

Die Adenylatcyclase CyaB1 aus *Anabaena* *sp. PCC 7120* ist ein cAMP-sensitives Protein

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

Tobias Kanacher

Tag der mündlichen Prüfung: 11. April 2003

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. J. E. Schultz

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. L. Heide

Dritter Berichterstatter: Prof. Dr. M. Biel

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde zwischen Mai 2000 und Juli 2002 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. E. Schultz angefertigt.

Weite Teile der vorliegenden Arbeit wurden im EMBO Journal unter dem Titel: „A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from Anabaena is a self-activated cAMP switch“ von Tobias Kanacher, Anita Schultz, PD Dr. J. U. Linder und Prof. Dr. J. E. Schultz veröffentlicht (*Embo J*, **21**, 3672-3680, 2002).

Herrn Prof. Dr. J. E. Schultz danke ich für das spannende Thema, das stete Interesse, die guten Ideen, die allzeit offene Tür und dafür, dass er ein wirklich guter Doktorvater war.

Dank an Herrn Prof. Dr. L. Heide für die Übernahme des Zweitgutachten

Herrn PD Dr. J. Linder verdanke ich viele kompetente Diskussionen, Hilfen, Anregungen und Klone.

Ein besonderes Dankeschön geht an Frau Anita Schultz für die rasche und gewissenhafte Durchführung zahlreicher Klonierungsarbeiten. Ebenso danke ich Herrn Miguel A. Pineda, der als Erasmusstudent hervorragende Arbeit bei der Klonierung, Expression, Reinigung und Charakterisierung von CyaB1_{myocat}, CyaB1Δ-GAF-A/-Δ-GAF-B und CyaB1A275D/Q105D geleistet hat. Bei Franziska Berndt und Maurizio Di Stasio, die im Rahmen eines freiwilligen Laborpraktikums, bei der Expression des Holoenzym bzw. der Klonierung der CyaB1D190A/-D360A Mutanten geholfen haben, bedanke ich mich gleichfalls recht herzlich.

Allen Mitgliedern des Institutes und des Arbeitskreises möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre, die stets entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und Unterstützung Dank sagen. Besonders genannt sei hier Frau U. Kurz für die Hinweise auf ein Leben außerhalb des Labors. In diesem Sinne möchte ich auch allen Freunden und meinen Schwestern Gudrun und Brigitte danken, die diese Hinweise aufs glücklichste bestätigten, mir emotionalen Rückhalt in schwierigen Schreib- und Lebensphasen boten und viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Einen besonderen Dank hierzu möchte ich auch Judith Mangelmann sagen, ohne die alles weniger wäre.

Widmen möchte ich die Arbeit meinen Eltern, die letztendlich alles ermöglichten.

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, daß die Dinge sind, wie sie sind.

(Aristoteles [384 - 322 v. Chr.]

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
2	MATERIAL	17
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
2.2	Geräte.....	18
2.3	Oligonukleotide	20
2.3.1	IRD 800-markierte <i>Primer</i>	20
2.3.2	Mutagenese- <i>Primer</i>	21
2.4	Vektoren	23
2.5	Puffer und Lösungen	24
2.5.1	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden.....	24
2.5.2	Puffer für die Isolierung, Reinigung, Elektrophorese, Sequenzierung und Prozessierung von DNA.....	24
2.5.3	Nährmedien für <i>E. coli</i> -Bakterien	24
2.5.4	Puffer und Lösungen für Proteinchemie.....	25
2.5.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	25
2.5.4.2	Puffer für Western Blots und verwendete Antikörper.....	25
2.5.4.3	Puffer für native Proteinreinigung an <i>NiNTA</i> -Agarose	26
2.5.4.4	Puffer und Lösungen für Adenylatcyclase-Enzymtests.....	26
2.5.4.5	Sonstige Puffer	27
3	METHODEN	28
3.1	Gentechnologische Methoden	28
3.1.1	Grundlegende Methoden der Analyse, Prozessierung und Rekombination von DNA.....	28
3.1.1.1	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und Umpufferung von DNA-Proben	28
3.1.1.2	Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	28
3.1.1.3	Restriktionsverdau von DNA-Molekülen.....	28
3.1.1.4	Glätten überhängender DNA-Enden (Klenow Verdau)	28
3.1.1.5	5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten	29
3.1.1.6	5'-Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden.....	29
3.1.1.7	Ligation von DNA-Molekülen	29
3.1.1.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
3.1.2	Arbeiten mit <i>E. coli</i> -Bakterien.....	30
3.1.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterienzellen für die Transformation ...	30
3.1.2.2	Standardtransformation von <i>E. coli</i> -Zellen	31
3.1.2.3	Schnelltransformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
3.1.2.4	Herstellung von Bakteriendauerkulturen.....	31
3.2	Allgemeine Proteinchemische Methoden.....	31
3.2.1	<i>BioRad</i> Proteinbestimmung.....	31
3.2.2	OD ₂₈₀ -Messung zur Proteinbestimmung	31
3.2.3	Proteinkonzentrierung durch Dialyse	32
3.2.4	Proteinkonzentrierung über Ultrafiltration	32

3.2.5	Detektion von Proteinen	32
3.2.5.1	SDS-PAGE	32
3.2.5.2	Western Blot	33
3.3	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	34
3.3.1	Vorkultur	34
3.3.2	Expression von CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ und Mutanten	34
3.3.3	Expression des Holoenzym, Mutanten und Chimären	35
3.3.4	Expression mit dem <i>RTS 500</i>	35
3.4	Proteinreinigung	35
3.4.1	Proteinreinigung aus <i>E. coli BL21(D3)[pREP4]</i>	35
3.4.1.1	CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ und Mutanten	35
3.4.1.2	Holoenzym und Mutanten	36
3.4.2	Proteinreinigung aus dem <i>RTS 500</i>	36
3.5	Adenylatcyclase-Test	36
3.6	Test auf störende Phosphodiesterase-Aktivität	37
3.7	cAMP-Bindungsstudien	37
3.8	Säulenchromatographie	38
3.9	Klonierungen	39
3.9.1	CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ und Mutanten	41
3.9.1.1	CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉	41
3.9.1.2	CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ K646A/-K646E/-K646Q/-D650A und -D650S	42
3.9.1.3	CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ N728A/-N728T und -R732A	43
3.9.1.4	CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ T721A/-D719A	44
3.9.2	C-terminale Holoenzymverkürzungen	45
3.9.2.1	CyaB1 ₅₉₅₋₇₈₆ und CyaB1 ₇₈₆₋₈₅₉ in pIVEX2.4c	45
3.9.2.2	CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ Xa1 und CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ Xa2	46
3.9.2.3	CyaB1 ₁₋₅₈₉	47
3.9.3	Mutationen des Holoenzym	48
3.9.3.1	CyaB1D650A/-N728A und -R732A	48
3.9.3.2	CyaB1D190A/-D360A	49
3.9.3.3	CyaB1A275D/-Q175D	51
3.9.3.4	CyaB1Δ-GAF-A/-Δ-GAF-B	53
3.9.3.5	CyaB1 _{RattenGAF}	55
3.9.3.6	CyaB1 _{mycocat}	57
4	ERGEBNISSE	59
4.1	Biochemische Charakterisierung von CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉	61
4.1.1	Expression und Reinigung von CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉	61
4.1.2	Lagerung und Stabilität	62
4.1.3	Cofaktor	62
4.1.4	Temperaturabhängigkeit	63
4.1.5	pH-Optimum	65
4.1.6	Zeitabhängigkeit	65
4.1.7	Proteinabhängigkeit	66
4.1.8	Substratspezifität	67
4.1.9	Kinetische Messungen	67
4.1.10	Größenbestimmung mit Gelfiltration	70

4.1.11	Einfluss von Chemikalien auf CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉	71
4.1.11.1	NaCl.....	71
4.1.11.2	Tenside.....	71
4.1.11.3	Harnstoff.....	72
4.1.11.4	Nukleosidtriphosphate und Pyrophosphat.....	72
4.1.11.5	2'd,3'AMP.....	73
4.1.11.6	Bikarbonat.....	74
4.2	Charakterisierung der Mutanten von CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉	76
4.2.1	Expression und Reinigung.....	76
4.2.2	Mutanten zur Charakterisierung des katalytischen Zentrums.....	76
4.2.2.1	CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ D650A/-N728A.....	76
4.2.2.2	CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ T721A/-D719A.....	78
4.2.2.3	CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ K646A.....	79
4.2.2.4	CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ R732A.....	79
4.2.3	Versuche zur Änderung der Substratspezifität mit CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ K646E.....	81
4.2.4	Versuche zur Forskolinstimulierbarkeit von CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ D650S im Verbund mit CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ N728T.....	81
4.2.5	Zusammenfassung.....	82
4.3	C-terminale CyaB1 Verkürzungen.....	83
4.3.1	C-terminale Holoenzymverkürzungen.....	83
4.3.2	Coexpression von CyaB1 ₅₉₅₋₇₈₆ /CyaB1 ₇₈₆₋₈₅₉ im RTS500.....	84
4.3.3	Versuche zur Abtrennung des C-Terminus auf Proteinebene mit Faktor-Xa Verdau.....	85
4.3.3.1	Einführung einer Faktor-Xa-Proteaseschnittstelle in CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉	86
4.3.3.2	Faktor-Xa Verdau von CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ Xa1 und CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ Xa2.....	87
4.4	Charakterisierung des Holoenzym.....	89
4.4.1	Expression und Reinigung.....	90
4.4.2	Proteinabhängigkeit.....	90
4.4.3	Temperaturoptimum.....	92
4.4.4	pH-Optimum.....	92
4.4.5	Zeitabhängigkeit.....	93
4.4.6	Kinetik.....	94
4.4.7	Aktivierung durch cAMP und cGMP.....	95
4.4.8	Lagerung und Stabilität.....	96
4.4.9	Einfluss anderer Nukleoside und Nukleotidanaloga.....	97
4.4.10	Einfluss von 2'd,3'AMP.....	98
4.4.11	Gelfiltration des Holoenzym.....	99
4.4.11.1	Spektralphotometrische Untersuchung der Fraktionen.....	100
4.4.11.2	Untersuchung der Enzymaktivität der Fraktionen.....	102
4.4.12	Versuche zur Dimerisierung.....	102
4.4.12.1	Rekonstitutionsversuche mit CyaB1 ₁₋₅₈₉ und CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉	102
4.4.12.2	Holoenzym und CyaB1 ₁₋₅₈₉	104
4.4.12.3	Dimerisierung mit Glutaraldehyd.....	104
4.5	Mutanten des Holoenzym.....	106
4.5.1	CyaB1D190A/-D360A.....	106
4.5.2	CyaB1A275D.....	107
4.5.3	CyaB1D650A/-N728A.....	108

4.5.4	CyaB1 Δ -GAF-A/ Δ -GAF-B.....	109
4.6	Chimären	111
4.6.1	Chimäre mit Ratten-PDE-2-GAF-Domänen	111
4.6.2	Chimäre mit dem katalytischen Zentrum einer AC aus <i>M. tuberculosis</i>	112
5	DISKUSSION	114
5.1	Charakterisierung von CyaB1	114
5.2	CyaB1 hat eine neuartige Faltung des katalytischen Zentrums.....	119
5.3	Das Holoenzym wird über seine GAF-Domänen durch cAMP aktiviert.....	122
5.4	Herstellung einer cGMP aktivierten CyaB1-AC	126
5.5	Herstellung einer Anabaena-Mykobakterium-AC-Chimäre.....	126
5.6	Offene Fragen und Ausblick.....	127
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	130
7	ANHANG	131
7.1	Ergebnisse der BLASTP Datenbanksuche	131
7.1.1	GAF A	131
7.1.1.1	Hits 1-10	131
7.1.1.2	Einzelalignments der Hits 1-3	131
7.1.2	GAF B.....	133
7.1.2.1	Hits 1-10	133
7.1.2.2	Einzelalignments der Hits 1-3	133
7.1.2.3	Weitere ausgewählte Einzelalignments	134
7.1.3	PAS.....	135
7.1.3.1	Hits 1-10	135
7.1.3.2	Einzelalignments der Hits 1-3	136
7.1.4	AC-katalytisches Zentrum.....	137
7.1.4.1	Hits 1-10	137
7.1.4.2	Einzelalignments der Hits 1-3	137
7.1.5	TPRL	138
7.1.5.1	Hits 1-2	138
7.1.5.2	Einzelalignments der Hits 1-2	138
8	LITERATUR	140
	LEBENS LAUF.....	148

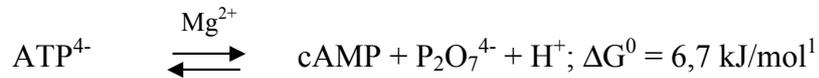
Abkürzungen

AB	Antibiotikum
AC/-n	Adenylatcyclase/n
ACII	Typ II AC aus der Ratte
ACV	Typ V AC aus dem Hund
2'd,3'AMP	2'-Deoxy-adenosin-3'-monophosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS/-n	Aminosäure/-n
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin 3',5'-monophosphat
cDNA	Copy-DNA
cGMP	cyclisches Guanosin 3',5'-monophosphat
cpm	<i>counts per minute</i> (gezählte Zerfälle pro Minute)
CyaB1	Adenylatcyclase aus <i>Anabaena sp. PCC 7120</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
GC/-n	Guanylatcyclase/-n
2'3'GMP	Guanosin-2'-monophosphat und Guanosin-3'-monophosphat (gemischte Isomere)
GMP-PNP	Guanylyl-imidodiphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
ITP	Inosin-5'-triphosphat
LB-Medium	Medium zur Kultivierung von <i>E. Coli</i> nach Luria, S. E. und Burrous J. W.
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
mycoAC ₂₀₄₋₄₄₃	kürzeste katalytische Einheit der mycobakteriellen AC Rv1625c
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
ORF	<i>open reading frame</i>
pAC	Paramecium-AC
ParaGC	(bekannte) Paramecium-GC
PCR/-n	Polymerasekettenreaktion/-en
PDE/-n	Phosphodiesterase/-n
pIAC	AC aus <i>Plasmodium falciparum</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminomethansulfonsäure
TM	Transmembranbereich
TPR	<i>Tetratrico peptid repeat</i>
TPRL	<i>Tetratrico peptid repeat like</i>
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Xgal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranosid
Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Der Ausdruck Paramecium-AC und Plasmodium-AC bezeichnen die im Rahmen der Dissertationen von Kristina Hambach und Jost Weber klonierten Adenylatcyclasen aus *Paramecium tetraueia* und *Plasmodium falciparum*. Der Ausdruck Paramecium-GC bezeichnet eine Guanylatcyclase aus *Paramecium tetraueia*. (Linder et al., 1999). Nukleotide und Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabencode gemäß IUPAC abgekürzt. Weitere Abkürzungen sind in "Information for authors" PNAS (2002) definiert. In der Systematik wird *Anabaena* sp. *PCC 7120* neuerdings als *Nostoc* bezeichnet. In 3.9 Klonierungen beziehen sich die Bezeichnungen der Klone auf Vektor und Insert. Bei *pBluescriptII SK (-)*-Klonen sind nur die für die folgenden Klonierungsschritte relevanten Schnittstellen (grau hinterlegt und nicht nummeriert) der MCS (schwarzer Balken) von *pBluescriptII SK (-)* dargestellt. Ihre Orientierung ist immer so dargestellt, dass die Schnittstellen der MCS zwischen T3 und T7-Promotor von links nach rechts zu lesen sind. Durchgestrichen gezeichnete Schnittstellen wurden während der Klonierungen zerstört. Die Nummerierung der Schnittstellen bezieht sich auf CyaB1. Bei Chimären Fragmenten ist die Position relativ zu CyaB1 und des Ursprungsproteins angegeben.

1 Einleitung

In nahezu allen Zellen wird durch Adenylatcyclasen (E.C. 4.6.1.1) der universelle Energieträger ATP in den *second messenger* cAMP umgewandelt.



Damit reagieren lebende Zellen aus allen Phyla auf extrazelluläre Stimuli (*first messenger*) wie Hormone, Neurotransmitter, Metaboliten oder Ionen und setzen eine intrazelluläre Antwortkaskade in Gang. Diese regelt z. B. den Stoffwechsel, die Gentranskription, das Verhalten, Lernprozesse und die interzelluläre Kommunikation.

So wird z. B. beim Absinken des Glukosespiegels in *E. coli* als Hungersignal der cAMP-Spiegel erhöht und dadurch die Transkription anderer Zucker metabolisierender Systeme induziert (Peterkofsky et al., 1993). Das cAMP wurde 1957 von Earl Sutherland bei der Untersuchung des Glykogenabbaus entdeckt (Rall, 1957). Es hat auch in Eukaryonten eine zentrale Rolle inne: z.B. bei der Homöostase des Blutglucosespiegels, Gentranskription, Wachstum, Zelldifferenzierung (Dugan et al., 1999) und beim Lernen (Levin et al., 1992). Dabei wird cAMP von Zielmolekülen wie cAMP-abhängige Proteinkinasen (Lalley et al., 1997; Schulkes and Schaap, 1995), cAMP-abhängige Ionenkanäle (Ludwig et al., 1990), und CNrasGEF-Proteinen (de Rooij et al., 1998) gebunden und beeinflusst deren Konformation bzw. Reaktivität.

Etwa 60 % aller bekannten Arzneimittelwirkungen beruhen auf einer Interaktion mit *G-protein-coupled receptors* (GPCR), die ihrerseits häufig membranständige ACn regulieren. Weitere 20 % wirken über andere *drug targets*, die den cyclischen Nukleotidspiegel der Zellen beeinflussen. Diese Arzneimittel greifen meist an der Peripherie der Zelle über Membran-ständige Proteine und über PDEn an. Hier wird die cytosolische AC CyaB1 untersucht, die wegen ihrer Selbstaktivierbarkeit auch als „cAMP-Schalter“ bezeichnet werden kann.

¹ Obwohl die Reaktion endergonisch ist, verschiebt die hohe Aktivität der Pyrophosphatase in der Zelle das Gleichgewicht ganz auf die rechte Seite.

Einteilung der ACn

AS-Sequenzvergleiche und strukturelle Überlegungen führten zur Einteilung der ACn in 5 Klassen:

- Zur **Klasse-I** zählt man die ACn der Enterobacteriaceae wie die CyaA aus *E. coli*, die den Primärmetabolismus regulieren. Sie wurden intensiv erforscht (Peterkofsky et al., 1993; Peterkofsky et al., 1995) und tragen neben einer N-terminalen katalytischen Domäne auch eine glucosesensitive regulatorische Domäne am C-Terminus (Roy et al., 1983).
- Zur **Klasse-II** gehören die Calmodulin-stimulierten Adenylatcyclasetoxine aus *Bordetella pertussis* (Glaser et al., 1988) und *Bacillus anthracis* (Escuyer et al., 1988). Von letzterer wurde eine Kristallstruktur ohne und mit gebundenem Calmodulin erhalten (Drum et al., 2002).
- Die **Klasse-III-ACn** stellen die größte und heterogenste Gruppe dar (Fig. 1-1). Sie wurden sowohl in Prokaryonten [z. B. *Rhizobium meliloti* (Kiely et al., 1995), *Stigmatella aurantiaca* (Coudart-Cavalli et al., 1997) und *Anabaena sp. PCC 7120* (Katayama and Ohmori, 1997)], einzelligen Eukaryonten [z. B. *Saccharomyces cerevisiae* (Casperson et al., 1985) oder *Trypanosoma brucei* (Alexandre et al., 1990)] und in allen Metazoen gefunden (Hanoune et al., 1997; Smit and Iyengar, 1998; Sunahara et al., 1996).
- In der **Klasse-IV** findet man bis jetzt nur eine AC aus *Aeromonas hydrophilia*, ohne Sequenzähnlichkeit zu anderen ACn und mit ungewöhnlichen Temperatur- und pH-Optima von 65 °C und pH 9,5 (Sismeiro et al., 1998).
- In der **Klasse-V** ist bis jetzt nur eine AC aus dem anaeroben Bakterium *Prevotella ruminicola* bekannt (Cotta et al., 1998).

Erst kürzlich wurde mit CyaC aus *Rhizobium etli* eine neuartige AC, die als Vertreter einer neuen Klasse-VI bezeichnet wurde, entdeckt (Tellez-Sosa et al., 2002). Allerdings zeigt sie auch gewisse Ähnlichkeiten zur stark divergenten Gruppe der bakteriellen Klasse-III-ACn (PD Dr. J. Linder, persönliche Kommunikation).

