ um den Faktor 18 erhöht, während L-Histidin von HisJ^{L52F} nur unwesentlich stärker (um das 1,5-fache) gebunden wird als vom wt-HisJ. D-Arginin wird von HisJ^{L52F} 43-fach, L-Arginin nur 6,5-fach stärker gebunden als vom wt-HisJ.

Diese Ergebnisse weisen auf einen starken Einfluss des Phenylalaninrestes an Position #52 auf die Wechselwirkung mit den Seitenkettenatomen der Liganden hin, den ein Leucin an dieser Position nicht zu leisten vermag. Im Falle des wt-HisJ z.B., führt bereits die Unterbindung des Kontaktes zu der α -Aminogruppe bzw. der Carboxygruppe des

Liganden Lysin zu einer kompletten Aufhebung der Ligandenbindung, während HisJ^{L52F} D-Lysin noch mit einer Affinitätskonstante im mikromolaren Bereich zu binden vermag, was sich mit starken hydrophoben Interaktion des Phenylalaninrestes mit der aliphatischen Seitenkette des Lysins erklären lässt. Analog werden offenbar ebenfalls sehr starke hydrophobe Kontakte zu den Seitenkettenatomen von Histidin und Arginin ausgebildet. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass bei der Bindung der D-Enantiomere der basischen Aminosäuren die Kontakte zu den Seitenkettenatomen der Liganden erhalten bleiben, sie geben allerdings keinen Aufschluss darüber, ob die Kontakte zur Carboxy- oder zur α -Aminogruppe unterbrochen werden. Zu beiden Gruppen der wird eine je Salzbrücke ausgebildet (über das Arg #77 bzw. das Asp #161). Hinweise darauf, welche der beiden Salzbrücken stärker zur Interaktion mit den Liganden beiträgt, liefern Bestimmung der Bindungskonstanten für die Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit L-Histidinderivaten, bei denen jeweils die Carboxy- bzw. die α -Aminogruppe durch eine funktionelle Gruppe substituiert war.

5.5 Affinitäten der HisJ-Varianten für Carboxy- bzw. α -Aminosubstituierte Histidin-Derivate

L- β -Imidazolmilchsäure, bei der die α -Aminogruppe durch eine Hydroxygruppe substituiert ist, wird von den HisJ-Varianten mit ähnlichen, allerdings leicht erhöhten Affinitäten gebunden wie D-Histidin (die K_d -Werte betragen $31,5 \pm 5,1 \mu\text{M}$ für die Bindung von L- β -Imidazolylmilchsäure, bzw. $47,5 \pm 4,5 \mu\text{M}$ für die Bindung von D-Histidin durch HisJ und $2,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ für die Bindung von L- β -Imidazolylmilchsäure, bzw. für die Bindung von $2,7 \pm 0,12 \mu\text{M}$ D-Histidin durch HisJ^{L52F}). Dies weist darauf hin, dass bei der Bindung der D-Enantiomere tatsächlich die Kontakte zur Carboxygruppe der Liganden erhalten bleiben, da diese auch bei der Bindung von L- β -Imidazolmilchsäure ausgebildet werden können. Dass die Wechselwirkungen der HisJ-Varianten mit diesem Histidinderivat im Vergleich zu D-Histidin leicht erhöht ist, liesse sich damit erklären, dass die α -Aminogruppe des D-Histidin, die im Komplex mit dem Rezeptor eine andere Position einnehmen muss als die des L-Histidin, sterische Behinderungen verursachen könnte, was zu einem geringfügigen Einbruch der Affinität führen könnte. L- β -Imidazolylmilchsäure besitzt anstelle der α -Aminogruppe eine Hydroxygruppe, daher wird die Interaktion mit dem Asp #161 des Rezeptors einfach unterbunden, mit zusätzlichen sterischen Behinderungen ist nicht zu rechnen.

Beide HisJ-Varianten zeigen eine deutlich erniedrigte Affinität für L-Histidinamid, bei welches anstelle der Carboxygruppe eine Amidfunktion besitzt, (die K_d -Werte betragen $240 \pm 31 \mu\text{M}$ für die Bindung durch wt-HisJ und $110 \pm 9 \mu\text{M}$ für die Bindung durch HisJ^{L52F}). Damit ist die Affinität des wt-HisJ für L-Histidinamid im Vergleich zu der der für L- β -Imidazolylmilchsäure um den Faktor 8, die des HisJ^{L52F} sogar um den Faktor 55 vermindert. Offenbar spielt die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen der Carboxygruppe

der Liganden und des Arg #77 des Proteins eine wichtige Rolle bei der Interaktion beider Komponenten. Dass diese Salzbrücke einen grösseren Beitrag zur Ligandenbindung liefert als die zwischen der α -Aminogruppe und dem Asp #161 lässt sich wiederum möglicherweise mit den unterschiedlich hohen Affinitäten der beiden Proteindomänen für die Liganden erklären: wie bereits oben erwähnt, liegt immer ein Anteil an Rezeptormolekülen in der offenen, ligandenkomplexierten Form vor, wobei in diesem Fall davon ausgegangen wird, dass der Ligand dann ausschliesslich mit Resten der Domäne I wechselwirkt. Das Arg #77 liegt in der Domäne I, das Asp #161 jedoch in der Domäne II, so dass die Salzbrücke zwischen diesem Rest und der α -Aminogruppe nicht in allen Rezeptor-Ligandenkomplexen hergestellt wird. Die Salzbrücke zwischen dem Arg #77 und der Carboxygruppe wird jedoch auch im ligandenkomplexierten, offenen Zustand ausgebildet. Kann dieser Kontakt nun nicht mehr hergestellt werden (z.B. bei der Interaktion mit L-Histidinamid, bei dem die Carboxygruppe durch eine Amidfunktion substituiert ist), kommt es zu drastischen Einbussen der Affinität, die selbst durch die relativ starken Kontakte, die das HisJ^{L52F} über das Phe #52 zu den Seitenkettenatomen des Liganden herstellt, nicht aufgehoben werden, da die Affinität des HisJ^{L52F} für L-Histidinamid nur ca. doppelt so hoch wie die des wt-HisJ ist. Insgesamt lässt sich aus den Messungen der K_d -Werte für die Interaktion der HisJ-Varianten mit den basischen D-Aminosäuren, sowie den Histidinderivaten die wahrscheinliche Lage der basischen D-Aminosäuren im Komplex mit dem Rezeptor vorhersagen, ohne dass Strukturdaten zu einem HisJ-D-Ligand-Komplex vorliegen.

5.6 Einfluss der basischen L-Aminosäuren auf den Entfaltungsprozess der HisJ-Varianten

Untersuchungen zum Einfluss diverser Liganden auf den Entfaltungsprozess des HisJ-Varianten ergaben, dass beide Proteine von den basischen L-Aminosäuren stabilisiert werden, d.h., bei Zusatz dieser Liganden sind höhere Harnstoffkonzentrationen nötig, um eine vollständige Entfaltung der Proteine zu erreichen. Wie weit die Harnstoffkonzentration, bei der die Hälfte aller Rezeptormoleküle im denaturierten Zustand vorliegt ([Urea]/2-Wert), durch Zugabe von Liganden erhöht wird, korreliert jedoch nur bedingt mit den Bindungskonstanten für die Wechselwirkung mit dem jeweiligen Ligand. Generell lässt sich feststellen, dass HisJ^{L52F} von allen drei basischen L-Aminosäuren stärker stabilisiert wird, als das wt-HisJ, was durch vermutlich stärkere Wechselwirkung mit diesen Liganden erklärt werden kann. Der [Urea]/2-Wert des ligandenfreien HisJ^{L52F} liegt mit $2,86 \pm 0,02$ M deutlich niedriger, als bei Zusatz von L-Lysin ($4,36 \pm 0,02$ M), L-Arginin ($4,33 \pm 0,01$ M) oder L-Histidin ($5,85 \pm 0,04$ M). L-Histidin übt also einen sehr starken positiven Effekt auf die Stabilität der HisJ^{L52F}-Variante aus. Diese Tatsache ist in guter Übereinstimmung mit der hohen Affinität, die diese Proteinvariante für L-Histidin besitzt. L-Lysin und L-Arginin bewirken ebenfalls eine Stabilisierung des HisJ^{L52F}, wenn auch