Weitere Unterteilung der Klasse-III-ACn

Unterschiede in konservierten Motiven der katalytischen Domänen der Klasse-III-ACn legen eine Unterteilung in die vier Untergruppen Klasse-IIIa, -b, -c und -d nahe (PD Dr. J. Linder und Prof. Dr. J. E. Schultz, persönliche Kommunikation):

- Zur **Klasse-IIIa** gehören z. B. die Mammalia-ACn und Rv1625c aus *M. tuberculosis*, die integrale Membranproteine sind, oder CyaE aus *Anabaena*. Bei den Mammalia-ACn folgt dem variablen N-Terminus die erste Membrandomäne (M1) aus 6 transmembranspannenden Helices (6TM), dann eine zentrale cytosolische Domäne (C1), die zweite Membrandomäne (M2) aus 6 TM und schließlich die zweite cytosolische Domäne (C2).

Über Sequenzähnlichkeiten lassen sich die cytosolischen Domänen noch mal in C1a, C1b sowie in C2a und C2b aufteilen. Versuche mit entsprechend verkürzten Proteinen zeigten, dass C1a und C2a im Zusammenspiel für die katalytische Reaktion verantwortlich sind (Dessauer and Gilman, 1996; Tang et al., 1995; Whisnant et al., 1996; Yan et al., 1996). Eine Kristallstruktur der ACV-C1a Domäne im Komplex mit der ACII-C2 Domäne und Gs α (einem Aktivator von Mammalia-ACn) zeigt das katalytische Zentrum als Heterodimer mit zwei Taschen, von denen eine ATP und die andere das Pflanzenditerpen Forskolin bindet. Nach den Kristallstrukturen und Mutationsstudien wurde eine Modellvorstellung vom Mechanismus der Cyclisierungsreaktion entwickelt, bei dem die in Tab. 1-1 genannten ASn beteiligt sind.

Als bakterielle AC trägt Rv1625c diese kanonischen katalytischen ASn in einer Proteinkette und bildet ein Homodimer mit zwei katalytischen Zentren. Rv1625c ist weder durch Gs α noch durch Forskolin stimulierbar (Guo et al., 2001).

- Zur **Klasse-IIIb** gehören u. a. die lösliche Ratten AC, eine Adenylatcyclase aus *Plasmodium* (die zeitgleich mit dieser Arbeit von Jost Weber bearbeitet wurde), eine AC aus *Paramecium* (Hambach, 2002), die vier mycobacteriellen ACn Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c und Rv3645 (zeitgleich mit dieser Arbeit von Arne Hammer bearbeitet) und CyaB1 aus *Anabaena*. Alle ACn der Gruppe IIIb besitzen ein Threonin oder Serin anstelle eines bei den anderen Gruppen kanonischen Aspartats (D1018 bei Ratten ACII), das für die Substratbindung verantwortlich ist (unterstrichen in Tab. 1-1). Während die ACn aus *Plasmodium* und *Paramecium* integrale Membranproteine darstellen, finden sich viele lösliche ACn wie CyaB1 mit unterschiedlichen Regulator-domänen in dieser Gruppe.
- In der **Klasse-IIIc** sind neben löslichen ACn, z. B. eine AC aus *Brevibacterium liquefaciens*, auch ACn mit lipophilen Domänen wie LipJ aus *M. tuberculosis*. Den ACn dieser Gruppe fehlt ein in anderen Klasse-III-ACn konserviertes V/LX₂LN- und GX₄R/KX₂Y/F-Motiv im katalytischen Zentrum. In LipJ befindet sich anstelle des in Mammalia-ACn kanonischen Arginins ein Histidin.
- Zur **Klasse-IIId** zählen ACn wie CyaA aus *Leishmania donovani*, eine AC aus *Trypanosoma brucei* und weitere ACn aus Hefen und Pilzen. Diesen ACn fehlen ebenfalls die bei Klasse-IIIc genannten Motive und außerdem haben sie ein konserviertes GGQV/I-Motiv in einer bei den anderen Klasse-III-ACn unkonservierten Region.

Während die Mammalia-ACn in Bezug auf Funktion und Regulation, die letztlich über Hormone unter Vermittlung von G-Proteinen erfolgt (Pfeuffer and Thomas, 1974), recht intensiv untersucht wurden, ist über die große Gruppe der bakteriellen Klasse-III-ACn wenig bekannt.

Genomprojekte zeigen eine Vielfalt von bakteriellen ACn-Domänen mit variablen regulatorischen Domänen (Coudart-Cavalli et al., 1997; Kasahara and Ohmori, 1999; Katayama and Ohmori, 1997; McCue et al., 2000). Eine experimentelle Bestätigung der aufgrund von Sequenzvergleichen und Modellierungstudien vermuteten Funktion dieser regulatorischen Domänen steht aber meist noch aus.

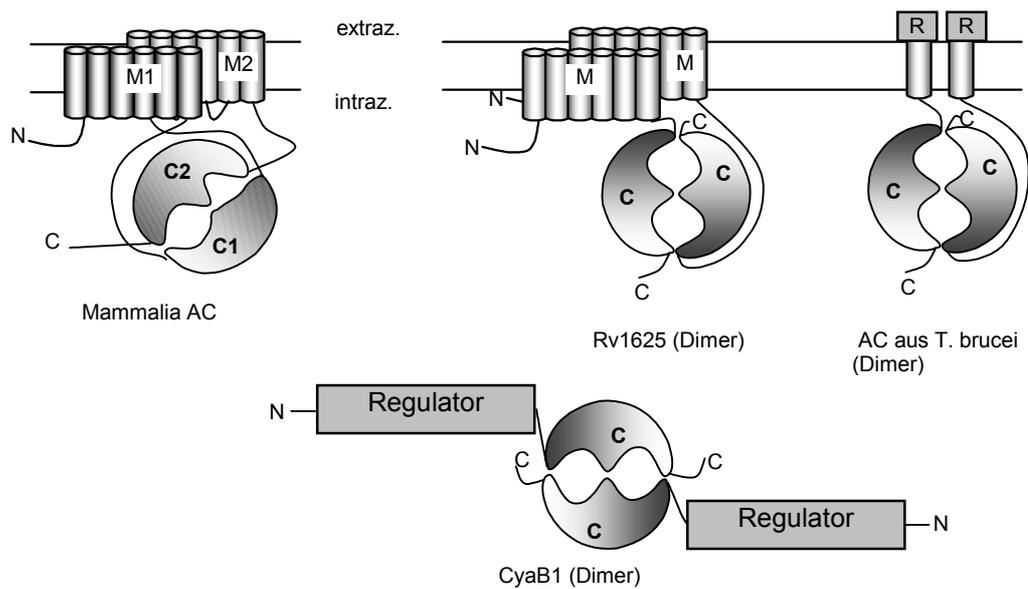


Fig. 1-1: Schematische Übersicht über verschiedene Klasse-III-ACn, die als integrale Membranproteine oder cytosolisch vorkommen. Die Mammalia-AC hat 2 Membrandomänen (M1 und M2) mit jeweils 6 Transmembranspannen (TM) und bildet mit ihren cytosolischen Schleifen (C1 und C2) ein Pseudoheterodimer. Rv1625c hat eine Membranregion (M) aus 6 TM mit anschließender katalytischer Schleife (C) und bildet aus zwei Monomeren ein Homodimer. Die AC aus *Trypanosoma brucei* besitzt eine regulatorische Domäne (R) mit anschließender TM und katalytischer Domäne und bildet ebenfalls ein Homodimer (Naula et al., 2001). CyaB1 ist eine lösliche AC mit regulatorischen Domänen, deren katalytische Domänen als Dimer aktiv sind.

Tab. 1-1: Übersicht über die kanonischen katalytischen ASn in Klasse-III-ACn von Mammalia (Tesmer et al., 1997; Tesmer et al., 1999; Zhang et al., 1997) im Vergleich mit den durch Sequenzalignments und Mutationsstudien gefundenen AS aus Rv1625c (Klasse-IIIa) aus *M. tuberculosis* (Guo et al., 2001) und von CyaB1 aus *Anabaena* (Klasse-IIIb).

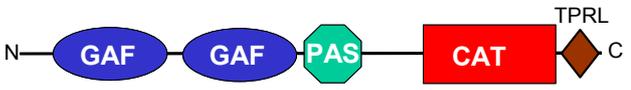
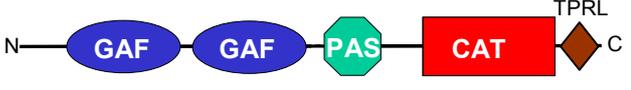
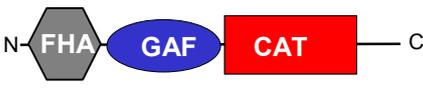
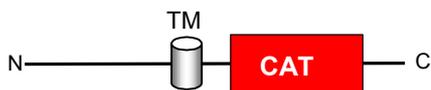
Katalytische Funktion	Purinbindung		Metallbindung		Stabilisierung des Übergangszustand	
	K938	D1018	D396	D440	N1025	R1029
Verantwortliche AS nach Kristallstruktur und Mutationsstudien in Mammalia-ACn	Ratten-ACII-C2	Ratten-ACII-C2	Hund-ACV-C1	Hund-ACV-C1	Ratten-ACII-C2	Ratten-ACII-C2
Entsprechende AS in Rv1625c (Klasse-IIIa)	K296	D365	D256	D300	N372	R376
Entsprechende Position in CyaB1 (Klasse-IIIa)	K646	I721	D606	D650	N728	R732

Adenylatcyclasen und cAMP in *Anabaena* sp. PCC 7120

Cyanobakterien haben seit ihrem Auftauchen in der Evolution vor ca. 3 Milliarden Jahren Strategien entwickelt, sich an die unterschiedlichsten Umweltbedingungen anzupassen. Als erste Organismen produzierten sie durch Photosynthese Sauerstoff und wandelten die anaerobe Erdatmosphäre in eine aerobe um. Abhängig vom Milieu liegen sie in der vegetativen Form als Heterocysten (können bei Gegenwart von Licht und Stickstoffmangel atmosphärischen Stickstoff fixieren), Proheterocysten (die sich im Unterschied zu Heterocysten wieder ins vegetative Stadium zurückdifferenzieren können) und sporenlähnlichen Akineten (die lange Trockenperioden überdauern können) vor. Der zelluläre cAMP-Spiegel von Cyanobakterien ändert sich abhängig von Wachstumsbedingungen (Hood et al., 1979), Lichteinstrahlung (Ohmori M., 1988) und pH-Wert (Ohmori, 1989). Zum Kulturmedium zugesetztes cAMP beeinflusst die Muster der Heterocystenbildung (Lambert and Smith, 1981). Trotzdem ist die Rolle von cAMP als intrazelluläres Signalmolekül im Vergleich zu *E. coli* oder eukaryotischen Zellen kaum erforscht. Der zelluläre cAMP Spiegel wird in *Anabaena* sp. PCC 7120 von 6 (bis jetzt bekannten) Klasse-III-ACn mit unterschiedlichem modularem Aufbau kontrolliert (Kasahara et al., 2001; Katayama and Ohmori, 1997; Tab. 1-2). Die beiden Isoenzyme CyaB1 und CyaB2 tragen an ihrem N-terminalen Ende zwei tandemartig verknüpfte GAF-Domänen, gefolgt von einer PAS-Domäne, einem *Linker*-Bereich ohne bekannte Domänenstruktur, dem das AC katalytische Zentrum und eine einzige C-terminale *Tetratricopeptide repeat*-ähnliche-Domäne (TPRL) folgt (Ho et al., 2000; Katayama and Ohmori, 1997). Im katalytischen Bereich (G595 bis K859) zeigen beide eine Ähnlichkeit von 70 % zueinander, während der N-Terminus mit den regulatorischen Domänen (M1 bis V594) zu 50 % ähnlich ist. Interessanterweise zeigen die GAF-Domänen von CyaB1 große Ähnlichkeit zu den cGMP-bindenden GAF-Domänen der tierischen PDEn: z. B. 40 % Identität zwischen den GAF-B-Domänen² von CyaB1 und Ratten-PDE-2.

² Die unmittelbar dem N-Terminus folgende GAF-Domäne wird als GAF-A bezeichnet und die danach folgende als GAF-B.

Tab. 1-2: Übersicht über die 6 bekannten ACn aus *Anabaena sp. PCC 7120*. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu. Die Klassifizierung der Domänen bezieht sich auf Literaturangaben (Ho et al., 2000; Katayama and Ohmori, 1997; Tada, 2001), NCBI-blastp-Vorschlägen und *Kyte Doolittle Hydrophility Plots*, die mit dem Protean[®] Programm von Lasergene[®] erstellt wurden. Die Abkürzungen bedeuten: CAT für katalytische AC-Domäne, TM für Transmembran-Domäne, GAF für GAF-Domäne, PAS für PAS-Domäne, TPRL für *Tetratrico peptid repeat*-ähnliche-Domäne, RRD für *Response Regulator*-Domäne, HK für Histidin-Kinase-Domäne und FHA für *Forkhead associated*-Domäne.

Name/ Genbank Accession Nr.	Domänenstruktur/ Anzahl AS	Lokalisation im Cyanobakterium
CyaA/ D89622	 <p>735 AS</p>	Membran
CyaB1/ D89623	 <p>859 AS</p>	Cytosol
CyaB2/ D89624	 <p>860 AS</p>	Cytosol
CyaC/ D89625	 <p>1155AS</p>	Cytosol
CyaD/ D89626	 <p>546 AS</p>	Cytosol
CyaE/ NP 484705	 <p>472 AS</p>	Membran

Cyclische Nukleotid-Phosphodiesterasen

In Eukaryonten können Phosphodiesterasen [E.C. 3.1.4.1] als Gegenspieler zu den ACn und GCn aufgefasst werden, da sie das cyclische Nukleotid zum Nucleosid-5'-Monophosphat hydrolysieren und so die *second messenger*-Konzentration der Zelle senken bzw. einen Anstieg verhindern (Boekhoff et al., 1994; Hempel et al., 1996). Nach Sequenzähnlichkeiten können sie in zwei Klassen (Francis et al., 2001) unterteilt werden:

- **Zu den Klasse-I-PDEn** gehören alle 11 PDE-Familien der Säuger und auch einige von niederen Eukaryonten, wie z. B. die PDE-2 von *Saccharomyces cerevisiae* oder des Erregers der Schlafkrankheit *Trypanosoma brucei* (Zoraghi and Seebeck, 2002).
- **Die Klasse-II-PDEn**, die in niederen Eukaryonten wie *S. cerevisiae*, *Candida albicans* und *D. discoideum* vertreten ist, zeigen wenig Sequenzähnlichkeit zur ersten Klasse und eine geringere Substrataffinität.

Von den 11 PDEn, die in Mammalia bekannt sind, enthalten 5 GAF-Domänen (PDE-2, -5, -6, -10 und -11; Ho et al., 2000). Bei PDE-2, -5, und -6 besitzt cGMP eine Doppelrolle, da es einerseits als Ligand der GAF-Domänen die enzymatische Aktivität steuert und gleichzeitig selbst als Substrat zu 5'-GMP am katalytischen Zentrum hydrolysiert wird (McAllister-Lucas et al., 1995; McAllister-Lucas et al., 1993; Soderling and Beavo, 2000). Bei der bifunktionellen PDE-2 wird neben cGMP auch cAMP hydrolysiert, während PDE-5 und die als Photorezeptor wirkende PDE-6 spezifisch für cGMP sind. Ein erblicher Gendefekt im Menschen, der auf der Mutation H258N in der cGMP-Bindungsdomäne der PDE-6b beruht, gilt als Auslöser der autosomaldominanten kongenitalen Nachtblindheit (Gal et al., 1994).

Die klinische Forschung hat PDEn als interessante *drug targets* entdeckt und eine Reihe spezifischer Inhibitoren entwickelt. Der bekannteste ist Sildenafil (Viagra®), der die PDE-5 hemmt und dadurch die Durchblutung des corpus cavernosum erhöht (Ballard et al., 1998; Langtry and Markham, 1999). Weitere PDE-Hemmer, u. a. Rolipram (spezifisch für PDE-4), Cilostamid (spezifisch für PDE-3), Oxpentifylline und Theophyllin (beide unspezifisch) werden als Wirkstoffe gegen Autoimmunkrankheiten wie Arthritis (Kiely et al., 1995), Asthma (Barnes, 1995; Barnette, 1999; Bielekova et al., 2000) und Krebs (Marko et al., 1998) untersucht oder schon angewendet. Sie alle haben gemeinsam, dass sie im katalytischen Zentrum der Phosphodiesterasen angreifen. Es gibt noch keine Arzneistoffe, die an den regulatorischen Domänen der PDEn und insbesondere den GAF-Domänen angreifen. Da letztere im Menschen ausschließlich in PDEn vorkommen, bieten sie sich als *drug targets* zur Beeinflussung der humanen PDEn an. Das tandemartige GAF-Ensemble von CyaB1 zeigt große Ähnlichkeit zu den GAF-Domänen der tierischen PDEn und bietet, da es gleichzeitig in einem völlig anderen enzymatischen Kontext und Organismus existiert, eine herausragende Möglichkeit zur Klärung grundlegender Signaltransduktionsprozesse durch cyclische Nucleotide.

GAF-Domänen

GAF-Domänen wurden über computergestützte Sequenzvergleiche in cGMP bindenden Phosphodiesterasen, Adenylatcyclasen in *Anabaena* und dem Transkriptionsfaktor FhlA (*formate hydrogen lyase transcriptional activator*) von *E. coli* gefunden und entsprechend benannt. Sie gehören als nicht-katalytische Proteindomänen zur Gruppe der sogenannten *small-molecule-binding domains* (SMBDs), die in Signaltransduktions-Proteinen aus allen drei Reichen der Evolution (*Archea*, *Prokaryonten* und *Eukaryonten*) vorhanden sind (Anantharaman et al., 2001; Aravind and Ponting, 1997; Ho et al., 2000). Bis jetzt konnten mehr als 1100 verschiedene Proteine mit GAF-Domänen identifiziert werden, von denen die der PDEn am besten studiert sind (McAllister-Lucas et al., 1995; McAllister-Lucas et al., 1993; Soderling and Beavo, 2000). PDE-2, -5, und -6 besitzen zwei tandemartig angeordnete N-terminale GAF-Domänen (GAF-A und GAF-B genannt), die spezifisch cGMP binden und dadurch reguliert werden. Die Funktionen und Liganden der GAF-Domänen in PDE-10 und PDE-11 (beide cAMP und cGMP hydrolysierend) sind bis jetzt unbekannt (Fawcett et al., 2000; Soderling et al., 1999). PDE-11 besitzt eine einzelne GAF-Domäne, während PDE-2, -5, -6 und 10 jeweils zwei tandemartig verknüpfte GAF-Domänen besitzen.

cGMP ist ähnlich wie cAMP ein in Eukaryonten (außer Hefen) weit verbreiteter *second messenger*, der z. B. beim Sehvorgang (Goldstein et al., 1996; Pugh et al., 1997) und der Blutdruckregulation (Foster et al., 1999) eine zentrale Rolle spielt. Es wird von Guanylatcyclasen aus GTP in einer den ACn ähnlichen Cyclisierungsreaktion gebildet. Zahlreiche Mutationsstudien sowie neuere Struktur- und Modelling-Studien versuchten, die für die cGMP-Bindung und -Spezifizierung verantwortlichen ASn der GAF-Domänen herauszufinden. Dabei wurde angenommen, dass ein in allen GAF-Domänen der cGMP-bindenden PDEn hochkonserviertes NKX_nFX₃DE-Motiv für die Nukleotidbindung verantwortlich ist (Granovsky et al., 1998; Ho et al., 2000; McAllister-Lucas et al., 1995; Turko et al., 1996). Eine kürzlich ermittelte Kristallstruktur der GAF-Domänen der Maus-PDE2a mit gebundenen cGMP zeigt aber, dass keine der ASn dieses Motivs tatsächlich an cGMP bindet, sondern bisher unbeachtete ASn beteiligt sind (Martinez et al., 2002). Außerdem zeigt die Struktur, dass nur eine GAF-Domäne das cyclische Nukleotid bindet, während die andere offensichtlich eine Dimerisierungsdomäne darstellt.

Die N-terminalen GAF-Domänen in FhlA, dem Transkriptionsaktivator für die Gene des Formiat-Hydrogenlyase-Komplexes von *E. coli*, sind laut Mutationsstudien für die Bindung von Formiat das FhlA aktiviert, verantwortlich sind (Hopper et al., 1994; Korsá and Böck, 1997).

Trotz Ähnlichkeiten zu den cGMP bindenden GAF-Domänen fehlt ihnen das NKX_nFX₃DE Motiv.

PAS-Domänen

PAS-Domänen wurden im *periodic clock protein*, *aryl hydrocarbon receptor* und *single minded protein* gefunden und gehören wie die GAF-Domänen zur Gruppe der SMBDs (Anantharaman et al., 2001; Aravind and Ponting, 1997; Ho et al., 2000). Auch sie sind in allen drei Reichen des Lebens vertreten und sind in einem breiten Spektrum von Proteinen wie z. B. Histidin-, Serin- oder Threoninkinasen, Chemo- oder Photorezeptoren, spannungsgesteuerten Ionenkanälen und PDEn zu finden (Taylor and Zhulin, 1999). Die unterschiedlichen Funktionen bewältigen die PAS-Domänen häufig mit Hilfe eines gebundenen Cofaktors bzw. Chromophors. Bei Prokaryonten kommen die PAS-Domänen meist als Sensormodul in regulatorischen Zwei-Komponenten-Systemen vor. Von diesen ist der FixL/FixJ-Signalweg in *Rhizobium*, der eine zentrale Rolle bei der Stickstofffixierung übernimmt, am besten untersucht (Gilles-Gonzalez et al., 1991). FixL ist eine Kinase, die als Sauerstoffsensor eine PAS-Domäne mit einem Häm-Molekül als Cofaktor enthält. Wenn kein Sauerstoff an das Häm gebunden ist, phosphoryliert sie FixJ, das dadurch aktiviert wird und als Transkriptionsaktivator für Enzyme der Stickstofffixierung, die sauerstofffreies Milieu benötigen, fungiert (Fischer, 1994; Fischer, 1996). Im *photoactive yellow protein* (PYP), dessen Kristallstruktur bekannt ist, dient die PAS-Domäne mit dem Chromophor p-Hydroxymethylsäure als Lichtsensor (Baca et al., 1994; Pellequer et al., 1998). FAD ist ein anderer bekannter Cofaktor für PAS-Domänen, die dann als Redox-Sensoren dienen (Hill et al., 1996). Außerdem wurde festgestellt, dass PAS-Domänen bei der Dimerisierung von Proteinen, als Homo- oder Heterodimerisierungsdomäne beteiligt sind (Huang et al., 1993; Pongratz et al., 1998). Die CyaB1-PAS-Domäne ist mit ca. 70 AS etwas kürzer als bisher gefundene (100-120 AS). Ihre Rolle ist ungeklärt.

Aufgabenstellung

Mit einer Expression und Charakterisierung des löslichen und gereinigten Proteins von CyaB1 als N-terminal verkürzte katalytische Domäne oder als Holoenzym sollte mehr Licht in die ungewöhnliche und heterogene Gruppe der bakteriellen Klasse-III-ACn gebracht werden. Mit Punktmutationen der nach dem Mammalia-AC-Modell kanonischen katalytischen AS wird untersucht, ob trotz der Sequenzunterschiede zwischen den ACn der Klasse-IIIa und -b ein vergleichbarer Reaktionsmechanismus und Aufbau des katalytischen Zentrums vorliegt. Dabei gewonnene Erkenntnisse sollten auch für Untersuchungen anderer Klasse-IIIb ACn aus *Paramecium* oder *Plasmodium*, die zeitgleich im Arbeitskreis durchgeführt wurden, hilfreich sein.

Ein weiteres Ziel war die Expression und Reinigung des CyaB1 Holoenzym zu optimieren, um die Bedeutung seiner Domänen und ihrer regulatorischen Funktion auf die enzymatische Aktivität zu untersuchen. Die GAF-Domänen von CyaB1 sind denen der PDEn sehr ähnlich und haben die zur cGMP-Bindung nötigen ASn. Da die Existenz von cGMP als *second messenger* in *Anabaena* und allen anderen Bakterien nicht zweifelsfrei erwiesen ist, sollte die Funktion der GAF-Domänen geklärt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

AGS, Heidelberg: Restriktionsendonukleasen mit 10x Reaktionspuffern

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: *ECL Plus Western Blot Detection System, Hyperfilm ECL, Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP, 2,8-³H-cAMP (1,29 TBq/mmol), 8-³H-cGMP (566 GBq/mmol), Thermo Sequenase primer cycle sequencing kit, OnePhorAll-Puffer für Restriktionsendonukleasen, 25 mM MgCl₂-Puffer for PCR (USB)*

AppliChem, Darmstadt: HEPES, Acrylamid 4K-Lösung 30%

Becton-Dickinson, Heidelberg: *Falcon Tubes*

BIO-RAD, München: *BIO-RAD Protein Assay-Reagenz, Coomassie Brilliant-Blue G-250*

Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf: *Sequagel XR, Sequagel Complete Buffer Reagent, Chill Out 14 Liquid Wax* von MJ Research

Canberra Packard, Taunusstein: *Ultima Gold XR* Szintillator

Dianova, Hamburg: Sekundärer Ziege-anti-Maus-Antikörper konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase

Fluka, Buchs (Schweiz): Natriumdodecylsulfat, Formamid

ICN, Eschwege: Radionukleotide [α -³²P]-ATP, [α -³²P]-GTP, Ehtidiumbromid Tabletten

Hartmann Analytik, Braunschweig: Radionukleotide [α -³²P]-ATP, [α -³²P]-GTP

Macherey-Nagel, Düren: *Nucleotrap Kit, Blotmembran porablot PVDF (2 μ m Porenweite)*

Merck, Darmstadt: Aluminiumoxid 90 aktiv, Ethanol, Methanol, 2-Mercaptoethanol, DMSO, Glycerol 87%, Essigsäure 100%, Dioxan, alle nicht aufgeführten Chemikalien in *p.a.* Qualität

Millipore, Eschborn: Proteinkonzentratoren *Centriplus YM-100*

MWG-Biotech, Ebersberg: Oligonukleotide [PCR-Primer und Fluoreszenz-markierte Sequenzier-Primer (5'-IRD 800-Markierung)]

New England Biolabs, Schwalbach/Taunus: Restriktionsendonukleasen mit 10x Reaktionspuffern, *T4-Polynukleotid-Kinase*, BSA für Molekularbiologie

Novagen, Darmstadt: *E. coli BL21(DE3)[pLysS]*

Pall Life Sciences, Ann Arbour (USA): Proteinkonzentratoren *Nanosep 10K blue*

PeqLab, Erlangen: PeqGOLD-Agarose

Promega, Madison (USA): *Wizard Plus SV Plasmid Purification Kit (MiniPreps und MidiPreps)*,

Qbiogene, Heidelberg: *Taq-DNA-Polymerase mit Reaktionspuffer*

Qiagen, Hilden: *pQE30-Expressionsvektor, pREP4, Ni²⁺-NTA-Agarose*, monoklonaler Antikörper anti-RGS(His)₄

Roche Diagnostics, Mannheim: Restriktionsendonukleasen mit 10x Reaktionspuffern, Alkalische Phosphatase, Klenow-Polymerase, *Rapid DNA Ligation Kit*, dNTP's, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, *Rapid Translation System RTS500 E. coli Circular Template Kit*

Roth, Karlsruhe: Glycin, Brillant Blau R250, Ampicillin, Kanamycin

Schleicher & Schuell, Dassel: Whatmanpaper 3MM,

Serva, Heidelberg: TES, Visking Dialyse Schlauch 8/32 (Ø 6 mm) und 27/32 (Ø 21 mm)

Sigma, Deisenhofen: Glycerol 99%, MOPS, TRIS, EDTA, EGTA, Glutaraldehyd 25% (wässrige Lösung), X-Gal, IPTG, Dowex 50WX4-400, Ponceau S, Tween 20, TEMED, LB-Agar Fertigpulver, LB-Broth Fertigpulver, Harnstoff, Dithiothreitol, Kanamycin, Tetracyclin, Bromphenolblau, α -Monothioglycerol,

Stratagene, Heidelberg: *pBluescriptII SK(-)*, *E. coli XL1BlueMRF'*-Bakterienzellen,

2.2 Geräte

Amersham Pharmacia, Freiburg: Liquid Scintillation Counter Rackbeta 1209, Elektrophorese-Spannungsquellen *EPS 301, EPS 601, 3500, ECPS 3000/150, Macrodrive Powersupply 2301* und *Power Supply 219*, Gelfiltrationssäulen *Superose 6 HR 10/30* und *Superdex 200 HR 10/30*, FPLC-Controller LCC500, FPLC-Fraktionssammler *Frac 100*, FPLC-Pumpen *P 500, Uvicord-Meßzelle, Uvicord S 2138, Monitor UVM*

Bender & Hobein, Ulm: *Vortexer Genie2*

Biometra, Göttingen: *TRIO-Thermoblock thermocycler, TRIO Heated Lid* beheizbare Deckel für *TRIO-Thermoblock*

BIO-RAD, München: Blotapparatur *Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell*

Branson, Danbury (USA): Ultraschallsonde *Sonifier B-12*, Ultraschallbad *Bransonic 12*

Eberhard-Karls-Universität (Werkstatt Pharmazie), Tübingen: Flachbett-Gelelektrophoresekammern

Eppendorf, Hamburg: Thermoblock 3401 und 5320, Thermoschüttler 5436, Tischzentrifugen *Zentrifuge 3200* und *Centrifuge 5414, 5400* und *mini spin*, Kühlzentrifuge 5402, *BioPhotometer*, Pipetten *Varipette 4810* (0,2-10 µl; 10-100 µl; 50-250 µl; 100-1000 µl)

Fröbel, Lindau: Consort *Microcomputer Electrophoresis Power Supply E411*

Gesellschaft für Labortechnik GFL, Burgwedel: Wasserbäder *Typ GFL1083*

Gilson: Pipetten 1-20 µl, 20-200 µl, 200-100 µl

Haake, Berlin: GH Heiz-/Kühlwasserbad, D8 Thermostatfühler und -regler

Heidolph: MR2002 Laborrührer

Heraeus, Osterode: *Megafuge 1.0R (BS 4402/A)*, *Varifuge 3.0*, Ölzentrifuge 4121, Tischzentrifuge *Biofuge A*, *Laminair HLB2448*,

Hoefler, San Francisco (USA): Gelgießapparatur *Mighty Small SE245*, Gellaufkammer *SE250*

H. Saur Laborbedarf, Reutlingen: Vakuumzentrifuge *Typ BA-VC-300H*

Idaho Technologies, Idaho Falls (USA): *Air Thermocycler 1605*

Kipp & Zonen, Holland: FPLC-Schreiber *BD 4041/06/06*

Kontron-Hermle, Gosheim: *Centrikon H401* und *ZK401*, Rotoren *A6.14 (SS34)* und *A8.24*

KSG Sterilisatoren, Olching: Hochdruckdampf-Sterilisator *KSG 40-2-1*

LTF Labortechnik, Wasserburg: Videoprinter *Mitsubishi Video Copy Processor P91* mit *Sony CCD Video Camera Modul XC-ST500E*, Thermopapier *K65HM*, Software *BioCapt Version 99.01s*

Memmert, Schwabach: Kühlbrutschrank *BK80*

Metrohm, Herisau (Schweiz): pH-Meter *E 512* und *605*

Millipore, Eschborn: Reinwasseranlage *MilliQ UF Plus*, Proteinkonzentratoren *Centriplus YM-100*

Moulinex (France): Mikrowellengerät *Micro Chef FM B935 Q*

MWG, Ebersberg: *LI-COR DNA sequencer model 4000*

Promega, Madison (USA): *Vac-Man* (Vakuumananschluss passend für *Wizard Plus SV Plasmid Purification Kit*)

Radiometer, Kopenhagen (DK): Leitfähigkeitsmessgerät *CDM 2F* mit Zelle *CDC 114*

Roche Diagnostics, Mannheim: *Rapid Translation System RTS500*

Sartorius, Göttingen: Tischwaage *BP 2100 S*, Analysenwaage *handy*, Sterilfilter 0,2 µm,
HAWP Filter (0,45 µm)

Sauer, Reutlingen: Vakuumzentrifuge

Vacuubrand, Wertheim: Membran-Vakuumpumpe

Vetter, Wiesloch: UV-Kontaktlampe *Chroma 43*

Wolf, Geislingen: Tischautoklav *Sanoclav*

WTB Binder, Ulm: Kühlbrutschrank *KB 240*, Wärmeschränke (u.a. für Heißluftsterilisation),
Kühlbrutschränke

2.3 Oligonukleotide

Angabe der Orientierung: s = *sense*, as = *antisense*

2.3.1 IRD 800-markierte *Primer*

Name	Orientierung	Sequenz	Bemerkung
T7	s	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	1
T3	as	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'	2
U pQE	s	5'-GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA-3'	3
R pQE	as	5'-CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG G-3'	4
pIVEX as	as	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'	5

- 1) *universal Primer* für *pBluescriptII SK (-)* und *pIVEX2.4a, -b, -c*
- 2) *reverse Primer* für *pBluescriptII SK (-)*
- 3) *sense Primer* für *pQE30*
- 4) *antisense Primer* für *pQE30*
- 5) *antisense Primer* für *pIVEX2.4 a, b und c*

2.3.2 Mutagenese-Primer

Mutationen von CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉			
Name		Position/Sequenz	Bemerkung
Kpn as	as	5'-AAA 1929GGT ACC TTC ATA GTT GAA AAC TGC1906-3'	1
Kpn A646 s	s	5'-AAA 1924GGT ACC CTG GAT GCA TTT ATC GGT GAT GCT TTA1956-3'	1/2
Kpn A650 s	s	5'-GAA 1924GGT ACC CTG GAT AAA TTT ATC GGT GCT GCT TTA ATG GCT GTT TTT1968-3'	1/3
Kpn S650 s	s	5'-GAA 1924GGT ACC CTG GAT AAA TTT ATC GGT AGT GCT TTA ATG1959-3'	4
Xho s	s	5'-AAA 2197CTC GAG ACT GTC ACC AAA GAA TAT2220-3'	5
Xho A728 as neu	as	5'-AAA 2202CTC GAG GCG GGA ACT TAA AGC CAC ACC ATC ACC AAT GAC2164-3'	5/6
Xho T728 as	as	5'-AAA 2202CTC GAG GCG GGA ACT TAA AGT CAC ACC ATC2173-3'	5/7
Xho A732 as neu	as	5'-AAA 2202CTC GAG GGC GGA ACT TAA ATT CAC ACC2176-3'	5/8
tknot s	s	5'-AAA 1774CGC GGC CGC GGT GAA CGC AAG GAG GTG1800-3'	9
(ANCB)1s4 ³	s	5'-AAA 1777GGA TCC GGT GAA CGC AAG GAG GTG1800-3'	10
(ANCB)1as ³	as	5'-AAA 2586GGA TCC CTA CTT TGT GAA AAT TGT2563-3'	11
Kpn E646 s	s	5'-AAA 1924GGT ACC CTG GAT GAA TTT ATC GGT GAT GCT TTA1956-3'	1/12
Kpn Q646s	s	5'-AAA 1924GTT ACC CTG GAT CAA TTT ATC GGT GAT GCT TTA1956-3'	1/13
HPA s	s	5'-AAA 2179GTT AAC TTA AGT TCC CGC TTG GAA2202-3'	14
HPA A721 as	as	5'-AAA 2184GTT AAC ACC ATC ACC AAT GAC TGC GTA ATC CAT2152-3'	14/15
HPA A719 as	as	5'-AAA 2184GTT AAC ACC ATC ACC AAT GAC TGT GTA AGC CAT ACG CTT2146-3'	14/16
FXa as	as	5'-AAA 2358AGT ACT GCG ACC TTC AAT CAA CTC ATA2332-3'	17
FXa2 s	s	5'-AAA 2353AGT ACT CCC ATC GAA GGC CGC ACC CAA GAG TTC2385-3'	18
Holoenzymmutanten			
holo not1 s	s	5'-AAA -7GC GGC CGC ATG ACT CTT CCC AAT CCT GG20-3'	19
holoBamh1 s	s	5'-AAA -5GGA TCC ATG ACT CTT CCC AAT CC17	20
Nhe as	as	5'-AAA 1077GCT AGC CGT AAA ACT TCC1060-3'	21
Nhe wt s	s	5'-AAA 1072GCT AGC GAT GAA GAG TTT ATG CGG1095-3'	21
Nhe A360 s	s	5'-AAA 1072GCT AGC GCT GAA GAG TTT ATG CGG1095-3'	21/22

³ Wurde von PD Dr. J. Linder zur Verfügung gestellt

Name		Position/Sequenz	Bemerkung
PinA1 A190 s	s	5'-AA 541ACC GGT AAT ATA CCC TTC AAT CGA AAT GCT GAA GAG576-3'	23/24
PinA1 as	as	5'-AA 546ACC GGT CTT ATT AGC TAA529-3'	23
PinA1 wt s	as	5'-AA 541ACC GGT AAT ATA CCC TTC AAT CGA AAT GAT570-3'	23
Eag 1 s	s	5'-AAA 827CG GCC GAT ACC ACA CAG TTA ATA GAA A853-3'	25
Eag D275 as	as	5'-AAA 832C GGC CGC ATC TGC TAC TTT AGT CCA GAG805-3'	25/26
Eag wt as	as	5'-AAA 832C GGC CGC TGC TGC TAC TTT AGT CCA GAG805-3'	25
Msc1 D105 as	as	5'-AAA 326TG GCC ATT ATC ATC GGG TAC TTT TGA CCA TAA TTG A291-3'	27/28
Msc1 s	s	5'-AAA 321T GGC CAG AAA TTT TTA GAA ATT CG344-3'	27
Msc wt as	as	5'-AAA 326TG GCC ATT ATC TTG GGG TAC TTT TGA CCA TAA TTG A291-3'	27
Hind as	as	5'-AAA 1193AA GCT TTG TAA AAT GTC TTT TTG A1170-3'	29
EcoRV as	as	5'-AAA 1821GAT ATC TGA AAA TAA AAC1804-3'	30
Anabaena- Ratten PDE2a Austauschchimären			
anasfu s	s	5'-AAA 142TTC GAA CAA TTT CTC AGA GCA ATT GAA CTC ATT AAT AAT GAA GCC CTA GAA192-3'	31/32
anasfu as	as	5'-AAA 147TTC GAA TTC GGC AGT GAT AAA GTC124-3'	31
anaxba s	s	5'-AAA 702T CTA GAT TTA GAG GCT ACT TTG CA725-3'	33
anaxba as	as	5'-AAA 707TC TAG ACT TTG CCC TAG TGT TTG AG683-3'	33
anaxho as	as	5'-TT1193AA GCT TTG TAA AAT GTC TTT TTG ATA TTG TTT CTC GAG TAA TAC1150-3'	34
mouse sfu neu s	s	5'-AAA 616TTC GAA AAG GGA TAC ACC GAC CAT GAC642-3'	35
mouse xba s	s	5'-AAA 1182T CTA GAT GAT GTC TCT GTC CTG CT1205-3'	36
mouse xba as	as	5'-AAA 1187TC TAG ATG GGT GAA GAG GTT CTT TGC C1161-3'	36
mouse xho as	as	5'-AAA 1644CTC GAG ATT CAC CTT TTT GTA TAG GAG AG1616-3'	37

Fett geschriebene Basen weisen auf das mutierte Codon hin.