nicht in so starkem Maße wie L-Histidin, für beide Liganden besitzt der Rezeptor auch niedrigere Affinität. Allerdings unterscheiden sich die Bindungskonstanten für die Wechselwirkung des HisJ^{L52F} mit L-Lysin (K_d -Wert: $0,71 \pm 0,19 \mu\text{M}$) und L-Arginin (K_d -Wert: $0,12 \pm 0,03 \mu\text{M}$) deutlich, während beide Liganden einen ähnlich starken Einfluss auf die Stabilität des Proteins zeigen. Dieses Phänomen zeigt sich ebenfalls bei den Untersuchungen des Einflusses der basischen L-Aminosäuren auf den Entfaltungsprozess von HisJ: der [Urea]₂-Wert des ligandenfreien Proteins liegt mit $2,71 \pm 0,02 \text{ M}$, ebenfalls niedriger als bei Zusatz von L-Lysin ($3,51 \pm 0,01 \text{ M}$), L-Arginin ($3,41 \pm 0,01 \text{ M}$) oder L-Histidin ($4,93 \pm 0,06 \text{ M}$). Auch HisJ wird von L-Histidin, zu dem es ebenfalls die höchste Affinität besitzt, am stärksten stabilisiert und auch auf HisJ wirken L-Arginin und L-Lysin ähnlichem Masse stabilisierend, obwohl die Bindungskonstanten für die Wechselwirkung mit diesen Liganden deutlich divergieren (K_d -Wert für die Interaktion mit L-Lysin: $13,6 \pm 2,8 \mu\text{M}$, für die Wechselwirkung mit L-Arginin: $0,77 \pm 0,15 \mu\text{M}$). Der Grad, in welchem ein Ligand das Protein zu stabilisieren vermag, scheint also nicht ausschliesslich von der Stärke der Interaktion mit diesem Liganden abzuhängen, es spielen noch andere Faktoren eine Rolle. Auch hier wäre es denkbar, dass der beobachtete Effekt auf unterschiedlich starke Stabilisierung der geschlossenen Konformation der HisJ-Varianten durch unterschiedliche Liganden zurückzuführen ist. (Kreimer *et al.*, 2000) fanden heraus, dass die beiden Domänen des HisJ unabhängig voneinander falten. Es wäre denkbar, dass die Domänen in der offenen Konformation dem Denaturierungsmittel eine grössere Angriffsfläche bieten und daher bereits bei vergleichsweise niedrigen Harnstoffkonzentrationen im denaturierten Zustand vorliegen. In der geschlossenen, ligandenkomplexierten Konformation könnte das Netzwerk an Kontakten des Liganden zu beiden Domänen, die individuelle dreidimensionale Struktur der einzelnen Domänen stabilisieren, so dass höhere Harnstoffkonzentrationen nötig sind, um eine Denaturierung des Proteins zu bewirken. Ein Ligand, der in weniger starkem Masse in der Lage ist, die geschlossene Konformation zu stabilisieren, während dessen Bindung also ein signifikanter Anteil an Rezeptormolekülen die offene Konformation einnimmt, wäre dann weniger in der Lage, das gesamte Protein zu stabilisieren. Man kann sich vorstellen, dass ein Ligand, der nur mit Resten der Domäne I wechselwirkt, den nativen Zustand dieser Domäne zwar zu stabilisieren vermag, die Domäne II jedoch, die in der offenen, ligandenkomplexierten Form nicht an der Ligandenbindung beteiligt ist, sensitiver für Denaturierungsmittel ist und somit bei niedrigeren Harnstoffkonzentrationen entfaltet. Es wurde bereits oben diskutiert, dass bei der Wechselwirkung von HisJ mit L-Lysin möglicherweise mehr Rezeptormoleküle in der ligandenkomplexierten, offenen Konformation vorliegen, als bei der Wechselwirkung mit L-Histidin bzw. L-Arginin. Allerdings ist L-Lysin noch in geringfügig stärkerem Masse als L-Arginin in der Lage, beide HisJ-Varianten zu stabilisieren. L-Arginin bewirkt, wie in fluorimetrischen Messungen gezeigt; eine ebenso starke Erhöhung der Tryptophanfluoreszenz wie L-Histidin, wenn man diese Tatsache als Erklärung, dass es in ebenso starkem Masse wie L-Histidin die geschlossene Konformation der Proteine stabilisiert, scheint es verwunderlich, dass es den geringsten Einfluss auf die

Stabilität der Rezeptoren zeigt. Möglich wäre, dass auch L-Arginin die geschlossene Konformation weniger stark stabilisiert als L-Histidin, die fluorimetrischen Messungen jedoch nicht empfindlich genug sind, um diesen Effekt – falls er nicht so stark ist wie Falle der Wechselwirkung mit L-Lysin – zu detektieren. Dennoch bleibt ungeklärt, warum L-Arginin, welches von den HisJ-Varianten sowohl mit höherer Affinität gebunden wird als L-Lysin, als auch die geschlossene Konformation der Rezeptoren anscheinend stärker als L-Lysin stabilisiert, auf den Entfaltungsprozess einen geringeren Einfluss als L-Lysin aufweist. Möglich wäre allerdings, dass L-Arginin als grösstes aller Ligandenmoleküle eine etwas sperrigere Position in der Bindungstasche einnimmt, die zwar eine starke Wechselwirkung mit dem Rezeptor und auch eine Stabilisierung der geschlossenen Konformation erlaubt, sich allerdings weniger stabilisierend auf das gesamte Protein auswirkt.

6 Diskussion zur ligandenvermittelten Dimerstabilisierung anhand zweier Varianten des GCN4-Leucinzipper aus *Saccharomyces cerevisiae*

6.1 Einfluss der Mutationen L5G und L14,15A auf das Homodimerisierungsverhalten des GCN4-Leucinzipper

Durch Austausch des Leucinrestes an Position #7 gegen ein Glycin, bzw. der Leucinreste an den Positionen #14 und #15 gegen je ein Alanin wurden GCN^{mut}-Varianten GCN^{L5G} und GCN^{Ala} generiert, von denen angenommen wurde, dass in ihrer Fähigkeit, stabile Homodimere auszubilden, im Vergleich mit dem wt-GCN eingeschränkt sind. Diese Annahme wurde aufgrund der Tatsache getroffen, dass das GCN4-Homodimer hauptsächlich durch hydrophobe Kontakte der an jeder siebten Position dieses Proteins befindlichen Leucinreste stabilisiert wird (O'Shea *et al.*, 1989) und durch Austausch eines oder mehrerer Leucinreste gegen Aminosäuren mit kleinen Resten, Lücken an den entsprechenden Positionen entstehen, und das Homodimer so destabilisiert werden sollte. Dass in den GCN^{mut}-Varianten solche Lücken an den Positionen entstehen, an denen Leucinreste gegen Glycin bzw. Alanin ausgetauscht wurden, konnte anhand zweier computergenerierter GCN^{mut}-Strukturen, die basierend auf der Kristallstruktur des wt-GCN erstellt wurden, gezeigt werden.

Diese Lücken führen zu deutlichen Einbußen der Homodimerisierungstendenz des GCN4, wie Untersuchungen mit dem ToxR-System zeigten. Dabei zeigte sich, dass die β -Galaktosidase-Aktivität im Lysat von *E. coli* Zellen, welche die Fusionsproteine ToxR'HisJGCN^{L5G} bzw. ToxR'HisJGCN^{Ala} produzieren, gegenüber der von Zellen, die das pHKToxR'HisJGCN (also mit dem wt-GCN-Zipper) tragen ca. um den Faktor vier vermindert ist, was auf ein drastisch eingeschränktes Homodimerisierungsverhalten der GCN^{mut}-Varianten schließen lässt. Allerdings scheint durch die Mutationen die Fähigkeit zur Homodimerbildung nicht komplett unterbunden zu sein, da das im β -Galaktosidase-Aktivitätsassay durch die Varianten bewirkte GCN^{L5G} und GCN^{Ala} gemessene Signal gegenüber der Negativkontrolle HisJ noch immer dreifach erhöht ist.

Auch im TOXCAT-Assay, bei dem die Dimerisierungstendenz von Proteinen anhand von Resistenz gegen Chloramphenicol detektiert wird, zeigen die GCN^{mut}-Varianten eine deutlich geringere Tendenz zur Ausbildung stabiler Homodimere, als das wt-GCN. So sind Zellen, die die Fusionsproteine ToxR'HisJGCN^{L5G} bzw. ToxR'HisJGCN^{Ala} produzieren, bei Chloramphenicolkonzentrationen > 90 $\mu\text{g/ml}$ im Nährmedium nicht mehr zum Wachstum befähigt, während Zellen, die das wt-GCN in Fusion mit ToxR produzieren, die Expression der Chloramphenicolacetyltransferase in so hohem Maße induzieren, dass Wachstum solcher Zellen bei Chloramphenicolkonzentrationen von bis zu 180 $\mu\text{g/ml}$ zu

beobachtet ist. Zellen hingegen, die HisJToxR-Proteine exprimieren, zeigen Wachstum nur bei Chloramphenicolkonzentrationen bis zu 60 µg/ml. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Fähigkeit der GCN^{mut}-Varianten zur Homodimerbildung nicht vollständig unterbunden ist. Auffällig ist weiterhin, dass beide GCN^{mut}-Varianten in ihrem Dimerisierungsverhalten ähnlich stark eingeschränkt sind, obwohl es sich um unterschiedliche Austausche (ein Glycin-, bzw. zwei Alaninreste) an unterschiedlichen Positionen (#7, bzw. #14 und #15) im Protein handelt. Dies könnte damit zu erklären sein, dass der Glycin zwar kleiner als Alanin ist und die durch seine Einführung an Position #7 entstehende Lücke sich drastischer auf die Homodimerisierung des GCN auswirkt, derselbe Effekt in der GCN^{Ala}-Mutante aber dadurch erreicht wird, dass hier zwei aufeinander folgende Leucinreste ausgetauscht wurden. Daraus liesse sich schliessen, dass das Leucin an Position #7 des GCN einen ähnlich hohen Beitrag zur Stabilität des Homodimers leistet, wie die beiden Leucinreste an den Positionen #14 und #15 zusammen. GCN^{L5G} und GCN^{Ala} sind Varianten des GCN-Zippers, die in ihrer Fähigkeit, stabile Homodimere zu bilden, eingeschränkt, aber nicht defizient sind, und stellen somit eine geeignete Basis für Untersuchungen zur ligandenvermittelten Dimerstabilisierung dar.