Bemerkungen	
1. führt <i>KpnI</i> -Schnittstelle an Position 1924 ein	2. mutiert K646 zu A646
3. mutiert D650 zu A650	4. mutiert D650 zu S650
5. führt <i>XhoI</i> -Schnittstelle an Position 2197 ein.	6. mutiert N728 zu A728
7. mutiert N728 zu T728	8. mutiert R732 zu A732
9. führt <i>NotI</i> -Schnittstelle an Position 1776 vor G595 ein.	10. führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle an Position 1777 vor G595 ein.
11. führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle an Position 2581 nach STOP860 ein.	12. mutiert K646 zu E646
13. mutiert K646 zu Q646	14. führt <i>HpaI</i> -Schnittstelle an Position 2181 ein

15. mutiert T721 zu A721	16. mutiert D719 zu A719
17. führt die Mutationen S782E und D783G für eine Faktor-Xa-Proteaseschnittstelle bei R784 ein.	18. führt die Mutationen L788I, D789E, D790G und N791R für eine Faktor-Xa-Proteaseschnittstelle bei R791 ein
19. führt <i>NotI</i> -Schnittstelle an Position -6 vor M1 ein	20. führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle an Position -5 vor M1 ein
21. führt <i>NheI</i> -Schnittstelle an Position 1072 ein	22. mutiert D360 zu A360
23. führt <i>PinAI</i> -(iso Age I)-Schnittstelle an Position 541 ein	24. mutiert D190 zu A190
25. führt <i>EagI</i> -Schnittstelle an Position 827 ein	26. mutiert A275 zu D275
27. führt <i>MscI</i> -Schnittstelle an Position 323 ein	28. mutiert Q105 zu D105
29. <i>antisense Primer</i> für PCR Produkte, die über die <i>HindIII</i> (1188)-Schnittstelle eingefügt wurden	30. <i>antisense Primer</i> für PCR Produkte, die über die <i>EcoRV</i> (1818)-Schnittstelle eingefügt wurden
31. führt <i>SfuI</i> -(iso <i>BstBI</i>)-Schnittstelle an Position 144 ein	32. deletiert die im Wildtyp vorhandene <i>XbaI</i> (186)-Schnittstelle
33. führt <i>XbaI</i> -Schnittstelle an Position 702 ein	34. führt <i>XhoI</i> -Schnittstelle an Position 1156 ein und enthält die <i>HindIII</i> (1188) Schnittstelle
35. führt <i>SfuI</i> -(iso <i>BstBI</i>)-Schnittstelle an Position 616 der PDE-2a aus der Ratte ⁴ ein	36. führt <i>XbaI</i> -Schnittstelle an Position 1182 (PDE-2a aus der Ratte) ein
37. führt <i>XhoI</i> -Schnittstelle an Position 1639 (PDE-2a aus der Ratte) ein	

2.4 Vektoren

Zur Konstruktion von ORFs wurde *pBluescriptII SK(-)* (Stratagene) verwendet.

Für *in vivo* Proteinexpression in *BL21(DE3)[pRep4]* wurde *pQE30* (Qiagen) und für *in vitro*-Proteinexpression mit dem *Rapid Translation System RTS500* wurde *pIVEX2.4c* (Roche Diagnostics) verwendet.

Übersichtskarten und Sequenzen der Plasmide stellt der jeweilige Hersteller zur Verfügung.

⁴ Maus und Ratten-PDE-2a haben nahezu identische GAF-Domänen. Von der Maus-PDE-2a ist zur Zeit noch keine komplette cDNA-Sequenz verfügbar.

2.5 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben wurde *MilliQ*-H₂O verwendet und der pH-Wert bei RT eingestellt.

2.5.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Alle Puffer und Lösungen wurden autoklaviert (121 °C, 1 atü, 20 min) oder sterilfiltriert (0,2 µm).

2.5.2 Puffer für die Isolierung, Reinigung, Elektrophorese, Sequenzierung und Prozessierung von DNA

TAE 40 mM TRIS/Acetat pH 8,0 1 mM EDTA	10x TBE-Puffer (LI-COR) 1,34 M TRIS 440 mM Borsäure 25 mM EDTA
TE-Puffer 10 mM TRIS/HCl pH 7,5 1 mM EDTA	10x Klenow-Puffer 200 mM TRIS/HCl pH 7,9 60 mM MgCl ₂ 10 mM Dithiothreitol
10x CM 100 mM CaCl ₂ 400 mM MgCl ₂	Probenpuffer (Agarosegel) 1 x TAE 50 % Glycerol 0,5 % Bromphenolblau 0,5 % Xylencyanol
10x Dephosphorylierungspuffer 500 mM TRIS/HCl pH 8,5 1 mM EDTA	dNTPs 20 mM je dNTP

2.5.3 Nährmedien für *E. coli*-Bakterien

LB-Medium 20 g/l LB Broth (Fertigpulver)	LB-Plattenagar 35 g/l LB Agar (Fertigpulver)
LB-Plattenagar mit Antibiotika 100 µg Ampicillin und/oder 50 µg Kanamycin und/oder 10 µg Tetracyclin und/oder	

2.5.4 Puffer und Lösungen für Proteinchemie

2.5.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Trenngelpuffer

1,5 M TRIS/HCl pH 8,8
0,4 % SDS

Hoefer-Laufpuffer

25 mM TRIS
192 mM Glycin
0,1 % SDS
pH = ca. 8,3 (nicht einstellen!)

Coomassie Färbelösung

0,2 % Brilliant Blue G-250
40 % Methanol
1 % Essigsäure

Sammelgelpuffer

500 mM TRIS/HCl pH 6,8
0,4 % SDS

4x Probenpuffer

130 mM TRIS/HCl pH 6,8
10 % SDS
2 % Lithiumdodecylsulfat
10 % β -Mercaptoethanol
20 % Glycerol
0,03 % Bromphenolblau

Entfärber

10 % Essigsäure
30 % Ethanol

2.5.4.2 Puffer für Western Blots und verwendete Antikörper

Transferpuffer (nach Towbin)

25 mM TRIS/HCl
192 mM Glycin
20 % Methanol

TBS-Puffer

5 mM TRIS/HCl pH 7,5
0,9 % NaCl

M-TBS

5 % Milchpulver
in TBS-Puffer

TBS-T

0,1 % Tween 20
in TBS-Puffer

Tab. 2-1: Verwendete Antikörper und deren Verdünnung in Immunoblots (in M-TBS).

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
anti-RGS(His)4-Antikörper Monoklonaler Antikörper der Firma Qiagen. Epitop: Peptid-tag RGSHHHH Verdünnung: 0,1 μ g/ml (1: 2000)	Ziege-anti-Maus konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase Firma Dianova Epitop: F _c -Fragment Maus-IgG Verdünnung: 1: 5000

2.5.4.3 Puffer für native Proteinreinigung an NiNTA-Agarose

Die pH-Einstellung erfolgte bei 4 °C

Zellysepuffer⁵

50 mM TRIS/HCl pH 8,5
10 mM α -Monothioglycerol
50 mM NaCl

Dialysepuffer⁶

50 mM TRIS/HCl pH 8,5
10 mM α -Monothioglycerol
10 mM NaCl
2 mM MgCl₂

Pelletwaschpuffer

50 mM TRIS/HCl pH 8,5
1 mM Na₂EDTA⁷

Waschpuffer 1⁵

50 mM TRIS/HCl pH 8,5
10 mM α -Monothioglycerol
2 mM MgCl₂
400 mM NaCl
5 mM Imidazol

Waschpuffer 2⁵

wie Waschpuffer 1 aber mit 15 mM Imidazol

Waschpuffer 3⁵

wie Waschpuffer 2 aber mit 10 mM NaCl

Elutionspuffer⁵

wie Waschpuffer 3 aber mit 150- 250 mM Imidazol

2.5.4.4 Puffer und Lösungen für Adenylatcyclase-Enzymtests

AC-Substrat-Lösung (10x)

750 μ M ATP pH 7,5 oder 8,5
inkl. 16-30kBq [α -³²P]-ATP

AC-Stoppuffer

3 mM cAMP/TRIS pH 7,5
3 mM ATP/TRIS pH 7,5
1,5 % SDS

AC-Cocktail (2x)

43,5 % Glycerol
100 mM TRIS/HCl bzw. MOPS/NaOH pH 7,5 oder 8,5
4 mM cAMP⁸ (inkl. \approx 100Bq [2,8-³H]-cAMP)
0,46 mg Kreatinkinase⁹ und 6 mM Kreatinphosphat⁹
4 mM MnCl₂ und/oder 20 mM MgCl₂

⁵ Bei den ersten Reinigungsversuchen von CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉ war in den Puffern 10 mM β -Mercaptoethanol anstelle von α -Monothioglycerol, mit dem höhere Enzymaktivitäten gemessen wurden, enthalten. Für die Holoenzymreinigung wurde α -Monothioglycerol weggelassen und 20 % Glycerol zugesetzt.

⁶ Die Glycerolkonzentration im Dialysepuffer betrug je nach gewünschter Proteinkonzentration oder Lagerungsbedingung 20 - 50%.

⁷ wurde bei der Holoenzymreinigung weggelassen

⁸ wurde bei Tests mit dem Holoenzym in identischer Stoffmenge erst nach dem Stoppuffer zugegeben

⁹ wurde bei gereinigten Enzympräparationen, bei denen keine störende ATPase-Aktivität festgestellt werden konnte, weggelassen.

2.5.4.5 Sonstige Puffer

³H-cAMP Bindungspuffer

10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 6,8
1 mM EDTA

FPLC Puffer

50 mM TRIS/HCl pH 7,5
10 mM NaCl
2 mM MgCl₂
20 % Glycerol

Der Puffer wurde entgast und filtriert.

Glutaraldehyd-Dimerisierungspuffer

50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,3
10 mM NaCl
20 % Glycerol
2 mM MgCl₂

Die zu dimerisierenden Proteine wurden vorher mit diesem Puffer über Nacht dialysiert, um störendes TRIS zu entfernen.

3 Methoden

3.1 Gentechnologische Methoden

3.1.1 Grundlegende Methoden der Analyse, Prozessierung und Rekombination von DNA

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Agarose-Gelelektrophorese wurden nach dem Laborhandbuch von Sambrook. (Sambrook J., 1989) durchgeführt.

3.1.1.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und Umpufferung von DNA-Proben

Es wurde der *Nucleotrap-Kit* der Firma Macherey-Nagel verwendet und nach den Herstellerprotokollen für „*Purification of DNA fragments from agarose gels*“ und „*Concentration and desalination of DNA fragments*“ vorgegangen.

3.1.1.2 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Die *E. coli*-Kultur wurde in ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium überimpft und anschließend bei 37 °C und 220 rpm über Nacht geschüttelt. Es wurden 3-5 ml Kultur für eine Minipräparation mit dem *Wizard Plus SV Plasmid Purification Kits* verwendet (ca. 1-10 µg DNA) und 25-100 ml für eine Midipräparation (100-300 µg DNA) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.1.1.3 Restriktionsverdau von DNA-Molekülen

Restriktionsendonukleasen wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Bei Verwendung mehrerer Enzyme in einem Ansatz wurde ein kompatibler Puffer oder der *OnePhorAll*-Puffer von Amersham Pharmacia verwendet. Analytische Restriktionsverdaue enthielten 100-300 ng Plasmid-DNA und 1-5 U Enzym, präparative Restriktionsverdaue ca. 1 µg Plasmid-DNA und 3-6 U Enzym. Zu jedem Ansatz (10µl) wurden 0,3 µl *purified BSA 100X* von NEB zugegeben. Die Analyse der Verdaue erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung und Detektion im UV-Licht. Als Größenstandards diente *EcoRI-HindIII*-verdaute λ-DNA und *MspI-SspI*-verdaute *pBluescriptII SK (-)*-Plasmid-DNA.

3.1.1.4 Glätten überhängender DNA-Enden (Klenow Verdau)

Um glatte (*blunt*) DNA-Enden zu erzeugen, wurde nach entsprechendem Restriktionsverdau das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* verwendet. Ein Reaktionsansatz enthielt 7,2 µl DNA, 1 µl 10x Klenow-Puffer und 0,8 U Klenow. Nach 10 min Inkubationszeit bei 37 °C wurde 1 µl dNTPs zugegeben und der Ansatz für weitere 40 min bei 37 °C inkubiert. Die erste Inkubation über 10 min ohne dNTPs wurde nur bei 3'-Überhängen durchgeführt.

3.1.1.5 5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit T4-Polynucleotidkinase phosphoryliert. Ein Ansatz wurde mit 10 U Enzym, 1 mM ATP und mitgeliefertem Reaktionspuffer bei 37 °C mindestens 1 h inkubiert.

3.1.1.6 5'-Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden

Verdaute Plasmide wurden zur Vermeidung von Religationen mit 2 U alkalischer Phosphatase im mitgelieferten Reaktionspuffer bei 37 °C für 1 h inkubiert. Bei Kompatibilität mit dem Puffer des Restriktionsverdaus wurde schon während des Verdaus dephosphoryliert. Anschließend wurde das Plasmid gelelektrophoretisch gereinigt.

3.1.1.7 Ligation von DNA-Molekülen

Zur Ligation wurde der *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde 5 (Ligation mit „sticky ends“) bis 30 min (Ligation mit „blunt ends“) bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.1.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCRn wurden mit spezifischen *Primern* durchgeführt. Sie dienen zur gezielten Mutagenese und präparativen DNA-Gewinnung und wurden am Heizblock oder mit der Heißluft-PCR (zum Optimieren der Reaktionsbedingungen) durchgeführt.

Die Reaktionsansätze enthielten (Endkonzentrationen):

- 1-10 ng Plasmid-DNA
- jeweils 500 nM *Primer*
- jeweils 200 µM dNTPs
- 1 U Taq-Polymerase
- Inkubationspuffer des Herstellers (gegebenenfalls mit Zusatz von 2 mM MgCl₂).

Folgendes PCR-Programm wurde benützt:

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Vor-Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	20-30
<i>Primer</i> -Anlagerung	T _m	1 min	
Extension	72 °C	1 min	
Auffüllen	72 °C	10 min	

An der Heißluft-PCR wurden von dem Reaktionsansatz 10 µl in eine Glaskapillare eingeschmolzen und folgendes Programm benützt:

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Vor-Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	10 s	30
<i>Primer</i> -Anlagerung	T _m	10 s	
Extension	72 °C	15 s	
Auffüllen	72 °C	1 min	

Die Anlagerungstemperatur berechnete sich aus der Schmelztemperatur (T_m in °C), die bei Längen bis zu 22 auf die Matrize bindenden bp mit folgender Formel berechnet wurde:

$$T_m = 4 \times (\text{GC}) + 2 \times (\text{AT})$$

(GC): Anzahl der Basen G und C
(AC): Anzahl der Basen A und T

Bei *Primer*-Längen über 22 bp wurde die vom Hersteller (MWG Biotech) angegebene Schmelztemperatur oder der Erfahrungswert 56 °C benützt.

Der PCR-Ansatz wurde durch ein Agarose-Gel analysiert, die gewünschte Bande ausgeschnitten und die DNA mit Nucleotrap extrahiert. Nach 5'-Phosphorylierung der DNA-Fragmente wurden diese in entsprechend geschnittene Plasmide oder in mit *EcoRV*-geschnittenen und dephosphorylierten *pBluescriptII SK(-)* ligiert.

DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenz der Klone wurden per *Cycle Sequencing* mit dem *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit* kontrolliert. 130 ng pro kb Plasmid-DNA wurden mit 2 pmol Fluoreszenz-markierten *Primer* (2.3.1 IRD 800 markierte Primer) und 3 % DMSO vermischt und mit Wasser auf ein Volumen von 23 µl aufgefüllt. 5 µl dieses Ansatzes wurden mit jeweils 1 µl Reaktionsmix (siehe Herstellerprotokoll) vermischt und mit einem Tropfen *Chill out Wax* überschichtet. Die PCR wurde mit dem nachfolgendem Programm durchgeführt:

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
1. Denaturierung	94 °C	2 min	30
Denaturierung	94 °C	20 s	
<i>Primer</i> -Anlagerung	T_m	20 s	
Extension	72 °C	30 s	
Auffüllen	4 °C	∞	

Für die *Primer T3* und *T7* wurde 56 °C und für alle anderen Sequenzier-*Primer* 54 °C als *Primer*-Anlagerungstemperatur verwendet.

Anschließend wurden die Proben mit 6 µl Stop-Puffer gemischt und davon 1 µl auf ein 6%iges Polyacrylamid-Gel aufgeladen. Die Elektrophorese erfolgte mit TBE-Puffer bei 50 W (1500 V, 37 mA). Die DNA-Fragmente wurden über Laserfluoreszenz bei 700 nm mit einem *LI-COR DNA Sequenzer Model 4000* detektiert und mit der *BaseImagIR V. 4.0* Software (MWG-Biotech) analysiert.

3.1.2 Arbeiten mit *E. coli*-Bakterien

3.1.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterienzellen für die Transformation

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit der CaCl_2 -Methode hergestellt (Cohen et al., 1972).

Eine Übernachtskultur wurde im Verhältnis 1 : 100 in LB-Medium überimpft und bei 37 °C bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,4$ bei 220 rpm kultiviert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 15 min bei 4 °C mit 1000 g abzentrifugiert, in 50 ml 100 mM $CaCl_2$ -Lösung suspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und nach erneuter Zentrifugation in 10 ml 100 mM $CaCl_2$ -Lösung + 20 % Glycerol suspendiert, 2 h auf Eis inkubiert und danach in 100 µl-Portionen aliquotiert. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

3.1.2.2 Standardtransformation von *E. coli*-Zellen

Ein Ligationsansatz bzw. eine zirkuläre Plasmid-DNA wurde mit 10 µl 10x CM-Puffer versetzt und auf 100 µl mit sterilem bidest. Wasser aufgefüllt. Nach Vermischen mit 100 µl kompetenten Bakterienzellen durch vorsichtiges Agitieren des Reaktionsgefäßes erfolgte eine Inkubation für 20 min auf Eis und dann ein Hitzeschock von 1 min bei 42 °C. Danach wurde der Ansatz wieder 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl LB-Medium bei 37 °C für 45-60 min bei 220 rpm geschüttelt. 100-400 µl des Transformationsansatzes wurden auf entsprechende antibiotikahaltige LB-Agar Platten ausgestrichen und bei 37 °C etwa 12h inkubiert.

3.1.2.3 Schnelltransformation von *E. coli*-Zellen

100 µl kompetente Bakterienzellen wurden mit ca. 200 ng Plasmid gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. 20-100 µl des Transformationsansatzes wurden auf entsprechend antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen und bei 37 °C etwa 12 h inkubiert.

Danach konnten Einzelkolonien gepickt und Flüssigkulturen damit angeimpft werden.

3.1.2.4 Herstellung von Bakteriendauerkulturen

Etwa 2 ml Bakterienkultur wurden abzentrifugiert und mit etwa 500 µl LB-Medium, das 50 % Glycerol enthielt resuspendiert. Die Kulturen sind bei -80 °C mehrere Jahre lagerbar.

3.2 Allgemeine Proteinchemische Methoden

3.2.1 *BioRad*¹⁰ Proteinbestimmung

1-15 µg Protein wurden in 800 µl Wasser aufgenommen, mit 200 µl *BioRad*-Reagenz in gleichmäßigen Zeitabständen versetzt, gründlich gemischt und maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Proteingehalt wurde durch Absorptionmessung bei 595 nm bestimmt und anhand einer Kalibriergerade mit 1-15 µg BSA abgeglichen.

3.2.2 OD_{280} -Messung zur Proteinbestimmung

25-50 µg Protein wurden in 100 µl Wasser aufgenommen und gegen Wasser in einer Quarzküvette bei 280 nm vermessen. Zum Abgleich der Konzentration wurde per *BioRad*-

¹⁰ Die *BioRad* Proteinbestimmung gleicht im wesentlichen der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) wird aber mit dem von der Firma *BioRad* gelieferten lagerungsstabilem Reagenz durchgeführt.

Messung ein Umrechnungsfaktor festgelegt. Da sich bei der Lagerung von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ vermutlich Mikroaggregate bilden, die durch Streuung die Absorption verfälschen, wurde nur frisches Protein verwendet

3.2.3 Proteinkonzentrierung durch Dialyse

Die Eluate der *NiNTA*-Reinigung wurden im Visking Dialyse-Schlauch 8/32 (Ø 6 mm) oder 27/32 (Ø 21 mm) über Nacht gegen 500 ml Dialysepuffer dialysiert, dadurch vom Imidazol des Elutionspuffers befreit und die Proteinkonzentration auf 5-10 µg/µl eingestellt.

3.2.4 Proteinkonzentrierung über Ultrafiltration

Es wurden Centriplus- und Nanosep-Systeme zur Proteinkonzentrierung durch Ultrafiltration in Zentrifugeneinsätzen am Holoenzym getestet. Das Centriplus-System ist für 1-10 ml und das Nanosep-System für 50-500 µl Probenvolumen geeignet.

1,2 ml Proteinlösung in Dialysepuffer wurde in die Centriplus-Filterkammern (100 kDa Molekulargewichtsfiler) mit angefeuchteter Filtrationsmembran gegeben und im *A8.24*-Rotor in der Centrikon-Zentrifuge bei 4 °C mit etwa 3000xg für 45 min zentrifugiert. Das Protein konnte 5-10fach konzentriert werden. Im Durchlauf zeigte sich kein Protein, jedoch ging 10-20 % Protein durch Adsorption an die Membran verloren.

Die Nanosep-Filter wurden auf Eppendorf-Gefäße aufgesetzt und die Filterkammer (10 kDa Molekulargewichtsfiler) mit etwa 500 µl Proteinlösung beladen und in der Eppendorf-Kühlzentrifuge *5402* mit 13.000 Umdrehungen/min für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Dadurch konnte das Protein ebenfalls 5-10fach konzentriert werden. Im Durchlauf konnte kein Protein nachgewiesen werden. Der Verlust durch Adsorption an die Filtermembran war max. 10 %.

3.2.5 Detektion von Proteinen

3.2.5.1 SDS-PAGE

Mit der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurden die Proteinen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteinproben wurden mit SDS-PAGE 4x-Probenpuffer gemischt, 5 min auf 95 °C erhitzt und dann auf das Gel aufgetragen.

Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der je nach erwarteter Proteingröße verschiedenprozentigen Gele:

Sammelgele	4,5 %	Trenngele	7,5 %	15 %
Sammelgelpuffer	1 ml	Trenngelpuffer	3 ml	3 ml
Wasser	2,4 ml	Wasser	6 ml	3 ml
Acrylamid-Lösung ¹¹	0,6 ml	AA/Bis	3 ml	6 ml
10 % APS	40 µl	10 % APS	80 µl	80 µl
Temed	10 µl	Temed	10 µl	10 µl

Das Volumen reicht für zwei Mini Gele (Hofer, 10 cm x 8 cm, Dicke: 1mm). Die Elektrophorese erfolgte in einer Vertikal-Elektrophoreseeinheit (*Hofer Mighty Small*) bei 20 mA pro Gel und maximal 200 V. Sobald die blaue Probenpufferbande das Gel verlassen hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Danach wurde das Gel entweder gefärbt oder für einen Elektrobplot vorbereitet. Gefärbt wurde mit *Coomassie Brilliant Blue* für mindestens 30 min und mit *Coomassie*-Entfärber entfärbt, bis Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Als Proteinstandard wurde eine Mischung der Firma PeqLab (14,4-116 kDa) oder aus folgenden Markerproteinen (1 µg Protein pro Bande) verwendet:

Phosphorylase b	97,4 kDa
Bovine Serumalbumin	66 kDa
Ovalbumin	45 kDa
GAPDH	36 kDa
Carboanhydrase	29 kDa
Chymotrypsinogen A	25 kDa
Cytochrom C	12,5 kDa.

Mit der *Biocapt Software Version 99.01* konnten die Gele ausgewertet und archiviert werden.

3.2.5.2 Western Blot

Zum immunochemischen Nachweis der Gen-Produkte wurden sie nach SDS-PAGE durch *Semi-Dry*-Elektrotransfer (Towbin et al., 1979) auf PVDF-Membran übertragen. Das Polyacrylamid-Gel wurde kurz in Towbin-Puffer gewaschen, die Blot-Membran etwa 10 min in Methanol, 10 min in Wasser und anschließend 5 min in Towbin-Puffer getränkt. Zum Elektrotransfer wurde folgende Sandwich-Anordnung zusammengebaut:

- zunächst wurden auf die Anodenplatte drei in Towbin-Puffer getränkte Whatman-Papiere gelegt,
- darüber kamen die Blot-Membran, dann das Gel und anschließend nochmals auf der Seite der Kathodenplatte drei Whatman-Papiere.

Der Proteintransfer erfolgte für 3 h bei maximal 20 V und 2,5 mA/cm². Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde das Gel in *Coomassie Brilliant Blue* angefärbt. Die Membran wurde ca. 5 min in Ponceau S gefärbt, mit Wasser entfärbt bis Proteinbanden zu erkennen waren und die

¹¹ 37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid Fertiglösung

Markerbanden mit Bleistift markiert. Danach wurde mindestens 1 h oder über Nacht mit M-TBS blockiert und die Membran gewaschen (TBS-T, 2 x 10 sec., 1 x 15 min und 2 x 5 min). Mit Primärantikörper (anti-RGS(His)₄-Antikörper 1 : 2000 in M-TBS) wurde 1 h inkubiert. Nach Waschen (wie oben) wurde mit dem Sekundär-Antikörper (Ziege-anti-Maus konjugiert mit Meerrettichperoxidase von Dianova 1 : 5000 Verdünnung in M-TBS) 1-2h inkubiert und wie oben mit TBS-T gewaschen. Die Chemolumineszenzreaktion mit dem *ECL Plus Western Blotting Detection Kit* (Amersham) erfolgte nach Herstellerangaben und wurde durch Exposition (10 s bis 15 min) von *Hyperfilm-ECL* nachgewiesen.

3.3 Proteinexpression in *E. coli*

In *E. coli* BL21(D3)[pREP4]-Zellen wurden das CyaB1-Holoenzym und seine Teilbereiche exprimiert. Die *E. coli*-Zellen trugen zusätzlich das low copy Plasmid pREP4 (mit einem Kanamycin-Resistenz-Gen), auf dem konstitutiv das *lac* Repressorprotein überexprimiert wird, welches an einem doppelten *lac-operator* im T5-Promotor eine Hintergrundexpression von pQE30 unterdrückt.

3.3.1 Vorkultur

Aus einer Bakteriendauerkultur des Expressionsplasmids in *E. coli* BL21(D3)[pREP4]-Zellen wurde in 5-7,5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Ampicillin überimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

3.3.2 Expression von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ und Mutanten

Die Expression fand bei 27-30 °C mit 300 µM IPTG statt. Die Expression führte auch zur Bildung von *inclusion bodies* (hochverdichtete, unlösliche Proteinaggregate), aber im Fall von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ konnte genug lösliches Protein erhalten werden.

Die Vorkultur wurde 1 : 40 auf die Hauptkultur (200-300 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusatz) überimpft und bei 30 °C, 220 rpm bis zu einer Dichte von OD₆₀₀ = 0,6 kultiviert. Nach Induktion mit IPTG und einem Zusatz von 10 mM MgCl₂ wurden die Zellen weitere 3-4 Std. inkubiert (27-30 °C, 220 rpm). Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation der Kulturen (10 min, 3200xg, 4 °C). Das überstehende Medium wurde abgegossen, die Zellen in 40 ml Waschpuffer suspendiert und wie oben zentrifugiert. Die *E. coli* wurden bei -80 °C gelagert oder weiterverarbeitet (siehe Proteinreinigung). Aus 200 ml Kultur wurde anschließend etwa 1,5 mg lösliches Protein gereinigt. Eine Verlängerung der Expressionszeit brachte nur geringfügig höhere Ausbeuten und eine Verkürzung auf 1,5 h halbierte die Ausbeute.

3.3.3 Expression des Holoenzym, Mutanten und Chimären

Die Bakterien wurden bei 20 °C mit 7,5-15 µM IPTG gezüchtet, um eine geringe Expressionsrate zu erreichen. Dadurch sollte mehr lösliches Protein aufgrund verlängerter Zeit für die Proteinfaltung entstehen.

Die Vorkultur wurde 1 : 40 auf die Hauptkultur (200 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen) überimpft und bei 30 °C bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,4-0,6$ bei 220 rpm inkubiert und 20 min auf RT abgekühlt. Nach Induktion wurde mindestens 5-14 Std. im klimatisierten Raum bei 20 °C weiter geschüttelt (Ernte und Lagerung wie unter 3.3.2).

3.3.4 Expression mit dem RTS 500

Das *Rapid Translation System RTS500* und das *E. coli Circular Template Kit* (Roche) wurde nach Herstelleranleitung verwendet. Für die Klonierung von *CyaB*₁₅₉₅₋₈₅₉ und seinen Verkürzungen wurde der mitgelieferte Plasmidvektor *pIVEX2.4c* verwendet. Es wurden 10 µg Expressionsplasmid eingesetzt. Die Expressionsexperimente wurden bei 30 °C und 120 rpm Rührgeschwindigkeit für 12 Std. durchgeführt.

3.4 Proteinreinigung

3.4.1 Proteinreinigung aus *E. coli BL21(D3)[pREP4]*

Die Proteinreinigung erfolgte über den N-terminalen Hexahistidinrest (kodiert in PQE30, HexaHis-tag). Dieser ermöglicht den immunochemischen Nachweis mit anti-RGS(His)₄-Antikörper und die Affinitätsreinigung über *NiNTA-Agarose*. Die Reinigung wurde nach dem *QIAexpressionist*-Protokoll (Qiagen, Third Edition, 2001) durchgeführt.

3.4.1.1 *CyaB*₁₅₉₅₋₈₅₉ und Mutanten

Bakterienpellets aus 200-300 ml Kultur wurden bei RT aufgetaut und anschließend in flüssigem N₂ schockgefroren. Danach wurden sie in 20 ml Zellysepuffer suspendiert, mit Ultraschall 3 x 10 s bei Stufe 4 (*Branson Sonifier B-12*) homogenisiert und bei 50.000xg für 1 h bei 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit 150-200 µl *NiNTA-Agarose* ca. 1 h auf Eis agitiert, anschließend die *NiNTA-Agarose* bei 1500xg abzentrifugiert und komplett in eine Miniprep-Säule (*Wizard Plasmid Purification Kit, Promega*) überführt. Die unspezifisch gebundenen Proteine wurden nacheinander mit je 2 ml Wasch-Puffer 1, 2 und 3 abgewaschen, bevor das gewünschte Protein mit 500 µl Elutionspuffer eluiert wurde. Die Säule wurde mit dem Eluat noch einmal eluiert. Alle Schritte erfolgten unter Eiskühlung. Das Expressionspellet, die Überstände, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert. Das gereinigte Protein wurde entweder direkt auf AC-Aktivität getestet oder über Nacht dialysiert und danach getestet und gelagert.

3.4.1.2 Holoenzym und Mutanten

Das Holoenzym und die Mutanten wurden analog zur katalytischen Domäne gereinigt mit folgenden Änderungen:

- Die Bakterienpellets aus 600 ml Bakterienkultur wurden mit 50 mM TRIS/HCl pH 8,5 gewaschen.
- Alle weiteren Puffer enthielten 20 % Glycerol
- Es wurde 4 mg Lysozym zum Zellysepuffer zugesetzt und etwa 1 Stunde inkubiert
- Nur 80-100 µl *NiNTA-Agarose* wurde zugesetzt und 2 h oder über Nacht agitiert.

3.4.2 Proteinreinigung aus dem RTS 500

Nach Zentrifugation der *Reaction Solution* bei etwa 50.000 g wurden 0,7 ml Überstand in 7 ml Zellysepuffer verdünnt und mit 70 µl *NiNTA-Agarose* wie oben weiter behandelt. Nach dem Waschen wurde mit 300 µl Elutionspuffer zweimal eluiert, das Eluat direkt auf AC-Aktivität getestet und per SDS-PAGE analysiert.

3.5 Adenylatcyclase-Test

Die Adenylatcyclase-Aktivität wurde über Umsetzung von [α - 32 P]-ATP in [α - 32 P]-cAMP gemessen (Salomon et al., 1974). 3 H-cAMP diente als interner Standard für die Wiederfindungsrate. Ein Reaktionsansatz besteht aus: 50 µl AC-Test-Cocktail, 40 µl Proteinprobe und 10 µl ATP-Start-Lösung. Die Proteinprobe und der Cocktail wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis gemischt, die Reaktion mit ATP gestartet, jede Probe 10 min bei 30 °C inkubiert. Mit 150 µl AC-Stoppuffer wurde die Reaktion beendet, die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt und 750 µl Wasser zugegeben. Jeder Testansatz wurde doppelt ausgeführt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus mehreren Experimenten. Wenn nicht anders angegeben, war die Standardabweichung unter 5 %. Als Nullwert diente ein Testansatz mit Wasser. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen für CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ wurden die Tests auch bei 45 °C für 4 min bei pH 8,5 (MOPS/NaOH) durchgeführt. Das Holoenzym wurde bei 37 °C, pH 7,5 (TRIS/HCl) für 4 min inkubiert. Der interne 2 mM cAMP-Standard wurde nach dem Stoppen zugegeben.

Zur Trennung von ATP und cAMP wurde der Ansatz auf Glassäulen mit 1,2 g Dowex-50WX4-400 gegeben und nach Einsickern der Probe mit 3 ml Wasser gewaschen. Wenn es das Elutionsprofil der Säule erforderlich machte, wurde mit 4 ml Wasser gewaschen. Anschließend wurde mit 5 ml Wasser auf Aluminiumoxid-Säulen (9 x 1 cm Glassäulen mit 1,0 g Al₂O₃ 90 aktiv, neutral) eluiert und diese mit 4 ml 0,1 M TRIS/HCl, pH 7,5 in Szintillationsgefäße in 4 ml vorgelegten Szintillator *Ultima XR Gold* eluiert. Nach gründlichem Mischen wurde im *Liquid Scintillation Counter* ausgezählt.

Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel¹² berechnet:

$$A \left[\frac{\text{pmol [cAMP]}}{\text{mg [Protein]} \times \text{min}} \right] = \frac{\text{Substrat } [\mu\text{M}]}{\text{Zeit [min]}} \times \frac{10^5}{\text{Proteinmenge } [\mu\text{g}]} \\ \times \frac{\text{cpm } [^{32}\text{P}]_{\text{Probe}} - \text{cpm } [^{32}\text{P}]_{\text{Leerwert}}}{\text{cpm } [^{32}\text{P}]_{\text{total}}} \times \frac{\text{cpm } [^3\text{H}]_{\text{total}}}{\text{cpm } [^3\text{H}]_{\text{Probe}} - 3\% [^{32}\text{P}]_{\text{Probe}}}$$

Die eingesetzten Mengen von radioaktiv markierten cAMP und ATP wurden als sogenannte ³H- und ³²P-totals direkt in Elutionspuffer und Szintillator ausgezählt (s. o.). Als Negativkontrolle bei ungereinigten Expressionsüberständen wurde eine Probe aus einer „Leervektor-Expression“ der jeweiligen Zellkultur verwendet. Die Säulen wurden nach der Benutzung wie folgt regeneriert:

- Dowex-Säulen: 5 ml 2N HCl, 2x 5 ml Wasser
- Aluminiumoxid-Säulen: 2x 5 ml 0,1 M TRIS/HCl, pH 7,5

3.6 Test auf störende Phosphodiesterase-Aktivität¹³

Um zu sehen, ob im gereinigten Protein auch Phosphodiesterasen verblieben sind, wurden die Eluate der *NiNTA*-Reinigung mit 7,5 μM cAMP (enthält 120 Bq [2,8-³H]-cAMP) als Substrat analog zum AC-Test inkubiert und gestoppt. Der Ansatz wurde auf eine Aluminiumoxid-Säule gegeben, mit 4 ml TRIS/HCl pH 7,5 eluiert, mit Szintillator gemischt und gezählt. Gegenüber der *Blank*-Probe (mit Wasser statt Eluat) sollte die cAMP-Wiederfindung über 90 % liegen.

Gleichzeitig sollte bei einer Elution mit 4 ml Wasser statt TRIS/HCl-Puffer die Wiederfindung des eingesetzten [2,8-³H]-cAMP-Totals < 2,5 % sein, da ansonsten eine Zersetzung des [2,8-³H]-cAMP in ³H₂O und cAMP nicht ausgeschlossen werden kann.

3.7 cAMP-Bindungsstudien

Der Test erfolgte nach (Ho et al., 2000; McAllister-Lucas et al., 1995). 2 μg CyaB1₁₋₈₅₉ oder CyaB1₁₋₈₅₉D360A wurden 1 Stunde in ³H-cAMP-Bindungspuffer mit 0,5-10 μM cAMP (enthält bis zu 37 kBq [2,8-³H]-cAMP) bei 0 °C inkubiert. Die Probe wurde auf vorbefeuchtete HAWP-Filter (0,45 μm; Sartorius, Göttingen) gegeben, mit Vakuum abgesaugt und mit 10 ml eiskühlten Puffer nachgespült. Die Filter wurden getrocknet, mit Szintillator gründlich geschüttelt und die Radioaktivität gezählt. Die unspezifische Nukleotidbindung wurde mit 2 μg BSA

¹² Die Subtraktion von 3% der ³²P-Counts vom entsprechenden ³H-Wert erfolgte aufgrund der Beeinflussung des ³H-Kanals durch die Einstrahlung von ³²P

¹³ Basiert auf Überlegungen von PD Dr. J. Linder

gemessen und von den erhaltenen Rohdaten subtrahiert. Kühlung und gleichförmige Inkubations- und Spülzeiten sind für aussagekräftige Testergebnisse zwingend.

3.8 Säulenchromatographie

Es wurde an einer Pharmacia-FPLC Apparatur bei 4 °C chromatographiert. Alle Puffer wurden mit MilliQ-Wasser hergestellt, durch einen Mikrofilter (0,2 µm) filtriert und entgast. Das Holoenzym wurde vorher konzentriert (s. 3.2.4). Das Proteinprofil wurde bei 254¹⁴ nm registriert. In allen Fraktionen wurde AC-Aktivität bestimmt.

3.8.1.1.1 Gelfiltration von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉

Säulenmaterial	Superdex 200 HR 30/10
Säulenvolumen	24 ml
Probe	100 µl CyaB1 ₅₉₅₋₈₅₉ (3,3 µg/µl)
Chromatographie	
Flussrate	0,5 ml/min
Equilibrierung	50 ml FPLC-Puffer
Auftrag	100 µl
Elution	30 ml FPLC-Puffer
fraktionieren ab	7 ml
Fraktionsgröße	0,250 ml
Eingestellte AU _{max}	0,2
Papiervorschub des Schreibers	0,5 cm/ml

3.8.1.1.2 Gelfiltration von CyaB1₁₋₈₅₉

Säulenmaterial	Superose 6 HR 30/10
Säulenvolumen	24 ml
Probe	100 µl CyaB1 ₁₋₈₅₉ (0,56 µg/µl)
Chromatographie	
Flussrate	0,3 ml/min
Equilibrierung	50 ml FPLC-Puffer
Auftrag	100 µl
Elution	30 ml FPLC-Puffer
fraktionieren ab	7 ml
Fraktionsgröße	0,250 ml
Eingestellte AU _{max}	0,05
Papiervorschub des Schreibers	0,5 cm/ml

¹⁴ Normalerweise wird eine Wellenlänge von 280 nm für Proteine und 254 nm wird für DNA verwendet. Die falsche Justierung der Messzelle wurde erst nach den Läufen bemerkt.

3.9 Klonierungen

Der Originalklon mit dem Gen für CyaB1 (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. D89623, siehe Fig. 3-1, folgende Seiten) wurde von Prof. M. Ohmori, Tokio, in *pGEM-Teasy* zur Verfügung gestellt.