6.2 Einfluss verschiedener niedermolekularer Substanzen auf die Homodimerisierungstendenz der GCN^{mut}-Varianten

Eine 45 Substanzen umfassende Bibliothek niedermolekularer Verbindung wurde mittels Tox-Assay auf ihre Fähigkeit, die Homodimerisierung des GCN^{mut}-Varianten durch Füllen der über die Mutationen eingeführten Lücken zu stabilisieren, getestet.

dabei zeigte sich, dass eine Substanz (Nr. 27: 1-Hydroxy-2-Pyridin-thion Natriumsalz) toxisch für *E. coli* Zellen ist, bei Zusatz dieser Substanz zum Nährmedium konnte kein Wachstum der Zellen mehr beobachtet werden.

Sechs Substanzen bewirkten einen Anstieg der β-Galaktosidaseaktivität um > 25% im *E. coli* Lysat: bei Zellen, die mit dem Konstrukt pHKToxR'HisJGCN^{L5G} transformiert worden waren, bewirkten die Substanzen Nr. 13 (Alaninol), Nr. 37 (p-Hydroxybenzoesäure) und Nr. 40 (Benzoesäure) eine Erhöhung der β-Galaktosidaseaktivität um > 25 %. Bei Zellen, die mit dem Konstrukt pHKToxR'HisJGCN^{Ala} transformiert worden waren, konnte eine Erhöhung der β-Galaktosidaseaktivität um >25 % bei Zusatz der Substanzen Nr. 16 (C-Alanin-tert-Butylester) und 20 (S-Methylcystein) beobachtet werden. Die Substanz Nr. 31 (L-Sorbose) bewirkte bei beiden Varianten eine ähnlich starke Erhöhung der β-Galaktosidaseaktivität.

In einem zweiten Test konnte eine Erhöhung der β-Galaktosidaseaktivität bei Zusatz der Substanzen Alaninol, C-Alanin-tert-Butylester und S-Methylcystein nicht mehr nachgewiesen werden. Der Effekt, den sie im ersten Experiment scheinbar bewirkten, ist offenbar auf natürliche Schwankungen, dem ToxR-System als *in vivo*-Verfahren zur Untersuchung von Protein-Proteinwechselwirkungen unterworfen ist, zurückzuführen. So

ergaben frühere Experimente mit dem ToxR-System, dass Standardabweichungen von 25% nicht ungewöhnlich für diese Methode sind. Da für das erste Experiment anstelle der üblichen drei Parallelkulturen pro Ansatz nur eine Kultur getestet wurde, so dass die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen nicht möglich war, und die Auswirkungen, die die Substanzen Alaninol, C-Alanin-tert-Butylester und S-Methylcystein scheinbar auf die Homodimerisierungseigenschaften der GCN^{mut}-Varianten zeigten, offenbar zufällige Abweichungen darstellen. L-Sorbose wurde nicht erneut getestet, da es sich hierbei um ein relativ grosses ($M_r = 180,15$) Zuckermolekül handelt, welches wahrscheinlich nicht in die Lücke in den GCN^{mut}-Molekülen passt.

Ähnlich starke Abweichungen, allerdings in Form von Verminderung der β -Galaktosidaseaktivität, sind ebenfalls zu beobachten. So bewirken die Substanzen Nr. 10 (C-N-Methylalanin, Nr. 25 (n-Eikosan), Nr. 29 (α -Norborneol) und Nr. 38 (N-Benzylharnstoff) eine Verminderung der β -Galaktosidaseaktivität um ca. > 25% bei Zellen, die das ToxRHisJGCN^{L5G}-Fusionsprotein exprimierten, hatten jedoch auf die β -Galaktosidaseaktivität im Lysat von Zellen, die das ToxRHisJGCN^{Ala}-Fusionsprotein exprimierten keinen Einfluss. Dieses Ergebnis könnte ebenfalls auf die natürlichen Schwankungen des Systems zurückzuführen sein. Eine weitere Erklärung wäre, dass diese Substanzen spezifisch mit dem GCN^{L5G} wechselwirken, und zwar in einer Weise, die die Homodimerisierung dieses Proteins negativ beeinflusst. So ist es z. B. denkbar, dass eine Substanz sich in die durch die L5G-Mutation geschaffene Lücke einfügt und aufgrund seiner Grösse die Homodimerisierung sterisch behindert. Möglich wäre ebenfalls, falls es sich bei dem Molekül um ein Ion handelt, dass elektrostatische Abstossungen mit anderen Resten des GCN-Zippers (in unmittelbarer Nachbarschaft der L5G-Mutation befinden sich ein Glutamat und ein Aspartat) die Homodimerbildung erschweren. Um diesen Möglichkeiten weiter nachzugehen, müssten die entsprechenden Substanzen erneut getestet werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde darauf verzichtet, da hier in erster Linie Substanzen von Interesse waren, die einen positiven Einfluss auf die Dimerisierungseigenschaften der GCN^{mut}-Varianten zeigen.

6.3 Einfluss von Benzoesäure auf das in den Tox-Assays detektierte Signal

Die Möglichkeit, dass Benzoesäure das Homodimer der GCN^{L5G}-Variante spezifisch stabilisiert, wurde in Form von ToxR-Assays unter Verwendung aller Kontrollplasmide, wobei je drei Parallelkulturen angesetzt wurden, untersucht. Dabei wurden dem Medium unterschiedliche Konzentrationen an Benzoesäure zugesetzt und nach Inkubation die β -Galaktosidaseaktivität im Lysat der die verschiedenen ToxR-Fusionsproteine exprimierenden Zellen gemessen.

Dabei zeigte sich, dass durch Zugabe von Benzoesäure die β -Galaktosidaseaktivität im Lysat aller Zellen, also auch derer, die die Negativkontrollproteine ToxRHisJ und ToxRHisJGCN exprimierten, sowie des untransformierten *E. coli* Stamms FHK12 deutlich

erhöht war, und zwar in konzentrationsabhängiger Weise, d.h., je höher die Konzentration an Benzoesäure im Medium, desto höher ist auch die β -Galaktosidaseaktivität im Lysat der *E. coli* Zellen. Dabei reagieren alle Varianten (mit Ausnahme der untransformierten FHK12-Zellen, bei denen der Effekt ein wenig geringer ist) ähnlich stark auf die Anwesenheit von Benzoesäure, das Signal bei den GCN^{mut}-Konstrukten tragenden Varianten ist nicht stärker erhöht, als das der Kontrollen. Der Möglichkeit, dass Benzoesäure direkt mit dem Reporterenzym β -Galaktosidase interagiert und zu einer Steigerung der Aktivität dieses Enzyms beiträgt, wurde nachgegangen, indem der Versuch unter Verwendung des TOXCAT-Systems, bei dem die Chloramphenicolacetyltransferase als Reporterenzym fungiert, wobei in diesem Fall eine konstante Konzentration von 5 mM dem Medium zugesetzt wurde. Es zeigt sich hier ein ähnlicher Effekt: alle Zellen zeigten bei Zusatz von Benzoesäure Wachstum bei höheren Chloramphenicolkonzentration als Zellen, die jeweils dieselben ToxR-Fusionsproteine exprimierten, jedoch ohne Zusatz von Benzoesäure inkubiert worden waren.

Die Möglichkeit, dass Benzoesäure sowohl auf die β -Galaktosidase als auch auf die Chloramphenicolacetyltransferase eine aktivitätssteigernde Wirkung ausübt, scheint unwahrscheinlich, ist aber nicht völlig auszuschliessen. Allerdings müsste die Benzoesäure für eine direkte Interaktion mit der Chloramphenicolacetyltransferase ins Zellinnere von *E. coli* gelangen. Eine spontane Translokalisierung der Benzoesäure durch die Cytoplasmamembran scheint kaum möglich, allerdings existieren in *E. coli* eine Vielzahl von Transportsystemen (Quioco *et al.*, 1996), von denen einige verschiedenen Substanzen zu transportieren vermögen. So zeigten z.B. Miller *et al.*, (1983) dass Arabinose-Bindeprotein, welches am Transport von L-Arabinose ins Cytoplasma beteiligt ist, ebenfalls mit D-Fucose und D-Galaktose wechselwirkt.