	<i>bp</i>	AS
ATGACTCTTCCCAATCCTGGTAGCGTTTTGGCTTCGTTAACAGAACTGACTCAAGTTAAT	60	
M T L P N P G S V L A S L T E L T Q V N		20
CGTACCCACGCTTTATTGCGTCGGGTCAAAGACCTTTCTGTTAACGAATTTGTTTGCTTG	120	
R T H A L L R R V K D L S V N E F V C L		40
CTAGACTTTATCACTGCCGAATTTCAACAATTTCTCAGAGCAATTGAACTCATTAATAAT	180	
L D F I T A E F Q Q F L R A I E L I N N		60
GAAGCTCTAGAAAATATGTTGGAGAAAGTGTGGAAGCAATTACACTGAAAATCGGTCAA	240	
E A L E N M L E K V L E A I T L K I G Q		80
ATTCTCCAAGCAGAACATACAGCCATTTTCTTAGTTGACTATGATAAATGTCAATTATGG	300	
I L Q A E H T A I F L V D Y D K C Q L W		100
TCAAAGTACCCCAAGATAATGGGCAGAAATTTTTAGAAATTCGTATTCCCATTACTGTA	360	
S K V P Q D N G Q K F L E I R I P I T V		120
GGAATTCCTGGTCATGTTGCTAGTACAGGTCAATATTTAAATATCTCAGAAACTGCTACT	420	
G I P G H V A S T G Q Y L N I S E T A T		140
CATCCTTTGTTTAGCCCAGAATTAGAGAGACAAATGGGCTATAAGATTAATAATATTTTA	480	
H P L F S P E L E R Q M G Y K I N N I L		160
TGTATGCCTGTCGTTAGTAGCAAAGATCAAATTTGTCGCAGTAGTACAATTAGCTAATAAG	540	
C M P V V S S K D Q I V A V V Q L A N K		180
ACAGGAAATATACCCTTCAATCGAAATGATGAAGAGTCTTTTCGTGATTTTGCTGCTTCT	600	
T G N I P F N R N D E E S F R D F A A S		200
ATTGGGATTATTTTAGAAACCTGTCAATCTTTTTATGTTGCAGCTCGCAATCAACGGGGA	660	
I G I I L E T C Q S F Y V A A R N Q R G		220
GTCACAGCACTTTTACGCGCTACTCAAACACTAGGGCAAAGTTTAGATTTAGAGGCTACT	720	
V T A L L R A T Q T L G Q S L D L E A T		240
TTGCAAATAGTGATGGAACAAGCCCGAATTTTGATGCAGGCAGACCCGAGCACATTATTT	780	
L Q I V M E Q A R I L M Q A D R S T L F		260
CTGTATCGCAAAGAAATGGGCGAACTCTGGACTAAAGTAGCAGCAGCAGATAACCACA	840	
L Y R K E M G E L W T K V A A A A D T T		280
CAGTTAATAGAAATTCGGATTCCGGCGAATCGCGGTATTGTGCGCTATGTGGCATCTACA	900	
Q L I E I R I P A N R G I V G Y V A S T		300
GGCGATGCGCTGAATATCTCTGATGCTTATAAAGACCCCGGTTTGATCCAACAACAGAC	960	
G D A L N I S D A Y K D P R F D P T T D		320
AGAAAAACAGGCTATTTGACCAGAAATATTTTGTGTTTGCCAATCTTTAATTCAGCCAAT	1020	
R K T G Y L T R N I L C L P I F N S A N		340
GAATTGATCGGAGTAACACAGTTAATTAATAAGCAACAAGGAAGTTTACGGCTTCTGAT	1080	
E L I G V T Q L I N K Q Q G S F T A S D		360
GAAGAGTTTATGCGGGCTTTTAATATTCAAGCCGGAGTTGCTTTAGAAAATGCTCGTTTA	1140	
E E F M R A F N I Q A G V A L E N A R L		380
TTTGAAAATGTATTACTAGAAAAACAATATCAAAAAGACATTTTACAAAGCTTGTTCAGAT	1200	
F E N V L L E K Q Y Q K D I L Q S L S D		400
GCTGTAATTTCTACAGATATGGCCGGGAGAATTGTCACAATTAATGATGCAGCCTTGAA	1260	
A V I S T D M A G R I V T I N D A A L E		420

TTACTCGGTTGTCCTTTAGGTGATGCTAATCATAAAAAGTAATAAGCTGCTGTGGGAACAA	1320	
L L G C P L G D A N H K S N K L L W E Q		440
AATTTAATTGGTCGCGTAGTTTTGGGAAATTGTACCAATTGAAAATTTGCAGATGCGCTTA	1380	
N L I G R V V W E I V P I E N L Q M R L		460
GAAGATAGTTTAAAAAGTGGTGCTAAACATTATGTGCCAGAACAAGTTTGATAGTGGGA	1440	
E D S L K S G A K H Y V P E Q S L I V G		480
ATTTATCAATTACAAATGTCTGAAAGTCGGGTTTTGCATGAAACTCAAGACTACTCTATT	1500	
I Y Q L Q M S E S R V L H E T Q D Y S I		500
TTGACAGTACGCGATCGCATCAACCCAGATATTTTTCTCCCCTGGAATTTACCCCAAACC	1560	
L T V R D R I N P D I F L P W N L P Q T		520
CCCCAGTCGCAATTTATCACCCCGGAAGAAGTACAAATCTTAGAACGCAGTATTAATCTT	1620	
P Q S Q F I T P E E V Q I L E R S I N L		540
ACCGTTAATCCTTTGACGAACCCAGAAGGCGGTGTCCTGGTGGTTTGGTAGTTTTGGAA	1680	
T V N P L T N P E G G V R G G L V V L E		560
GATATTAGTCAAGAGAAGCGCCTCAAAACTACTATGTATCGCTACCTTACACCCCATGTA	1740	
D I S Q E K R L K T T M Y R Y L T P H V		580
GCTGAACAGGTAATGGCTTTAGGGGAAGATGCCTTAATGGTTGGTGAACGCAAGGAGGTG	1800	
A E Q V M A L G E D A L M V G E R K E V		600
ACTGTTTTATTTTCAGATATCCGAGGCTACACCACACTTACGGAAAATCTAGGTGCGGCT	1860	
T V L F S D I R G Y T T L T E N L G A A		620
GAAGTGGTATCACTCCTGAACCAATATTTTTGAAAACAATGGTTGAAGCAGTTTTCAACTAT	1920	
E V V S L L N Q Y F E T M V E A V F N Y		640
GAAGGCACACTGGATAAATTTATCGGTGATGCTTTAATGGCTGTTTTTGGTGCGCCACTA	1980	
E G T L D K F I G D A L M A V F G A P L		660
CCACTCACAGAAAATCATGCTTGGCAAGCAGTACAGTCAGCATTAGATATGCGCCAACGC	2040	
P L T E N H A W Q A V Q S A L D M R Q R		680
CTGAAGGAATTTAACCAACGACGCATCATTCAGCCACAACCACAAAATCAAAATCGGTATT	2100	
L K E F N Q R R I I Q P Q P Q I K I G I		700
GGTATTAGTTCTGGAGAAGTAGTTTCTGGTAACATCGGTTCTCACAAGCGTATGGATTAC	2160	
G I S S G E V V S G N I G S H K R M D Y		720
ACAGTCATTGGTGATGGTGTGAATTTAAGTTCCCCTGGGAAACTGTCACCAAAGAATAT	2220	
T V I G D G V N L S S R L E T V T K E Y		740
GGCTGTGATATTATCCTCAGTGAGTTTACTTACCAATTATGCAGCGATCGCATTTGGGTA	2280	
G C D I I L S E F T Y Q L C S D R I W V		760
CGTCAGTTAGATAAAATCCGAGTCAAAGGGAAACACCAAGCTGTCAATATCTATGAGTTG	2340	
R Q L D K I R V K G K H Q A V N I Y E L		780
ATTAGCGATCGCAGTACTCCCTTAGATGACAACACCCAAGAGTTCCCTCTTCACTATCAT	2400	
I S D R S T P L D D N T Q E F L F H Y H		800
AATGGTCGGACTGCCTACTTAGTCCGCGATTTTACCCAGGCGATCGCTTGTTTTAACTCA	2460	
N G R T A Y L V R D F T Q A I A C F N S		820
GCTAAACATATTCGACCCACAGACCAAGCTGTCAATATTCACCTAGAACGCGCCTACAAT	2520	
A K H I R P T D Q A V N I H L E R A Y N		840
TATCAACAAACTCCACCACCTCCTCAATGGGACGGCGTATGGACAATTTTCACAAAGTAG	2580	
Y Q Q T P P P P Q W D G V W T I F T K .		859

Fig. 3-1: DNA- und AS-Sequenz von CyaB1. Die fettgedruckten AS wurden mutiert. Die dazu verwendeten und evtl. *silent* einmutierten Schnittstellen befinden sich an den unterstrichenen Sequenzen. Für CyaB1_{RattenGAF} wurde die *SfiI*-Schnittstelle eingeführt. Die Ratten-GAF Domäne beginnt mit E207.

Von PD Dr. J. Linder wurde das Gen für CyaB1 nach mehreren Subklonierungsschritten in *pBluescriptII SK(-)* in die *BamHI* und *SmaI* Schnittstellen der MCS von *pQE30* eingesetzt und VP312,6 K3¹⁵ genannt (Fig. 3-2).

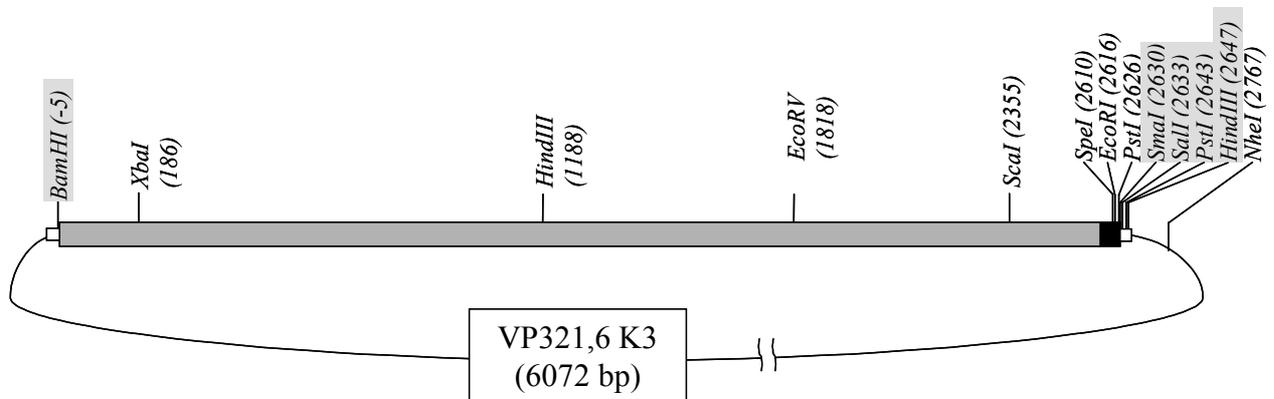


Fig. 3-2: Übersicht über VP321,6 K3. Die Nummerierung der Schnittstellen ist relativ zu CyaB1 (grauer Kasten). Hinter dem Stop von CyaB1 wurden klonierungsbedingt 26 bp genomische Anabaena Sequenz und 21 bp Polylinker aus pGEM-Teasy (schwarzer Kasten) mitgeführt. Durch Klonieren in die MCS von *pQE30* (weißer Balken, Schnittstellen grau hinterlegt) verlängert sich die Primärstruktur aller exprimierten Proteine N-terminal um: MRGSHHHHHHGS.

3.9.1 CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ und Mutanten

3.9.1.1 CyaB1₅₉₅₋₈₅₉

Per PCR wurde von PD Dr. J. Linder mit den *Primern* (ANCB)1s4 und (ANCB)1as aus dem Originalklon von Ohmori ein Gen-Fragment amplifiziert, das für CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ codiert und von zwei *BamHI*-Schnittstellen flankiert ist. Über diese wurde es in die MCS von *pQE30* eingefügt und der Klon F4 genannt (Fig. 3-3).

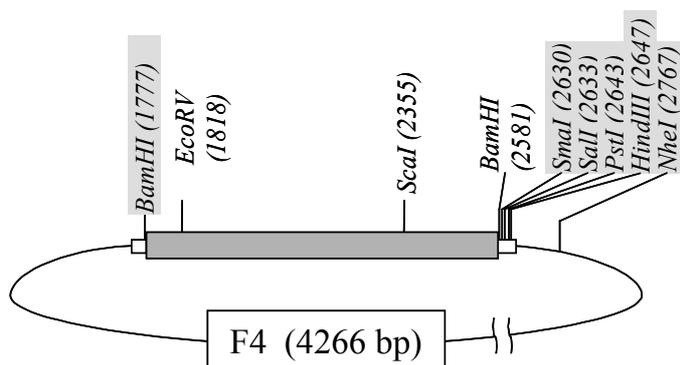


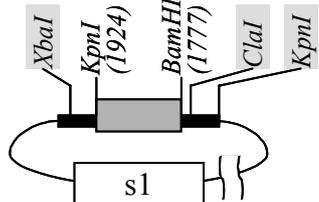
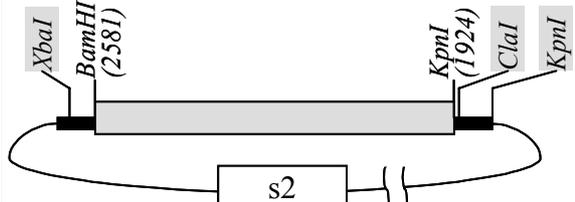
Fig. 3-3: Übersicht über F4 (grauer Balken codiert für CyaB1₅₉₅₋₈₅₉). Die Nummerierung der grau hinterlegten Schnittstellen der MCS von *pQE30* (weißer Balken) ist relativ zu CyaB1.

¹⁵ VP321,6 wurde von mir im Laborjournal als J3 bezeichnet.

3.9.1.2 *CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646A¹⁶/-K646E/-K646Q/-D650A¹⁷* und *-D650S*

Mit Mutagenese-Primern wurden in einer PCR mit VP321,6 K3 als Template die Subklone s1-s6 mit einer silent eingeführten *KpnI*-Schnittstelle hergestellt. Die PCR-Fragmente wurden nach Klenow Verdau in *EcoRV* geschnittenen *pBluescriptII SK(-)* einligiert, in *E. coli X11blueMRF'* subkloniert und sequenziert (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Subklone mit silent eingeführter *KpnI* (1924)-Schnittstelle. Unmutierte *CyaB1*-DNA ist grau dargestellt. Mutierte *CyaB1*-DNA ist hellgrau dargestellt. Die MCS von *pBluescriptII SK (-)* ist als schwarzer Balken dargestellt.

Klon	Primer	Größe (bp/AS)	AS-Mutation	Orientierung des Inserts in <i>pBluescriptII SK(-)</i>
s1	Kpn as (ANCB)1s4	157 G595-G642	-	
s2	Kpn A646s (ANCB)1as	667 T643-K859	K646A	
s3	Kpn E646s (ANCB)1as	wie s2	K646E	wie s2
s4	Kpn Q646s (ANCB)1as	wie s2	K646Q	wie s2
s5	Kpn A650s (ANCB)1as	wie s2	D650A	wie s2
s6	Kpn S650s (ANCB)1as	wie s2	D650S	wie s2

Aus s1 und s2 wurde F1 kloniert und über die *BamHI*-Schnittstellen das Gen für *CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646A* in *pQE30* umklontiert (Fig. 3-4). Analog dazu wurden mit s3, s4, s5 oder s6 anstelle von s2 die Plasmide *CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646E/-K646Q* und *CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A/-D650S* kloniert.

¹⁶ Im Laborjournal auch als K1 bezeichnet

¹⁷ Im Laborjournal auch als K2 bezeichnet

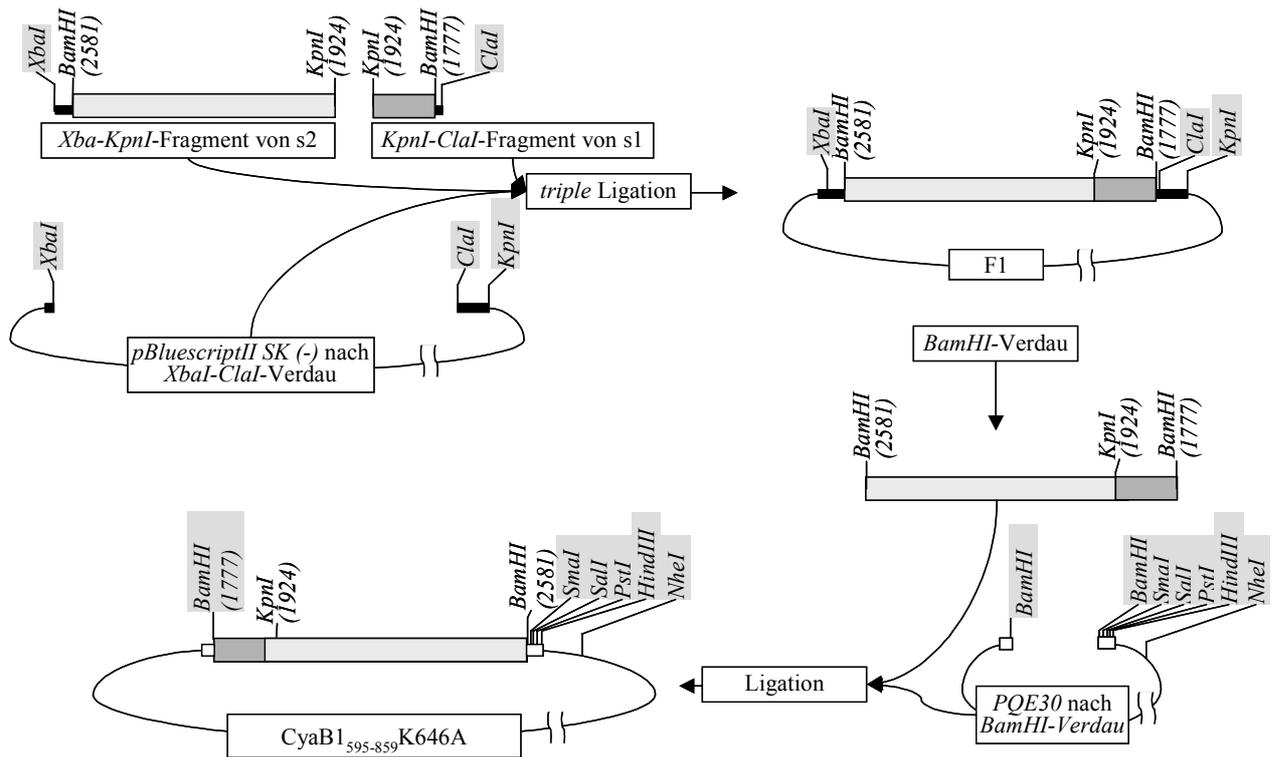


Fig. 3-4: Klonierungsschema für CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646A. Beschriftung und Schattierung wie für Fig. 3-3 und Tab. 3-1.

3.9.1.3 CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728A¹⁸/-N728T und -R732A¹⁹

Analog zu Abschnitt 3.9.1.2 wurde per PCR mit Mutagenese-Primern die Subklone s7, s8, s9 und s10 mit einer silent *XhoI*(2197)-Schnittstelle hergestellt (Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Konstrukte mit *XhoI*-Schnittstelle

Klon	Primer	Größe (bp/AS)	AS-Mutation	Orientierung des Inserts in <i>pBluescriptII SK(-)</i>
s7	Xho s (ANCB)1as	394 L733-K859	-	
s8	XhoA728 as neu (ANCB)1s4	432 G595-R732	N728A	
s9	XhoT728as (ANCB)1s4	wie s8	N728T	wie s8
s10	XhoA732 as neu (ANCB)1s4	wie s8	R728A	wie s8

¹⁸ Im Laborjournal auch als K3 bezeichnet

¹⁹ Im Laborjournal auch als K4 bezeichnet

Aus s7 und s8 wurde F3 kloniert und über die *Bam*HI-Schnittstellen das Gen für CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728A in *pQE30* umkloniert (Fig. 3-5). Analog zu diesem Schema wurden mit s9 oder s10 anstelle von s8 die Plasmide CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728T und -R732A kloniert.

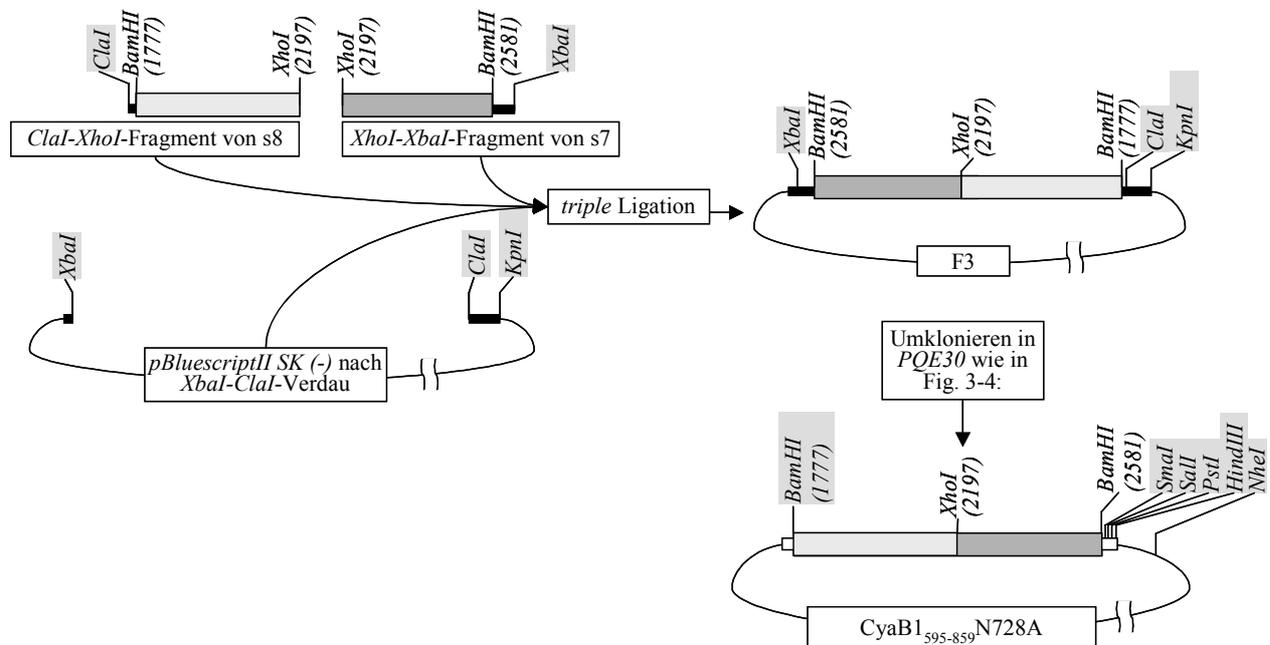


Fig. 3-5 Klonierungsschema für CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728A. Beschriftung und Schattierung wie in Fig. 3-3 und Tab. 3-2

3.9.1.4 CyaB1₅₉₅₋₈₅₉T721A/-D719A

Die Subklone s11, s12, und s13 mit silent eingeführten *Hpa*I(2181)-Schnittstellen wurden analog zu Abschnitt 3.9.1.2 per PCR mit Mutagenese-Primern hergestellt (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Konstrukte mit *Hpa*I-Schnittstelle

Klon	Primer	Größe (bp/AS)	AS-Mutation	Orientierung des Inserts in <i>pBluescriptII SK(-)</i>
s11	HPA s (ANCB)1as	401 N728-K859	-	
s12	HPA A719as (ANCB)1s4	387 G595-V727	D719A	
s13	HPA A721as (ANCB)1s4	wie s12	T721A	wie s12

Die weitere Klonierung zu dem Plasmid CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D719A war wie in Fig. 3-4 mit dem *ClaI-HpaI*-Fragment von s11 anstelle des *ClaI-KpnI*-Fragments von s1 und dem *XbaI-HpaI*-Fragment von s12 anstelle des *XbaI-KpnI*-Fragments von s2. Ebenso wurden mit s13 anstelle von s12 das Plasmid CyaB1₅₉₅₋₈₅₉T721A geschaffen.