Auch das gut untersuchte Maltose-Bindeprotein wechselwirkt neben seinem natürlichen Liganden Maltose mit einer Reihe unterschiedlicher Maltodextrine (Gehring, 1991).

Es wäre demnach denkbar, dass Benzoesäure als unspezifischer Ligand über eines der zahlreichen in *E. coli* existenten Transportsysteme ins Zellinnere gelangen kann.

Allerdings gibt es in der Literatur keine Hinweise auf Transportsysteme, die der Benzoesäure verwandte Substanzen ins Cytoplasma von *E. coli* transportieren.

Worauf der durch die Benzoesäure hervorgerufene Effekt der Aktivitätserhöhung der beiden Reporterenzyme tatsächlich beruht, liesse sich jedoch nur mit umfangreichen Analysen untersuchen, da in der lebenden *E. coli* Zelle eine Vielzahl molekularer Prozesse stattfinden, die von der Benzoesäure so beeinflusst werden können, dass daraus eine Erhöhung der Aktivität der Reportersysteme resultiert. So wurde z.B. von Atigadda *et al.*, (1999) und Brouillette *et al.*, (1999) gezeigt, dass Benzoesäurederivate als Proteaseinhibitoren fungieren können. Es wäre also denkbar, dass die Benzoesäure periplasmatische Proteasen inhibiert und so der Abbau der ToxR-Fusionsproteine im Periplasma eingeschränkt wird. Durch eine erhöhte Menge an ToxR-Fusionsproteinen in der Bakterienzelle würde auch die Transkription der unter Kontrolle des *ctx*-Promotors stehenden Gene in höherem Maße aktiviert werden, wie sich anhand von Untersuchungen

mit dem TOXCAT-System, bei sich dem die Expressionsrate der ToxR-Fusionsproteine über Zugabe von Arabinose regulieren lässt, gezeigt werden konnte (eigene Experimente). Abschliessend lässt sich festhalten, dass die GCN-Varianten GCN^{L5G} und GCN^{Ala} aufgrund ihres eingeschränkten Dimerisierungsverhaltens gut als Basis für die Entwicklung eines Modellsystems zur Etablierung eines genetischen Schalters für die gezielte Genexpression eignen. Allerdings ist es wenig verwunderlich, dass unter nur 45 auf ligandeninduzierte Dimerstabilisierung getestete Substanzen, kein Kandidat identifiziert werden konnte, der reproduzierbar und ausschliesslich bei Zellen, die eines der beiden ToxR-GCN^{mut}-Konstrukte produzierten einen Effekt zeigte.

Für die Suche nach einer solchen Substanz müssten wesentlich mehr niedermolekulare Verbindungen (möglichst > 1000) getestet werden.

Dies könnte nur unter Einsatz von *High Throughput Screening*-Verfahren geleistet werden, eine Durchmusterung von 1000 oder mehr Substanzen mithilfe des in diesem Labor standardmässig angewendeten ToxR-Assays wäre zu aufwendig.

7 Zusammenfassung zur gezielten Modifikation der Bindungseigenschaften des HisJ

Durch den Austausch des an Position #52 befindlichen Leucinrestes des HisJ gegen ein Phenylalanin wurde die Variante HisJ^{L52F} generiert, die sich bei gleicher konformationeller Stabilität und genereller Funktionsweise im Vergleich zum wt-HisJ deutlich hinsichtlich der Affinitäten für verschiedene niedermolekulare Liganden unterscheidet.

- Durch Analyse der Expression beider HisJ-Varianten nach Induktion mit aTc konnte eine deutliche Akkumulation der HisJ-Varianten im Periplasma von *E. coli* gezeigt werden. Sowohl das HisJ als auch das HisJ^{L52F} wurden über einen C-terminalen HexaHistag mittels IMAC aus dem Periplasma von *E. coli* gereinigt, wobei Ausbeuten von ca. 15 mg Protein/ 1l Bakterienkultur erzielt wurden.
- Die Messung der konformationellen Stabilität der HisJ-Varianten ergab, dass der Austausch von Leucin zu Phenylalanin an Position #52 nicht zu drastischen Einbußen in der Stabilität des HisJ führt.
- Die K_d -Werte für die Interaktion der HisJ-Varianten mit den basischen L-Aminosäuren wurden mittels Gleichgewichtsdialyse unter Verwendung Tritium-markierter Liganden durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass HisJ^{L52F} eine im Vergleich zum wt-HisJ um den Faktor 1,5 erhöhte Affinität für L-Histidin, eine um den Faktor 6,5 erhöhte Affinität für L-Arginin und eine um den Faktor 19 erhöhte Affinität für L-Lysin besitzt. Messungen mit gereinigtem LAOBP ergaben, dass die Affinitäten dieses Proteins für L-Arginin und L-Lysin denen des HisJ^{L52F} ähneln, seine Affinität für L-Histidin im Vergleich zu HisJ^{L52F} um den Faktor 40 vermindert ist.
- Die Erhöhung der Affinität für die basischen L-Aminosäuren durch Einführen eines Phenylalaninrestes an #52 ist auf verstärkte hydrophobe Kontakte des Phenylalaninrestes mit den Seitenkettenatomen der Liganden zurückzuführen. Dies konnte anhand von Bestimmungen der Affinitätskonstanten der Wechselwirkung beider HisJ-Varianten mit den basischen D-Aminosäuren gezeigt werden. Bei insgesamt im Vergleich zu den L-Enantiomeren deutlich schwächeren Wechselwirkungen, ist die Affinität des HisJ^{L52F} im Vergleich zum wt-HisJ gegenüber D-Histidin um den Faktor 18 und die Affinität für D-Arginin um den Faktor 43 erhöht. Eine Wechselwirkung von HisJ mit D-Lysin konnte nicht detektiert werden, während HisJ^{L52F} mit D-Lysin mit einer Affinitätskonstante im mikromolaren Bereich wechselwirkt.
- Bei der Interaktion der HisJ-Varianten mit den basischen D-Aminosäuren bleiben die Kontakte, die die Proteine zu den Seitenkettenatomen und zu der Carboxygruppe der Liganden ausbilden, erhalten, während die Kontakte zur α -Aminogruppe nicht hergestellt werden können. Dies ergaben Messungen der

K_d -Werte der Wechselwirkung der HisJ-Varianten mit Carboxy- bzw. α -Aminosubstituierten L-Histidin-Derivaten. So interagieren beide HisJ-Varianten mit L- β -Imidazolylmilchsäure, bei dem die α -Aminogruppe durch eine Hydroxygruppe substituiert ist, mit ähnlichen Affinitäten wie mit D-Histidin, während die Wechselwirkung mit L-Histidinamid, das anstelle der Carboxygruppe eine Amidfunktion besitzt, deutlich eingeschränkt ist.

- Beide HisJ-Varianten werden durch Interaktion mit den basischen L-Aminosäuren stabilisiert, wie Untersuchungen zum Einfluss der Liganden auf den Entfaltungsprozess der Proteine zeigten. Eine eindeutige Korrelation des Ausmaßes der Rezeptorstabilisierung durch einen Liganden mit der Höhe der Affinität des Rezeptors für diesen Liganden besteht dabei nicht. Allerdings werden beide HisJ-Varianten am stärksten von L-Histidin stabilisiert, für das sie auch jeweils die höchste Affinität aufweisen. Von L-Arginin und L-Lysin, für die sie zum Teil stark unterschiedliche Affinitäten besitzen, werden beide HisJ-Varianten ähnlich stark stabilisiert.

8 Zusammenfassung zur ligandenvermittelten Dimerstabilisierung anhand zweier Varianten des GCN-Leucinzippers aus *S. cerevisiae*

Durch Austausch der Leucinreste an Position #7 gegen einen Glycinrest, bzw. der Leucinreste an den Positionen #14 und #15 gegen Alaninreste wurden mit GCN^{L5G} und GCN^{Ala} zwei GCN-Varianten mit deutlich verminderter Homodimerisierungstendenz geschaffen, welche als Basis für die Entwicklung eines genetischen Schalters zur gezielten Genexpression eingesetzt werden können.

- Anhand von Dimerisierungsstudien mittels ToxR-vermittelter Transkriptionsaktivierung konnte gezeigt werden dass beide GCN^{mut}-Varianten eine gegenüber dem wt-GCN um den Faktor vier verringerte Tendenz zur Ausbildung von Homodimeren besitzen. Dass ihre Fähigkeit zu homodimerisieren durch die jeweiligen Austausche nicht völlig verloren ging, konnte anhand der Tatsache, dass sie im Vergleich zur der monomeren Negativkontrolle HisJ eine um den Faktor drei erhöhte Tendenz zur Homodimerisierung zeigen, geschlossen werden.
- Bei einer Durchmusterung einer 45 Mitglieder umfassenden Substanzbibliothek auf mögliche Stabilisierung der Homodimere der GCN^{mut}-Varianten mittels Tox-Assay konnten sechs Substanzen identifiziert werden, deren Zugabe in einem erhöhten Signal resultierte. Für fünf dieser Substanzen konnte der Effekt nicht reproduzierbar nachgewiesen werden, eine Substanz, Benzoesäure, wurde eingehender auf mögliche Stabilisierung der GCN^{mut}-Homodimere untersucht.
- Mittels Tox-Assay konnte gezeigt werden, dass Benzoesäure konzentrationsabhängig eine Erhöhung des Signals nicht nur bei Zellen, die die GCN^{mut}-Varianten in Fusion mit ToxR exprimieren, sondern auch bei allen Negativkontrollen, einschliesslich des untransformierten Reporterstamms FHK 12 bewirken.
- Mittels TOXCAT-Assay wurde gezeigt, dass die Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität bei Zusatz von Benzoesäure nicht auf direkte Interaktion mit dem Reporterenzym zurückzuführen ist, da auch im TOXCAT-Assay derselbe Effekt zu beobachten war. So wuchsen bei Zusatz von Benzoesäure im Medium alle Zellen unabhängig von dem von ihnen exprimierten ToxR-Fusionsgen bei höheren Chloramphenicolkonzentrationen als bei Abwesenheit von Benzoesäure.
- Eine Erklärung für die Erhöhung des Signals durch Zusatz von Benzoesäure in beiden ToxR-Assays konnte aufgrund der komplexen Natur des Bakterienstoffwechsels, auf den die Benzoesäure auf unterschiedliche Art Einfluss haben könnte, nicht gefunden werden.

9 Literaturverzeichnis

Ames, G. F.-L. (1986) Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanisms, and evolution, *Ann. Rev. Biochem.* 55, 397-425

Ames, G. F.-L. & Lever, J. (1970) Components of histidine transport: histidine-binding proteins and HisP protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 1096-1103

Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C. & Zenke, M. (1987) Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis, *Nucl. Acids Res.* 15, 4593-4602

Arndt, K., Fink, G.R. (1986) GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 22, 8516-20

Atigadda, V. R., Brouillette, W. J., Duarte, F., Babu, Y. S., Bantia, S., Chand, P., Chu, N., Montgomery, J. A., Walsh, D. A., Sudbeck, E. A., Finley, J., Air, G. M., Luo, M., and Laver, G. W., (1999) Hydrophobic Benzoic Acids as Inhibitors of Influenza Neuraminidase. *BioOrg. Med. Chem.*, 7, 2487-2497

Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tasumi, M. (1977) The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures, *J. Mol. Biol.* 112, 535-542

Boos, W. & Lucht, J. M. (1996) Periplasmic binding protein-dependent ABC transporters, in: *Escherichia coli and Salmonella, 2nd edition, Vol. 1*, (Neidhardt, F. C. ed.) 1175-1209, ASM Press, Washington D.C.

Brouillette, W. J., Atigadda, V. R., Luo, M., Air, G. M., Babu, Y. S., and Bantia, S., (1999) Design of Benzoic Acid Inhibitors of Influenza Neuraminidase Containing a Cyclic Substitution for the N-Acetyl Grouping. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9, 1901-1906

Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. & S. Fields (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. & Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110-2114

DiRita, V. J. & Mekalanos, J. J. (1991) Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation, *Cell* 64, 29-37

Ellenberger, T.E., Brandl, C.J., Struhl, K., Harrison, S.C. (1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*. 71, 1223-37.

Flory, P. J. (1956) Theory of elastic mechanisms in fibrous proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5222-5235

Gehring, K., Williams, P.G., Pelton, J.G., Morimoto, H., Wemmer, D.E. (1991) Tritium NMR spectroscopy of ligand binding to maltose-binding protein. *Biochemistry* 30, 5524-31

Guo, Z., Zhou, D., Schultz, P. G. (2000) Designing small-molecule switches for protein-protein interactions. *Science* 288, 2042-5.

Greenblatt, J. & Schleif, R. (1971) **Arabinose C protein: regulation of the arabinose operon in vitro.** *Nat New Biol* 233 (40),166-70

Gurezka, R. & Langosch, D. (2001) In vitro selection of membrane-spanning leucine zipper protein-protein interaction motifs using POSSYCCAT. *J Biol Chem.* 276(49), 45580-7.

Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580

Hennecke, F. (1996) Ein genetischer Indikator für unsymmetrische Protein/Protein-Interaktionen im periplasmatischen und cytoplasmatischen Kompartiment von *E. coli* abgeleitet vom Signaltransduktionsprotein ToxR, *Promotion am Institut für Molekulare Genetik der Universität Göttingen*

Higgins, C. F. & Ames, G. F.-L. (1981) Two periplasmic transport proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: complete nucleotide sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6038-6042

Hope, I. A., Mahadevan, S., Struhl, K. (1988) Structural and functional characterization of the short acidic transcriptional activation region of yeast GCN4 protein. *Nature* 16, 635-40

- Hope, I. A. & Struhl, K.** (1986) Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 46, 885-94
- Horovitz, A. & Fersht, A. R.** (1992) Co-operative interactions during protein folding. *J Mol Biol.* 224(3), 733-40.
- Hu, J.C., O'Shea, E.K., Kim, P.S., Sauer, R.T.** (1990) Sequence requirements for coiled-coils: analysis with lambda repressor-GCN4 leucine zipper fusions. *Science* 250, 1400-3
- Hulme, E. C. & Birdsall, N. J. M.** (1992) Strategy and tactics in receptor-binding studies, in: Receptor-Ligand Interactions – A Practical Approach, (Hulme, E. C. ed.) 63-174, Oxford University Press, New York
- Johnson, P. F. & McKnight S. L.** (1989) Eucaryotic transcriptional regularory proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 58, 799-839
- Klotz, I. M.** (1989) Ligand-Protein binding affinity; in: Protein function – a practical approach, (Creighton, T. E. ed.) 25-54, IRL Press at Oxford University Press
- Kolmar, H., Ferrando, E, Hennecke, F., Wippler, J., Fritz, H-J.,** (1992) General mutagenesis/gene expression procedure for the construction of variant immunoglobulin domains in *Escherichia coli*. Production of the Bence-Jones protein REIv via fusion to beta-lactamase, *J. Mol. Biol.*, 228, 359-365
- Kolmar, H., Frisch, C., Götze, K. & Fritz, H.-J.** (1995b) Immunoglobulin mutant library genetically screened for folding stability exploiting bacterial signal transduction, *J. Mol. Biol.* 251, 471-476
- Kolmar, H., Frisch, C., Kleemann, G., Götze, K., Stevens, F. J., Fritz, H-J.,** (1994) Dimerization of Bence Jones proteins: linking the rate of transcription from an *Escherichia coli* promoter to the association constant of REIv, *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 375, 61-70
- Kolmar, H., Hennecke, F., Götze, K., Janzer, B., Vogt, B., Mayer, F., Fritz, H-J.** (1995a) Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures, *EMBO J.*, 14,3895-3904
- Kreimer, D.I., Malak, H., Lakowicz, J.R., Trakhanov, S., Villar, E., Shnyrov, V.L.** (2000) Thermodynamics and dynamics of histidine-binding protein, the water-soluble receptor of histidine permease. Implications for the transport of high and low affinity ligands. *Eur J Biochem.* 267, 4242-52

Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209

Lander, E. S., Linton, L. M. et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409, 860-021

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685

Liébecq, C., ed. (1978) *Biochemical nomenclature and related documents*, International Union for Biochemistry, The Biochemical Society, London

Liu, E. L. und Ames, G. F.-L. (1996) Characterization of transport through the periplasmic histidine permease using proteoliposomes reconstituted by dialysis, *J. Biol. Chem.* 272, 859-866

Mahadevan, S. & Struhl, K. (1990) **Tc, an unusual promoter element required for constitutive transcription of the yeast HIS3 gene.** *Mol Cell Biol* 9, 4447-55

Mandel, M. & Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection, *J. Mol. Biol.* 53, 159-163

Marquardt, D.W. (1963). An Algorithm for Least Squares Estimation of Parameters. *Journal of the Society of Industrial and Applied Mathematics* 11, 431-441

Miller, J. H. (1972): *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory.