3.9.2 C-terminale Holoenzymverkürzungen

3.9.2.1 CyaB1₅₉₅₋₇₈₆²⁰ und CyaB1₇₈₆₋₈₅₉ in *pIVEX2.4c*²¹

Der Klon VP329A4/3²² ist analog zu F4, hat aber nach T786 ein Stopcodon eingefügt, dem die *BamHI*(2362) Schnittstelle folgt. Für die Coexpression im *RTS 500* wurden die für CyaB1₅₉₅₋₇₈₆ (katalytische Domäne) und für CyaB1₇₈₆₋₈₅₉ (TPRL-Domäne) codierenden Gene aus VP329A4/3 und F4 in *pIVEX2.4c* umklontiert (siehe Fig.3-6 A und B).

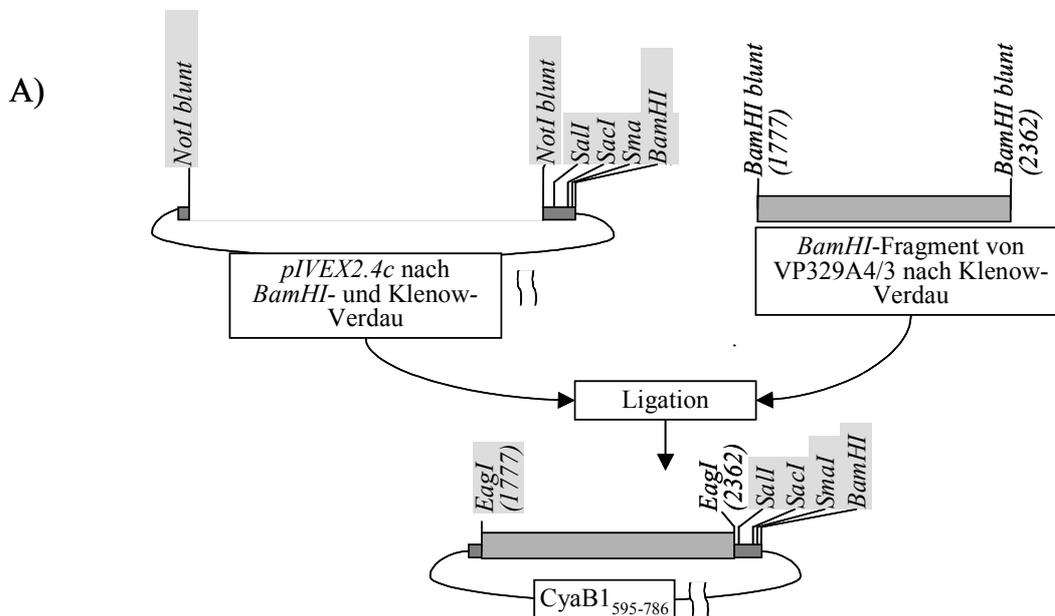


Fig.3-6 A: Klonierungsschema für CyaB1₅₉₅₋₇₈₆. Nach Glätten der DNA-Enden und Ligieren in die MCS von *pIVEX2.4c* (dunkelgrauer Balken) wurden die *BamHI*- und *NotI*-Schnittstellen in *EagI*-Schnittstellen umgewandelt und N-terminal die AS-Sequenz MRGSH₆SSGIEGRGRS angefügt.

²⁰ Auch als Anacat*pIVEX* bezeichnet

²¹ Auch als TPRL*pIVEX* bezeichnet

²² Von PD Dr. J. Linder zur Verfügung gestellt

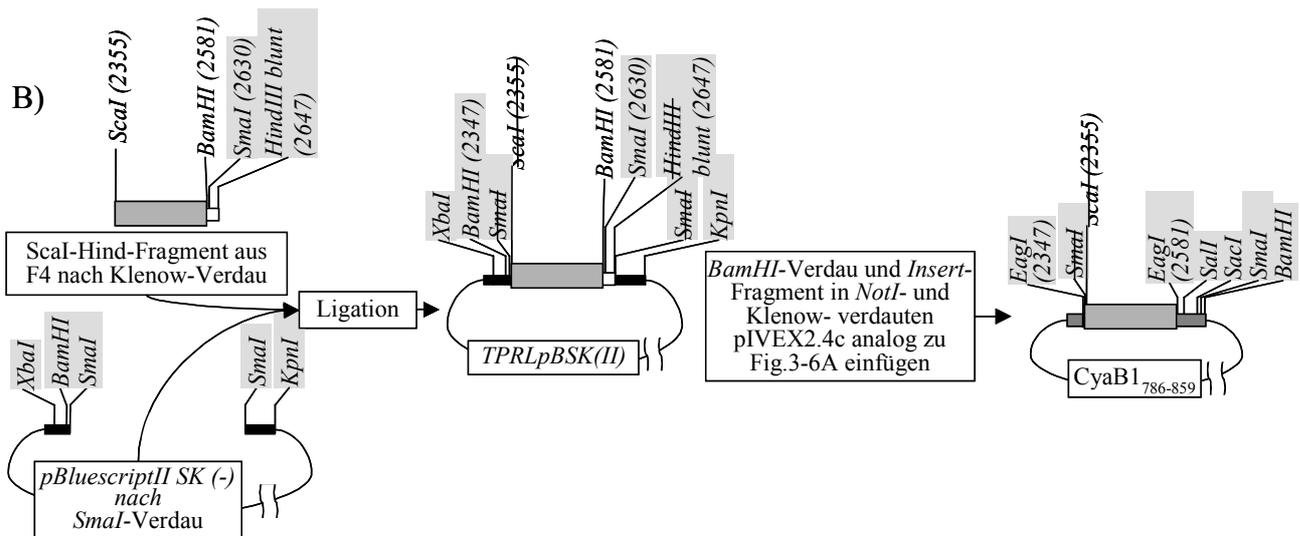


Fig.3-6 B: Klonierungsschema für CyaB1₇₈₆₋₈₅₉. Die ScaI-, HindIII- und SmaI-Schnittstellen gingen beim Glätten der DNA-Enden und Ligieren in die MCS von pBluescriptII SK(-) (weißer Kasten) verloren. Aus BamHI und NotI-Schnittstellen wurden beim Umklonieren in pIVEX2.4c EagI-Schnittstellen und N-terminal wurde die AS-Sequenz MRGSH₆SSGIEGRGRSP angefügt.

3.9.2.2 CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa1²³ und CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa2²⁴

Mit Mutagenese-Primern wurden analog zu 3.9.1.2 die Subklone s14 und s15 unter Verwendung der ScaI(2355)-Schnittstelle hergestellt (Tab. 3-4).

Tab. 3-4: Konstrukte mit eingeführter Faktor-Xa Protease-Schnittstelle

Klon	Primer	Größe (bp/AS)	AS-Mutation	Orientierung des Inserts in pBluescriptII SK(-)
s14	FXa as (ANCB)1s4	580 G595-T786	S782G D783R	
s15	FXa2 s (ANCB)1as	234 T786-K859	D789I D790E N791G T792R	

Aus dem ScaI-HindIII-Fragment von s14 wurde mit dem ScaI-BamHI(2581)-Fragment von F4 das Plasmid für CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa1 generiert (Fig.3-7). Analog dazu wurde mit dem ScaI-HindIII-

²³ Auch als Xa bezeichnet

²⁴ Auch als Xa2 bezeichnet

Fragment von s15 und dem *ScaI*-*Bam*HI(1777)-Fragment von F4 der Klon Xa2pBSKII und daraus *Cya*B1₅₉₅₋₈₅₉Xa1 generiert.

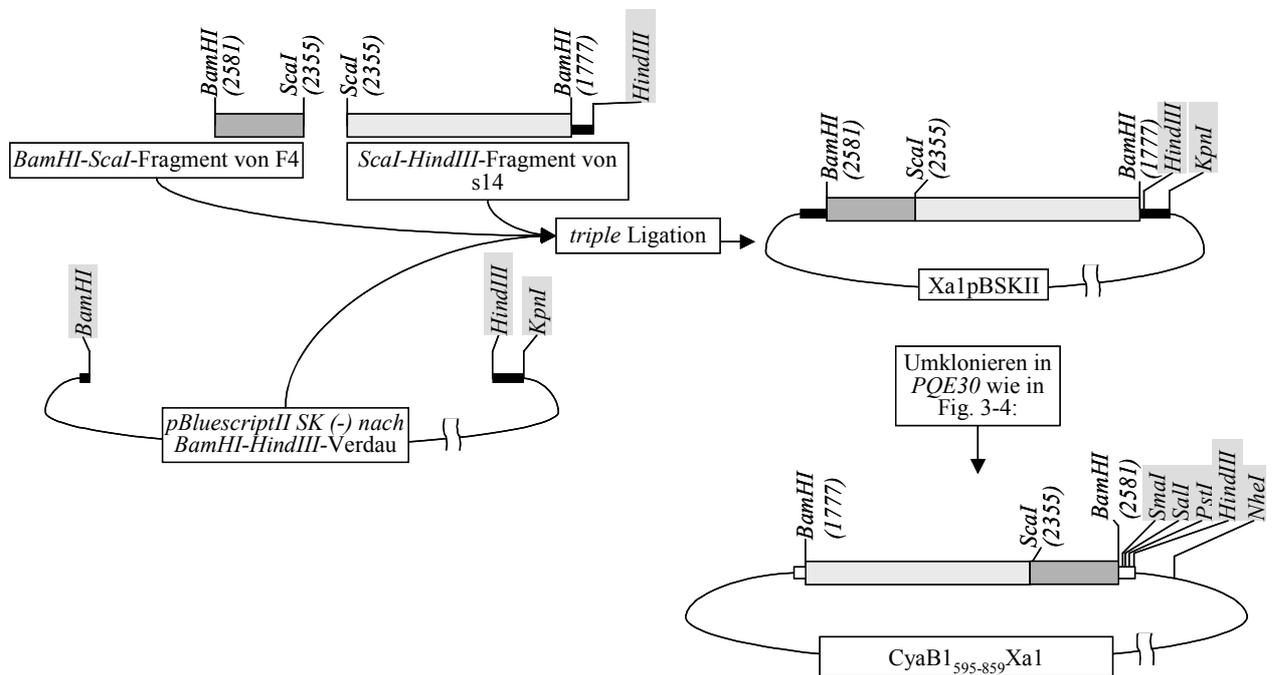


Fig.3-7: Klonierungsschema für *Cya*B1₅₉₅₋₈₅₉Xa1. *Cya*B1₅₉₅₋₈₅₉Xa2 wurde analog aus dem *Sca*I-*Hind*III-Fragment von s15 und dem *Sca*I-*Bam*HI(1777)-Fragment von F4 kloniert. Beschriftung und Schattierung wie in Fig.3-3 und Tab. 3-4

3.9.2.3 *Cya*B1₁₋₅₈₉²⁵

Mit dem *pBluescript*II SK(-)-Klon VP360,2 Klon 7²⁶, der ein *Cya*B1-Fragment von der *Hind*III (1188)-Schnittstelle (bei S397) bis zu einer nach E589 eingefügten *Bam*HI (1768)-Schnittstelle enthält, wurde *Cya*B1₁₋₅₈₉ über die Zwischenstufe VP360STOP generiert (Fig.3-8).

²⁵ Im Laborjournal als AR (Anabaena Regulator) bezeichnet

²⁶ Von PD Dr. J. Linder zur Verfügung gestellt

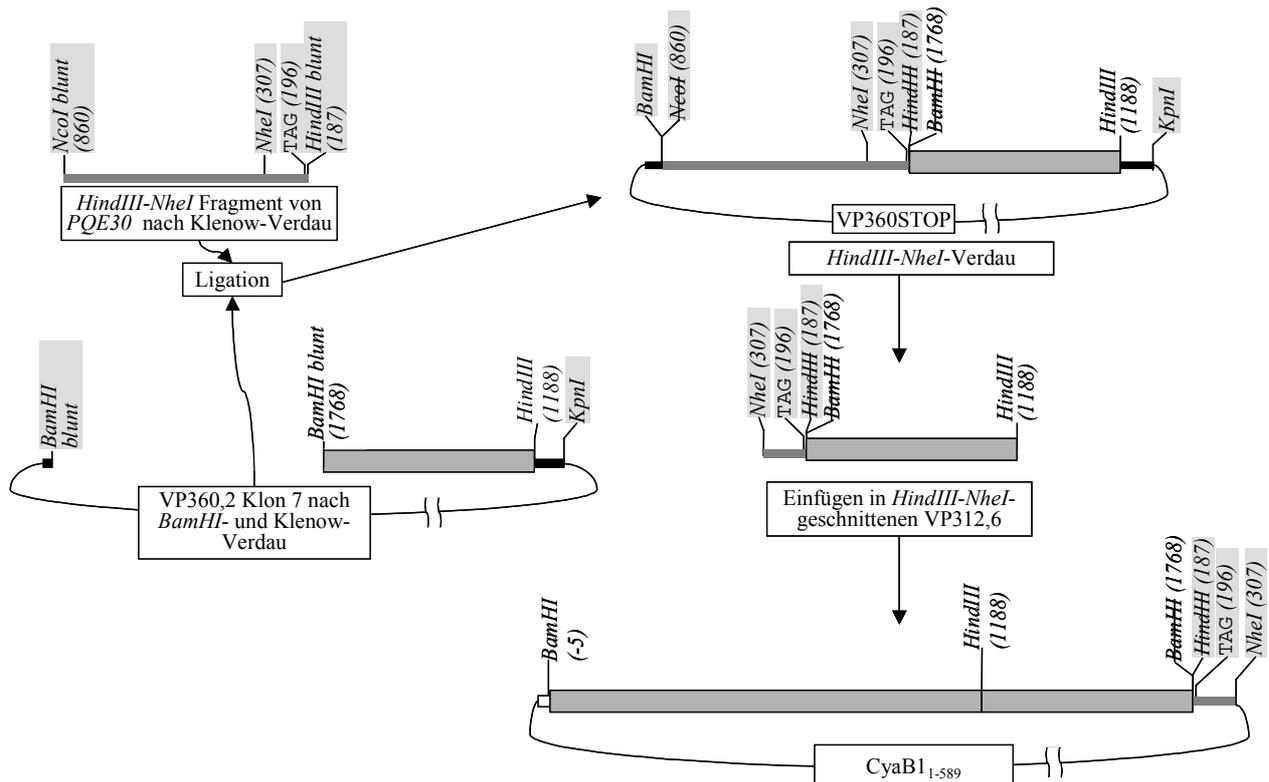


Fig.3-8: Klonierungsschema für CyaB₁₋₅₈₉. Die Nummerierung der Vektor-Schnittstellen (grau hinterlegt) und des Stopcodons (TAG) ist relativ zu *pQE30* (graue Linie), während die *BamHI* (1768)- und *HindIII* (1188)-Schnittstelle relativ zu CyaB₁ (grauer Balken) nummeriert sind. Klonierungsbedingt gingen die *Hind* (187)-, *NcoI* (860)- und *BamHI*(1768)-Schnittstellen verloren und nach E589 wurden die AS(n) GSA vor dem Stopcodon eingeführt.

3.9.3 Mutationen des Holoenzym

3.9.3.1 CyaB_{1D650A/-N728A} und *-R732A*

Aus CyaB_{1595-859D650A} wurde über die *EcoRV*(1818)- und die *NheI*(2767)-Schnittstelle das mutationstragende Fragment ausgeschnitten und in VP321,6 K3 gegen das unmutierte Fragment ausgetauscht (Fig. 3-9). Entsprechend wurde für CyaB_{1595-859N728A} und CyaB_{1595-859R732A} verfahren.

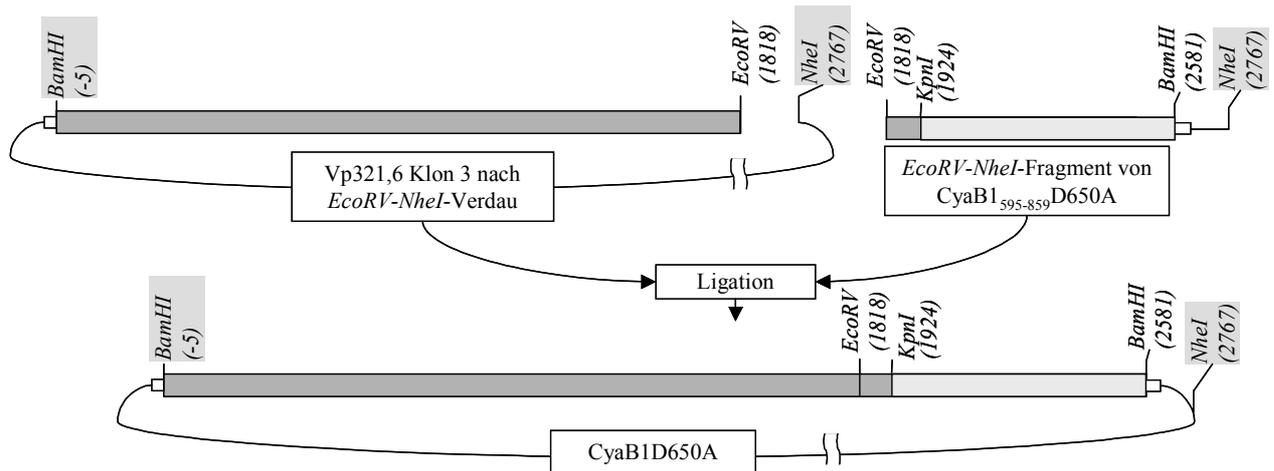


Fig. 3-9: Klonierungsschema für CyaB1D650A. Beschriftung und Schattierung wie in Fig.3-3 und Tab. 3-1.

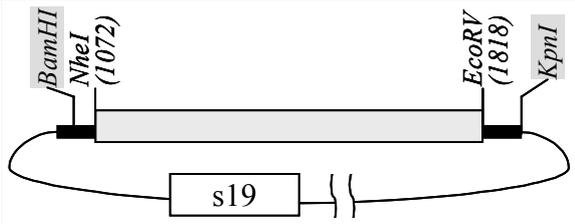
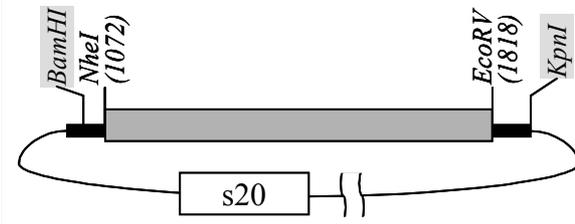
3.9.3.2 CyaB1D190A/-D360A

Analog zu 3.9.1.2 wurden per PCR mit Mutagenese-Primern und VP321,6 K3 als Template die Subklone s16-s20²⁷ mit *PinA1*(541), *NheI*(1072)- (beide silent eingeführt) und *EcoRV*-(1818)-Schnittstellen hergestellt (Tab. 3-5).