Miller, M. III, Olson, J. S.; Pflugrath, J. W. & Quijcho, F. A. (1983) Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis, *J. Biol. Chem.* 258, 13665-13672

Miller, V. L., Taylor, R. K. & Mekalanos, J. J. (1987) Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein, *Cell* 48, 271-279

Miller, V. L., Mealanos, J.J. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol.* 170, 2575-83.

- Mitchell, A.P. & Magasanik, B.** (1984) Three regulatory systems control production of glutamine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12, 2767-73
- Müller, H.N. & Skerra, A.** (1994) Grafting of a high-affinity Zn(II)-binding site on the beta-barrel of retinol-binding protein results in enhanced folding stability and enables simplified purification. *Biochemistry* 33, 14126-35.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 35-350
- Neu, H. C. & Heppel, L. A.** (1965) The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroblasts, *J. Biol. Chem.* 240, 3685-3692
- Nikaido, K. & Ames, G. F.-L.** (1992) Purification and characterization of the periplasmic Lysine-, Arginine-, Ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium*, *J. Biol. Chem.* 267, 20706-20712
- Oh, B. H., Pandit, J., Kang, C. H., Nikaido, K., Gokcen, S., Ames, G. F., Kim, S. H.** (1993) Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J Biol Chem* 268, 11348-11255
- Oh, B.-H., Kang, C.-H., De Bondt, H., Kim, S.-H., Nikaido, K., Joshi, A. K. & Ames, G. F.-L.** (1994a) The bacterial periplasmic histidine-binding protein, *J. Biol. Chem.* 269, 4135-4143
- Oh, B. H., Ames, G. F., Kim, S. H.** (1994b) Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein. *J Biol Chem* 269 pp. 26323-26330
- O'Shea E.K., Rutkowski R., Kim P.S. (1989) **Evidence that the leucine zipper is a coiled coil.** *Science* 243, 538-42
- Pace, C.N.** (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* 131, 266-80.
- Pace, C.N, Laurents DV.** (1989) A new method for determining the heat capacity change for protein folding. *Biochemistry* 28, 2520-5
- Pace, C.N.** (1990) Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem Sci* 15:14-7

-
- Ponticelli, A.S. & Struhl, K.** (1990) Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* his3 transcription in vitro: biochemical support for multiple mechanisms of transcription. *Mol Cell Biol* 6, 2832-9
- Pu, W.T. & Struhl, K.** (1993) Dimerization of leucine zippers analyzed by random selection. *Nucleic Acids Res* 21, 4348-55
- Quioco, F. A. & Ledvina, P. S.** (1996) Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes, *Mol. Microbiol.* 20, 17-25
- Russ, W. P. & Engelman, D. M.** (1999) TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 863-8.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839):487-91
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson A. R.** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- Sayle, R. A. & Miller-White, E. J.** (1995) RasMol: biomolecular graphics for all, *Trends Biochem. Sci.* 20, 374
- Scopes, R. K. ed.** (1988) *Protein purification principles and practice* 2, Springer, New York
- Shumann, H. A.** (1982) Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. Role of the periplasmic maltose-binding protein and evidence for a substrate recognition site in the cytoplasmic membrane. *J. Biol.Chem.* 257, 5455-5461
- Singer, V.L., Wobbe C.R., Struhl K.** (1990) A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. *Genes Dev.* 4, 6-45
- Skerra, A.** (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131-135

Strauch, K., Johnson, K. & Beckwith, J. (1989) Characterization of *degP*, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature, *J. Bacteriol.* 171, 2689-2696

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354

Venter, J. C., Adams, M. D. et al (2001) The sequence of the human genome *Science* 291, 1304-1351

Wassenberg, D., Liebl, W. Jaenicke, R. (2000) Maltose-binding protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: stability and binding properties. *J Mol Biol.* 295, 279-88.

Weber, K. & Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.* 242, 15624-15629

Wiese, R.J., Uhland-Smith, A., Ross, T.K., Prahl, J.M., DeLuca, H.F. (1992) Up-regulation of the vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ results from ligand-induced stabilization. *J Biol Chem.* 267, 20082-6.

Wolf, A., Kai, C. L., Kirsch, J. F. & Ames, G. F.-L. (1996) Ligand-dependent conformational plasticity of the periplasmic histidine-binding protein HisJ, *J. Biol. Chem.* 271, 21243-21250

Wolf, A., Shaw, E. W., Oh, B.-H., De Bondt, H., Joshi, A. K. & Ames, G. F.-L. (1995) Structure/function analysis of the periplasmic histidine-binding protein, *J. Biol. Chem.* 270, 16097-16106

Yao, N., Trakhanov, S. & Quioco, F. A. (1994) Refined 1.89 Å structure of the histidine-binding protein complexed with histidine and its relationship with many other active transport/chemosensory proteins, *Biochemistry* 33, 4769-4779

Zhou, Z.X., Lane, M.V., Kemppainen, J.A., French, F.S., Wilson, E.M. (1995) Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol.* 2, 208-18

10 Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Ein- und Dreibuchstaben-Notierungen für Aminosäuren sowie die benutzten Abkürzungen für Nukleinsäure-Bausteine und alle physikalischen Größen entsprechen der Konvention der *International Union for Biochemistry* (Liébecq, 1978).

Å:	Angström, Längenmaß (10^{-10} m)
Abb.:	Abbildung
Amp:	Ampicillin
APS:	Ammoniumperoxodisulfat
<i>argT</i> :	Gen für das Lysin-, Arginin-, Ornithin-Bindeprotein
aTc:	Anhydrotracyclin
BCIP:	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (<i>p</i> -Toluidinsalz)
<i>bla</i> :	Gen für β -Lactamase aus <i>E. coli</i>
bp:	Basenpaare
BSA:	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
bzw.:	beziehungsweise
<i>cat</i> :	Gen für Chloramphenicolacetyltransferase
Cm:	Chloramphenicol
Da:	Dalton
ddNTP:	Dideoxynucleosidtriphosphat
DMSO:	Dimethylsulfoxid
dNTP:	Deoxynucleosidtriphosphat
dsDNA:	Doppelsträngige DNA
DTT:	Dithiothreitol
E:	Extinktion
ϵ_x :	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
ed.:	Editor
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat, Dinatrium Salz
EGB:	Ethylenglycolbisbernsteinsäure
ELISA:	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbet Assay</i>
F_x :	Fluoreszenz (relative Einheiten) bei x nm
f1:	Replikationsursprung des Phagen f1
fdT:	Transkriptionsterminatoren des Phagen f1
<i>GCN</i> :	Gen für den GCN4-Leucinzipper aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
h:	<i>hour</i> (Stunde)
<i>hisJ</i> :	Gen für das Histidin-Bindeprotein
IMAC:	<i>Immobilized Metal Ion Chromtography</i>
IPTG:	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
LAOBP:	Lysin-, Arginin-, Ornithin-Bindeprotein

<i>kan</i> :	Gen für die Aminoglycosid-3' Phosphotransferase
kb:	Kilobasenpaare
K_d :	Affinitätskonstante (M) der Rezeptor-Ligandenwechselwirkung
l:	Liter
λ :	Wellenlänge (nm)
λ_{ex} :	Anregungswellenlänge (nm)
LAOBP:	Lysin-/Arginin-/Ornithin-Bindeprotein
<i>lacZ</i> :	Gen für die β -Galaktosidase
M:	Molar
μ :	Mikro (10^{-6})
min:	Minute
ml:	Milliliter
M_r :	Relative Molmasse
MU:	Miller Units
n:	nano (10^{-9})
NBT:	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
O.D. _x :	Optische Dichte bei x nm
ONPG:	o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
ori:	<i>Origin of replication</i> , Replikationsursprung
p. a.:	Pro analysis, zur Analyse
PAA:	Polyacrylamid
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS:	Phosphate buffer saline, Phosphat gepufferte Saline
PCR:	Polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
RT:	Raumtemperatur
RU:	<i>Response Units</i>
s:	Sekunde
SDS:	Sodiumdodecylsulfate, Natriumlaurylsulfat
Tab.:	Tabelle
TE:	Tris/EDTA-Puffer
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethylenamin
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm:	Umdrehungen pro Minute
ü. N.:	über Nacht
UV:	Ultraviolett
v/v:	Volumen pro Volumen
Vol.:	Volumen
w/v:	Gewicht pro Volumen
z. B.:	zum Beispiel

Anhang

A. Nukleotidsequenzen der relevanten Gene

Nukleotidsequenz des *hisJ*-Gens und die daraus abgeleitete Peptidsequenz des HisJ im Einbuchstaben-Code

```

gcgattccgcagaacatccgcatcggtagccgacccgacctatgcgccatttgaatcaaaa
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
cgctaaggcgtcttgtaggcgtagccatggctgggctggatagcgcggtaaacttagtttt
a   A   I   P   Q   N   I   R   I   G   T   D   P   T   Y   A   P   F   E   S   K   -

aattcacaaggcgaactggttggcttcgatatcgatctggcaaaggaattatgcaaacgc
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ttaagtgttccgcttgaccaaccgaagctatagctagaccgtttccttaataacgtttgcg
a   N   S   Q   G   E   L   V   G   F   D   I   D   L   A   K   E   L   C   K   R   -

atcaatacgcaatgtacgtttgcgaaaatccgctggatgctgtaaatcccgtccttaaaa
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
tagttatgctgtacatgcaaacagcttttaggcgacctacgcaattagggcaggaatfff
a   I   N   T   Q   C   T   F   V   E   N   P   L   D   A   L   I   P   S   L   K   -

gcaagaagattgacgccatcatgtcatcgctttccattacggaaaaacgtcagcaagaa
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
cgcttcttctaactgcggtagtagcagtagcgaaaggtaatgcctttttgcagtcggttctt
a   A   K   K   I   D   A   I   M   S   S   L   S   I   T   E   K   R   Q   Q   E   -

atagccttcaccgacaaactgtacgctgccgattctcgtttgggtgggagaaaaattct
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
tatcggaagtggctggttgacatgacgacggctaagagcaaaccaccaccgctttttaaga
a   I   A   F   T   D   K   L   Y   A   A   D   S   R   L   V   V   A   K   N   S   -

gacattcagccgacagtcgagtcgctgaaaggcaaacgggtaggcgtattgcagggcacc
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ctgtaagtcggctgtcagctcagcgactttccgtttgcccatccgcataacgtcccgtgg
a   D   I   Q   P   T   V   E   S   L   K   G   K   R   V   G   V   L   Q   G   T   -

accaggagacggttcggtaatgaacattgggcaccaaaggcattgaaatcgtctcgtat
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
tgggtcctctgcaagccattacttgaaccgctgggtttccgtaacttttagcagagcata
a   T   Q   E   T   F   G   N   E   H   W   A   P   K   G   I   E   I   V   S   Y   -

```

```

caggggcaggacaacattttattctgacctgactgccggacgtattgatgccgcgttccag
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
gtccccgtcctggtgtaaataagactggactgacggcctgcataactacggcgcaaggctc
a      Q  G  Q  D  N  I  Y  S  D  L  T  A  G  R  I  D  A  A  F  Q  -
gatgaggctcgctgccagcgaaggtttcctcaaacaacctgtcggtaaagattacaaattc
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ctactccagcgcggctcgcttccaaaggagtttggtggacagccatttctaagttaaag
a      D  E  V  A  A  S  E  G  F  L  K  Q  P  V  G  K  D  Y  K  F  -
ggtggcccgtctgttaaagatgaaaaactgtttggcgtagggaccggcatgggcctgcgt
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
ccaccgggcagacaatttctactttttgacaaaaccgcatccctggcgtaccocggacgca
a      G  G  P  S  V  K  D  E  K  L  F  G  V  G  T  G  M  G  L  R  -
aaagaagataacgaactgcgcgaagcactgaacaaagcctttgccgaaatgcgcgctgac
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
tttcttctattgcttgacgcgcttcgtgacttgtttcggaaacggctttacgcgcgactg
a      K  E  D  N  E  L  R  E  A  L  N  K  A  F  A  E  M  R  A  D  -
ggtacttacgagaaattagcgaaaaagtacttcgattttgatgtttatggtggc
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 714
ccatgaatgctctttaatcgctttttcatgaagctaaaactacaaataaccaccg
a      G  T  Y  E  K  L  A  K  K  Y  F  D  F  D  V  Y  G  G  -

```

Nukleotidsequenz des *argT*-Gens und die daraus abgeleitete Peptidsequenz des LAOBP im Einbuchstaben-Code

```

gcattgccggagacggtacgtatcggaaccgataccacctatgcaccggttctcgtcgaaa
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
cgtaacggcctctgccatgcatagccttggctatggtggatacgtggcaagagcagcttt
a      A  L  P  E  T  V  R  I  G  T  D  T  T  Y  A  P  F  S  S  K  -
gatgccaaaggtgactttgtcggctttgatatcgatctcggtaacgagatgtgcaaaccgg
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ctacggtttccactgaaacagccgaaactatagctagagccattgctctacacgtttgcc
a      D  A  K  G  D  F  V  G  F  D  I  D  L  G  N  E  M  C  K  R  -
atgcaggtgaaatgtacctgggttgccagtgactttgacgcgctgatccoctcactgaaa
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
tacgtccactttacatggaccaacggctcactgaaactgacgcgactaggggagtgacttt
a      M  Q  V  K  C  T  W  V  A  S  D  F  D  A  L  I  P  S  L  K  -
gcgaaaaaaatcgacgccattatctcgtcgctttccattaccgataaaacgtcagcaggag
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
cgcttttttttagctgcggttaataaagcagcgaaggtaatggctatctgcagtcgctctc
a      A  K  K  I  D  A  I  I  S  S  L  S  I  T  D  K  R  Q  Q  E  -

```

```

attgccttctccgacaagctgtacgccgcagattcccgtctgattgccgccaaagggttcg
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
taacggaagaggctgttcgacatgcggcgtctaagggcagactaacggcggtttccaagc
a      I A F S D K L Y A A D S R L I A A K G S -
ccgattcagccaacgctggactcactgaaaggtaaacaatggtgggtgtgctgcagggatca
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ggctaagtcggttgcgacctgagtgactttccatttgtacaaccacacgacgtccctagt
a      P I Q P T L D S L K G K H V G V L Q G S -
accaggaagcttacgctaacgagacctggcgtagcaaagggtgtggatgtgggtggcctat
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
tgggtccttcgaatgcgattgctctggaccgcatcgttccacacctacaccaccggata
a      T Q E A Y A N E T W R S K G V D V V A Y -
gccaaccaggatttgggtctattccgatctggctgcaggacgtctggatgctgcaactgcag
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
cggttggtcctaaaccagataaggctagaccgacgtcctgcagacctacgacgtgacgtc
a      A N Q D L V Y S D L A A G R L D A A L Q -
gatgaagttgctgccagcgaaggattcctcaagcaacctgctggtaaagatttcgccttt
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ctacttcaacgacggctcgcttcctaaggagttcgttggacgaccatttctaagcggaaa
a      D E V A A S E G F L K Q P A G K D F A F -
gctggctcatcagtaaaagacaaaaaataacttcgggtgatggcaccgggtgtagggctacgt
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
cgaccgagtagtcattttctgttttttatgaagccactaccgtggccacatcccgatgca
a      A G S S V K D K K Y F G D G T G V G L R -
aaagatgatgctgaactgacggctgccttcaataaggcgcttggcgagctgcgtcaggac
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
tttctactacgacttgactgccgacggaagttattccgcgaaccgctcgacgcagtcctg
a      K D D A E L T A A F N K A L G E L R Q D -
ggcacctacgacaagatggcgaaaaagtattttgactttaatgtctacggtgac
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 714
ccgtggatgctgttctaccgctttttcataaaaactgaaattacagatgccactg
a      G T Y D K M A K K Y F D F N V Y G D -

```

Nukleotidsequenz des Leucinzipperanteils des *GCN4*-Gens und die daraus abgeleitete Peptidsequenz Leucinzipperanteils des des GCN4 im Einbuchstaben-Code

```

      TTGCAAAGAATGAAACAACCTGAAGACAAGGTTGAAGAATTGCTTTTCGAAAAATTATCAC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      AACGTTTCTTACTTTGTTGGACTTCTGTTCCAACCTTCTTAACGAAAGCTTTTTAATAGTG
a      L  Q  R  M  K  Q  P  E  D  K  V  E  E  L  L  S  K  N  Y  H  -

      TTGAAAATGAGGTTGCCAGATTAAGAAATTAGTTGGCGAACGCTGA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 108
      AACCTTTTACTCCAACGGTCTAATTTCTTTAATCAACCGCTTGCGACT
a      L  E  N  E  V  A  R  L  K  K  L  V  G  E  R  *  -
```

B. Herleitung der Formel zur Bestimmung der Bindungskonstanten

Verwendete Variablen:

[R]: Konzentration an freien Rezeptormolekülen (M)

[L]: Konzentration an freien Ligandenmolekülen (M)

[RL]: Konzentration an Rezeptor-Ligandenkomplex (M), bzw. Anteil an Rezeptor-Ligandenkomplex (dimensionslos)

[Rt]: totale (= eingesetzte) Rezeptorkonzentration (M)

K_d : Dissoziationskonstante (M)

Bei Rezeptor-Liganden Wechselwirkungen handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion:



der K_d -Wert ergibt sich nach dem Massenwirkungsgesetz:

$$K_d = \frac{[R] * [L]}{[RL]} \quad [B.2]$$

Es gilt weiterhin, dass sich die totale Rezeptorkonzentration zusammensetzt aus der Konzentration an Rezeptor-Ligandenkomplex aus der Konzentration an freien Rezeptormolekülen:

$$[Rt] = [RL] + [R] \quad [B.3]$$

daraus folgt:

$$[R] = [Rt] - [RL] \quad [B.4]$$

Durch Einsetzen von [B.4] in [B.2] erhält man:

$$K_d = \frac{([Rt] - [RL]) * [L]}{[RL]} \quad | \quad * [RL] \quad [B.5]$$

$$K_d * [RL] = ([Rt] - [RL]) * [L] \quad | \quad * \frac{1}{K_d} \quad [B.6]$$

$$[\text{RL}] = \frac{([\text{Rt}] - [\text{RL}]) * [\text{L}]}{K_d} \quad | \quad \text{ausflösen der Klammer im Zähler} \quad [\text{B.7}]$$

$$[\text{RL}] = \frac{[\text{Rt}] * [\text{L}] - [\text{RL}] * [\text{L}]}{K_d} \quad [\text{B.8}]$$

$$[\text{RL}] = \frac{[\text{Rt}] * [\text{L}]}{K_d} - \frac{[\text{RL}] * [\text{L}]}{K_d} \quad | \quad + \frac{[\text{RL}] * [\text{L}]}{K_d} \quad [\text{B.9}]$$

$$[\text{RL}] + \frac{[\text{RL}] * [\text{L}]}{K_d} = \frac{[\text{Rt}] * [\text{L}]}{K_d} \quad | \quad \text{links erweitern um } \frac{K_d}{K_d} \quad [\text{B.10}]$$

$$\frac{K_d * [\text{RL}] + [\text{RL}] * [\text{L}]}{K_d} = \frac{[\text{Rt}] * [\text{L}]}{K_d} \quad | \quad K_d \text{ im Nenner streichen} \quad [\text{B.11}]$$

$$K_d * [\text{RL}] + [\text{RL}] * [\text{L}] = [\text{Rt}] * [\text{L}] \quad | \quad \text{links } [\text{RL}] \text{ einklammern} \quad [\text{B.12}]$$

$$[\text{RL}] * (K_d + [\text{L}]) = [\text{Rt}] * [\text{L}] \quad | \quad * \frac{1}{(K_d + [\text{L}])} \quad [\text{B.13}]$$

$$[\text{RL}] = \frac{[\text{Rt}] * [\text{L}]}{(K_d + [\text{L}])} \quad [\text{B.14}]$$

Dies entspricht einer nichtlinearen Funktion nach:

$$y = \frac{a * x}{(b + x)}$$

C. Für den Test auf ligandenvermittelte Dimerstabilisierung eingesetzte niedermolekulare Substanzen

- | | |
|---|--|
| 1: Sarcosin (Fluka) | 23: Bernsteinsäure (Merck) |
| 2: Taurin (Fluka) | 24: Bromcyclobutan (Fluka) |
| 3: D-/L-Ethionin (Fluka) | 25: n-Eikosan (Sigma) |
| 4: D-/L-Norvalin (Fluka) | 26: Oxalsäure (Fluka) |
| 5: Glycocoll (Sigma) | 27: 1-Hydroxy-2-Pyridin-thion (Sigma) |
| 6: Glycidol (Sigma) | 28: Cumarin (Fluka) |
| 7: D-Valin (Fluka) | 29: α -Norborneol (Fluka) |
| 8: Glycocoethylester (Sigma) | 30: Fumarsäure (Merck) |
| 9: N-Acetylglycin (Fluka) | 31: L-Sorbose (Fluka) |
| 10: C-N-Methylalanin (Fluka) | 32: Isatin (Fluka) |
| 11: β -(3,4-Dihydroxyphenyl)-D-/L-Alanin (Fluka) | 33: Harnsäure (Merck) |
| 12: D-/L-2-Aminobuttersäure (Merck) | 34: D-Glycerinsäure (Fluka) |
| 13: L-Alaninol (Fluka) | 35: N-Cyclohexylanilin (Fluka) |
| 14: β -Aminoisobutyric acid (Fluka) | 36: Ethylmalonsäure (Fluka) |
| 15: β -Alanin (Sigma) | 37: p-Hydroxybenzoesäure (Merck) |
| 16: L-Alanin-tert-Butylester (Sigma) | 38: N-Benzylharnstoff (Merck) |
| 17: β -Aminoisobuttersäure (Fluka) | 39: Resocyclic acid (Merck) |
| 18: α - Aminoisobuttersäure (Fluka) | 40: Benzoesäure (Merck) |
| 19: 5-Aminovaleriansäure (Fluka) | 41: 1-Indanon (Fluka) |
| 20: S-Methylcystein (Sigma) | 42: Imidazol (Fluka) |
| 21: L-Hydroxyprolin (Fluka) | 43: D-/L-Noradrenalin (Sigma) |
| 22: D-/L-Octopamin (Fluka) | 44: 4-Hydroxyphenylelessigsäure (Fluka) |
| | 45: Betain (Fluka) |

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.-J. Fritz danke ich für die interessante Aufgabenstellung, die Hilfe bei allen auftretenden Problemen und besonders für die Begeisterung und den Optimismus, die er diesem Projekt entgegenbrachte.

Herrn PD Dr. Harald Kolmar danke ich für die Übernahme des Korreferates und die vielen nützlichen Tipps und Ratschläge, die er zu jedem Problem anzubieten hatte.

Marita Kalck danke ich nicht nur für die jederzeit grosszügig ausgeteilten Büromaterialien, sondern auch für Trost und Zuspruch, die oft von ihrer Seite erhielt.

Olaf Waase danke ich für die Lösung aller technischen Probleme und Rainer Merkl für die Hilfe beim Umgang mit der EDV.

Allen Mitarbeitern der Abt. Molekulare Genetik danke ich für die vielen schönen gemeinsamen Stunden, ihre Diskussionsbereitschaft, ihre Kameradschaftlichkeit und dafür, dass sie nach dem Essen immer erst dann aufgestanden sind, wenn ich die Tafel aufgehoben habe, insbesondere danke ich:

Wilfried Kramer, Anke Schürer, Christian Rudolph, Reinhard Sterner samt Arbeitsgruppe, Alexander Wentzel, Andreas Christmann, Thorsten Adams (fürs Wahrheitssagen), Hansi Schmoldt, Gerrit Henneke und Eric Lindner (für Wetter und Heiratsversprechen), Susanne Behrends, Stina Schiller (die mir all den Jahren die denkbar angenehmste Laborgenossin war), Eva Kansy (für wilde Parties), Martina Henn-Sax samt Familie, Andreas Schwienhorst, René Hempel, Milena Nincović, Gülden Aral, Dennis Wegener, Christian Hildmann und Jackson, Silke Schlenzik und Pia Meyer (für die Hilfe), Thomas Hartsch, dem ich viel von dem, was ich gelernt habe, verdanke, allen Mitgliedern der Laboratorien für Genomanalyse für die Sequenzierungen.

Weiterhin danke ich allen, die mir das Leben ausserhalb des Labor versüssten: Maike Claußen, Susanne Brandler und Ulrich Seidler-Brandler, Helge Niessen, Harald Müller, VoFra, Holger Brettschneider & den Oldenburgern, sowie meinen Mitbewohnern Dirk Overbeck, Julia II. Nolting, Anna Ritter und Angelo Gunkel für die stets fröhliche und familiäre Atmosphäre daheim.

Dem MBM des Klinikums Göttingen danke ich für die HiWi-Stelle, über die ich mich das letzte Jahr meiner Promotion finanzierte.

Mein allerherzlichster Dank gilt meiner Familie, die mir immer Trost spendete und bei der ich stets Unterstützung jedweder Form fand. Besonders gilt dieser Dank meiner Mutter, meinem Vater, meiner einzigartigen Schwester Eva, und natürlich Gisela, Diogo, Philippe und Fabiano Türk-Pereira.

Lebenslauf

von Julia Wittmann, geboren am 26. Mai 1972 in Kulmbach

Schulbildung:	1978-1982	Grundschule Voslapp, Wilhelmshaven
	1982-1984	Nogatschule, Wilhelmshaven
	1984-1991	Humboldt-Gymnasium, Wilhelmshaven
		Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Freiwilliges Jahr:	Ökologisches 1991-1992	Vogelwarte Helgoland, Wilhelmshaven
Studium:	1992-1998	Studiengang Biologie (Diplom) an der Georg-August-Universität, Göttingen
Prüfungen:	1994	Diplomvorprüfung
	1997	Diplomhauptprüfung

Diplomarbeit: in der Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik unter Leitung von Prof. Dr. H.-J. Fritz, Titel: „Molekularbiologische Konstruktion eines chimären ToxR’HisJ-Proteins und Untersuchungen zu dessen Tauglichkeit als Zelloberflächenrezeptor/Transkriptionsaktivator in *E. coli*“

Seit 1998 Promotion in der Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen unter Leitung von Prof. Dr. H.-J. Fritz.