Tab. 3-5: Subklone für die CyaB1D190A/-D360A Holoenzymmutanten

Klon	Primer	Größe (bp/AS)	AS-Mutation	Orientierung des Inserts in <i>pBluescriptII SK(-)</i>
s16	HoloBamHI s PinA1 as	562 M1-G182	-	
s17	Nhe as PinA1 wt s	536 T181-S359	-	
s18	Nhe as PinA1A190s	wie s17	D190A	

²⁷ Im Laborjournal wird s16 als 1c, s17 als 2a, s18 als 3r, s19 als 4_{35°C}e und s20 als 5c bezeichnet

s19	EcoRV as Nhe A360 s	729 A358-1607	D360A	
s20	EcoRV as Nhe wt s	wie s19	-	

Aus den Subklonen wurden die *pBluescriptII SK(-)*-Klone BE D190A und BE D360A generiert (Fig. 3-10 A und B) und über die *BamHI*(-5)- und *EcoRV*(1818)- Schnittstellen das mutierte Fragment in VP321,6 K3 eingesetzt, so dass CyaB1D190A bzw. CyaB1D360A entstand.

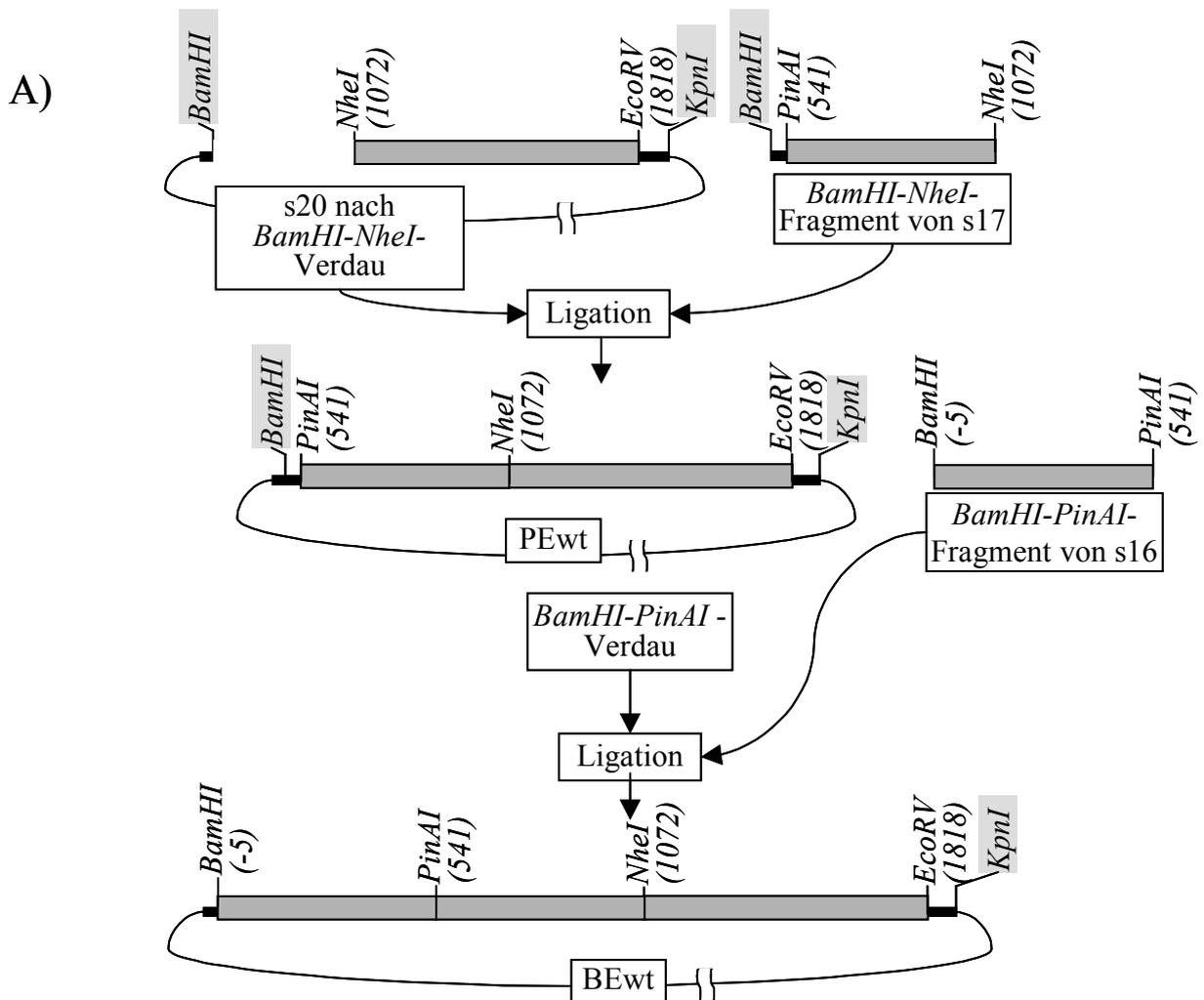


Fig. 3-10 A: Klonierungsschema für BEwt aus s16, s17 und s20

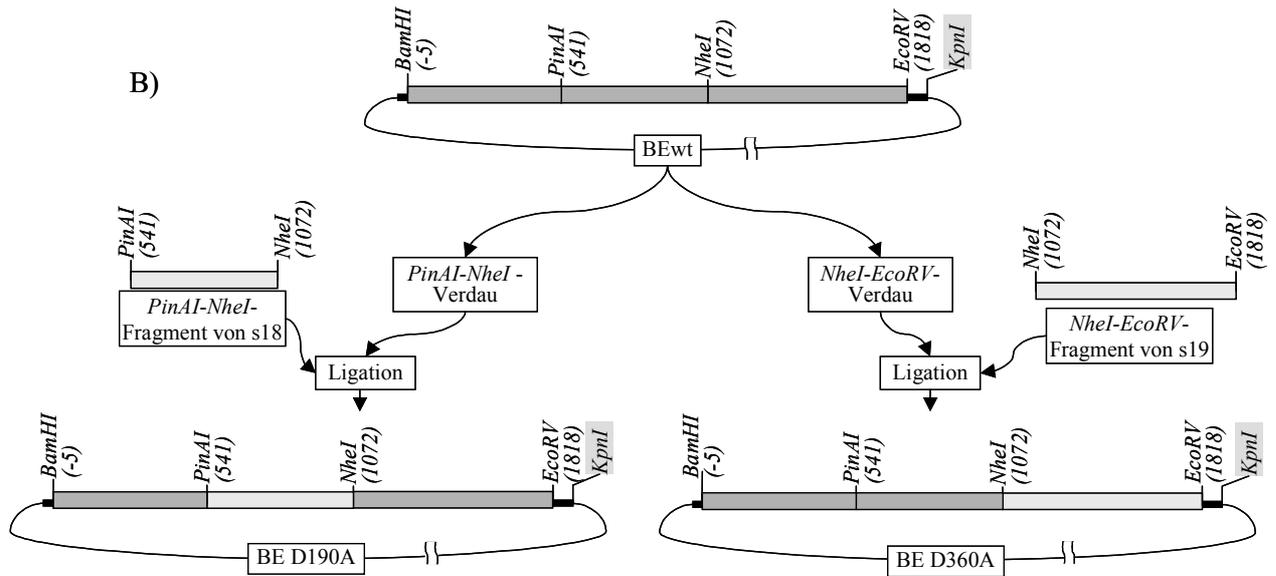


Fig. 3-10 B: Klonierungsschema für BE D190A und BE D360A die aus BEwt generiert wurden. Beschriftung und Schattierung wie in Fig. 3-3 und Tab. 3-5.

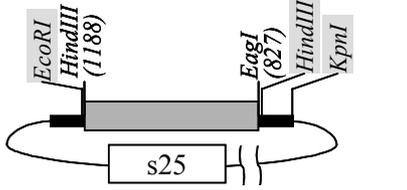
3.9.3.3 *CyaB1A275D/-Q175D*

Analog zu 3.9.1.2 wurden per PCR mit Mutagenese-Primern und VP321,6 K3 als Template die Subklone s21-s25²⁸ mit *MscI*-(329)-, *EagI*-(828)- (beide *silent* eingeführt) und der *HindIII*-(1188)-Schnittstelle hergestellt (Tab. 3-6).

Tab. 3-6: Subklone für die *CyaB1A275D/-Q175D* Holoenzymmutanten

Klon	Primer	Größe (bp/AS)	AS-Mutation	Orientierung des Inserts in <i>pBluescriptII SK(-)</i>
s21	HoloBamHI s Msc I wt as	326 M1-Q109	-	
s22	HoloBamHI s Msc I D105 as	wie s21	Q105D	
s23	Msc I s Eag wt as	511 G108-A277	-	

²⁸ Im Laborjournal wurde s21 als BM wt s, s22 als D105d, s23 als ME wt a, s24 als D275c und s25 als EH i bezeichnet.

s24	Msc I s Eag D275 as	wie s23	A275D	
s25	Hind as Eag I s	361 A276-S397	-	

Aus den Subklonen s22, s23 und s25 wurde BH D105 generiert (Fig. 3-11 A) und daraus CyaB1Q105D geschaffen (Fig. 3-11 B). Analog wurden das *MscI*-*EagI*-Fragment von s24 und das *EcoRI*-*EagI*-Fragment von s25 in *MscI*-*EcoRI* geschnittenen s21 zu BH D275 *triple*-ligiert und daraus CyaB1A275D hergestellt.

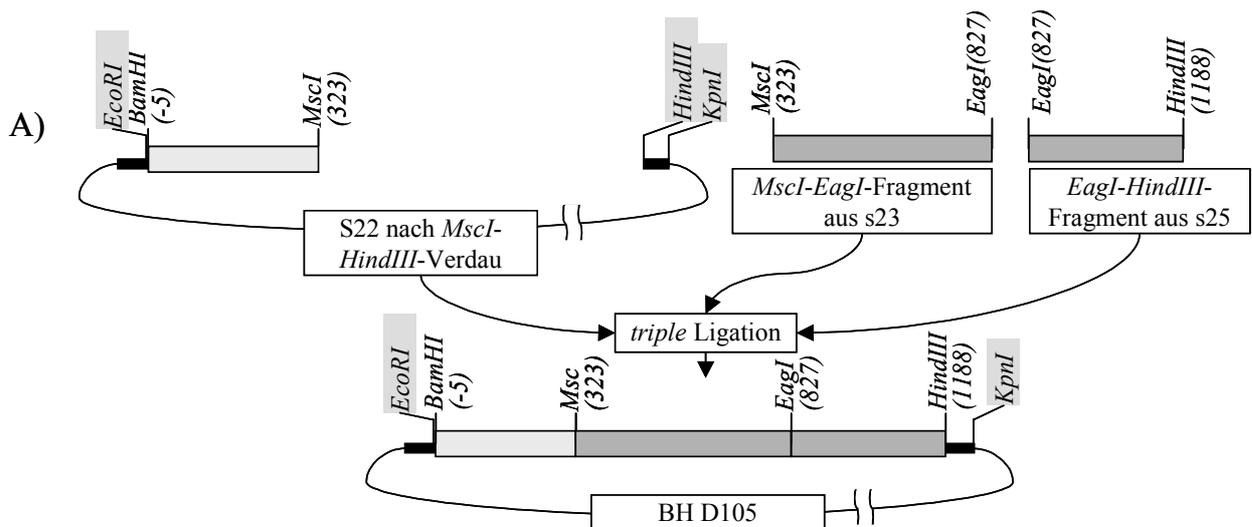


Fig. 3-11A: Klonierungsschema für BH D105. Beschriftung und Schattierung wie in Fig.3-3 und Tab.3-6.

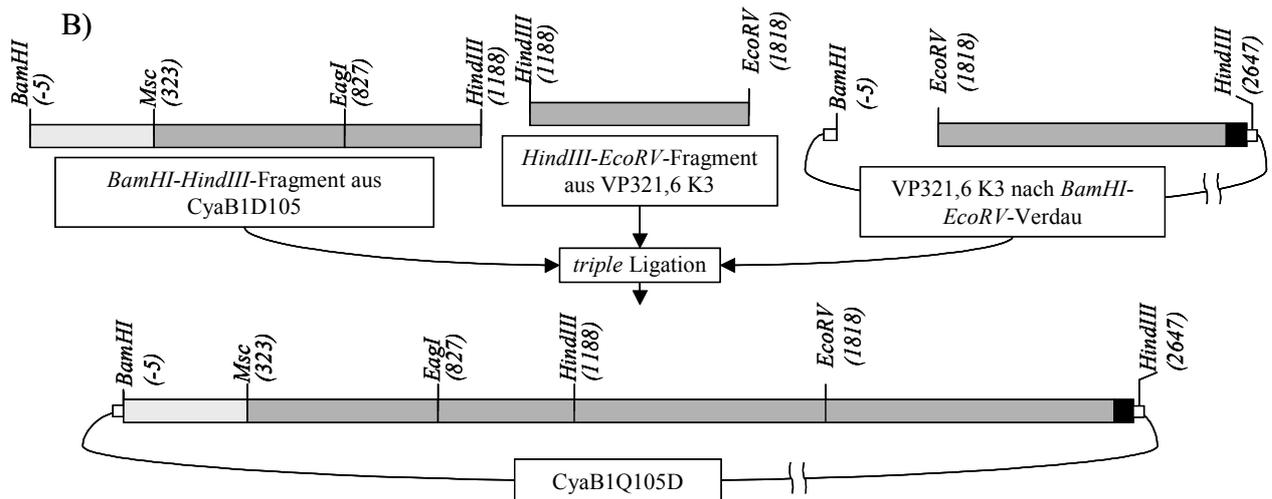


Fig. 3-11 B: Klonierungsschema für CyaB1Q105D. Beschriftung und Schattierung wie in Fig.3-3 und Tab.3-6.

3.9.3.4 CyaB1Δ-GAF-A/-Δ-GAF-B

Analog zu 3.9.1.2 wurden per PCR mit Mutagenese-Primern und VP321,6 K3 als Template die Subklone s26-s30 mit den *SfuI*(143), *XbaI*(703)-, *XhoI*(1156)- und der *HindIII*(1188)-Schnittstelle hergestellt (Tab. 3-7). Die *XbaI*(186)-Schnittstelle wurde entfernt. Es wurde ein *pBluescriptII SK(-)*-Konstrukt verwendet, bei dem in der MCS die *XbaI*- und die *SpeI*-Schnittstellen aufeinander ligiert und dadurch zerstört worden waren.

Tab. 3-7: Übersicht über die Konstrukte mit den eingeführten *SfuI*-, *XbaI*- und *XhoI*-Schnittstellen

Klon	Primer	Größe (bp/AS)	AS-Mutation	Orientierung des Inserts in <i>pBluescriptII SK(-)</i>
s26	HoloBamHI s anasfu as	147 M1-E49	Q49E	
s27	anasfu s anaxba as	565 E49-D236	Q49E	
s28	Anaxba s Anaxho as	491 L235-E387	Keine	

Aus s27 und s28 wurde SH Klon1 und daraus mit s26 und einem *Hind-SalI*-VP321,6 K3 Fragment der Klon Anabaena 1 generiert (Fig.3-12 A und B). Beim letzten Schritt wurde die *SalI*(2633)-Schnittstelle aus VP321,6 K3 auf die *XhoI*-Schnittstelle der MCS von *pBluescriptII SK(-)* ligiert und damit zerstört.

Aus Anabaena 1 wurden pBKIIΔGAF A und -ΔGAF B generiert (siehe Fig.3-12 C und D). Aus diesen wurde das für CyaB1Δ-GAF-B bzw. CyaB1Δ-GAF-A codierende DNA-Fragment über die *BamHI*(-5)- und *SmaI*(2630)-Schnittstellen in die MCS von *pQE30* eingesetzt.

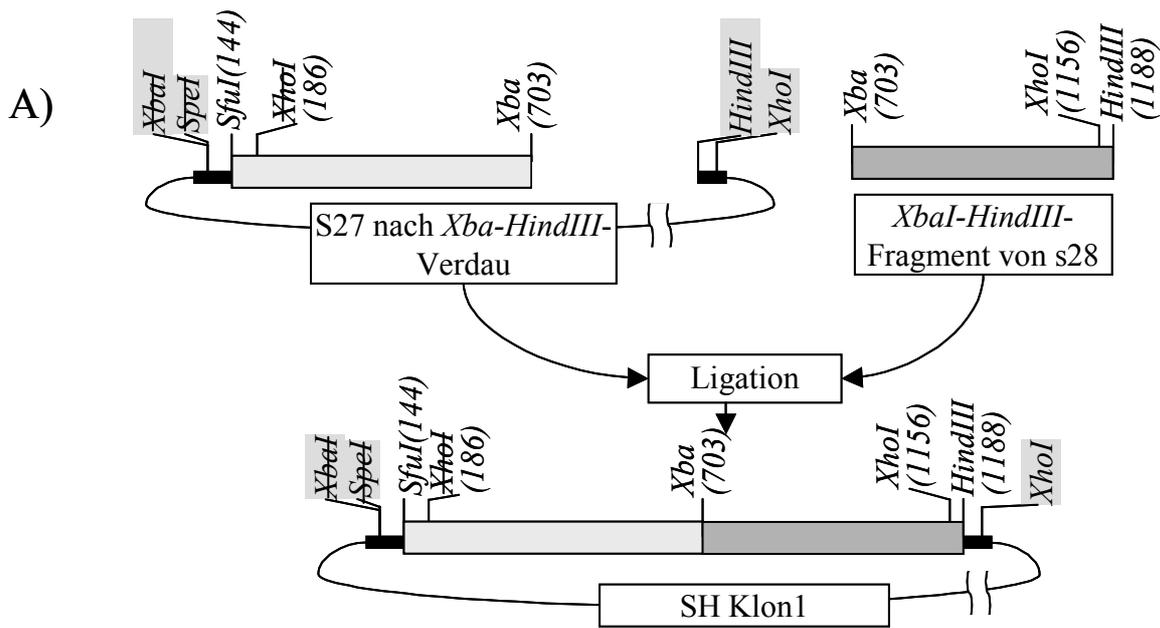


Fig.3-12 A: Klonierungsschema für SH Klon.

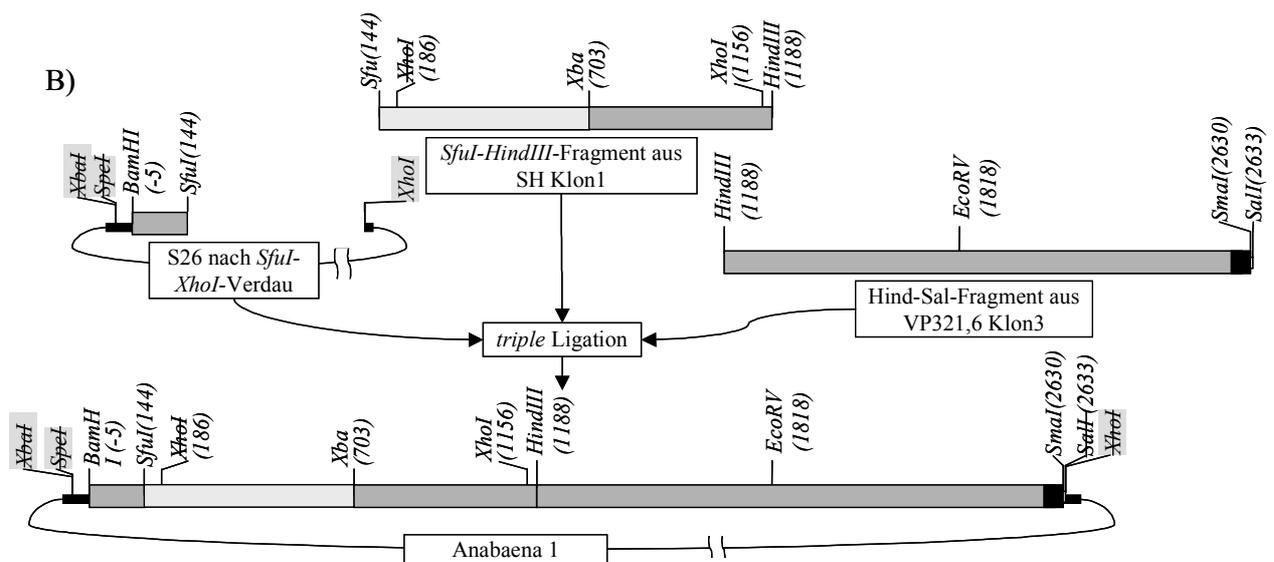


Fig.3-12 B: Klonierungsschema für Anabaena 1. Die Nummerierung der Schnittstellen von Anabaena 1 bezieht sich auf deren Position in CyaB1. Diese Nummerierung wurde auch in den Deletionskonstrukten beibehalten.

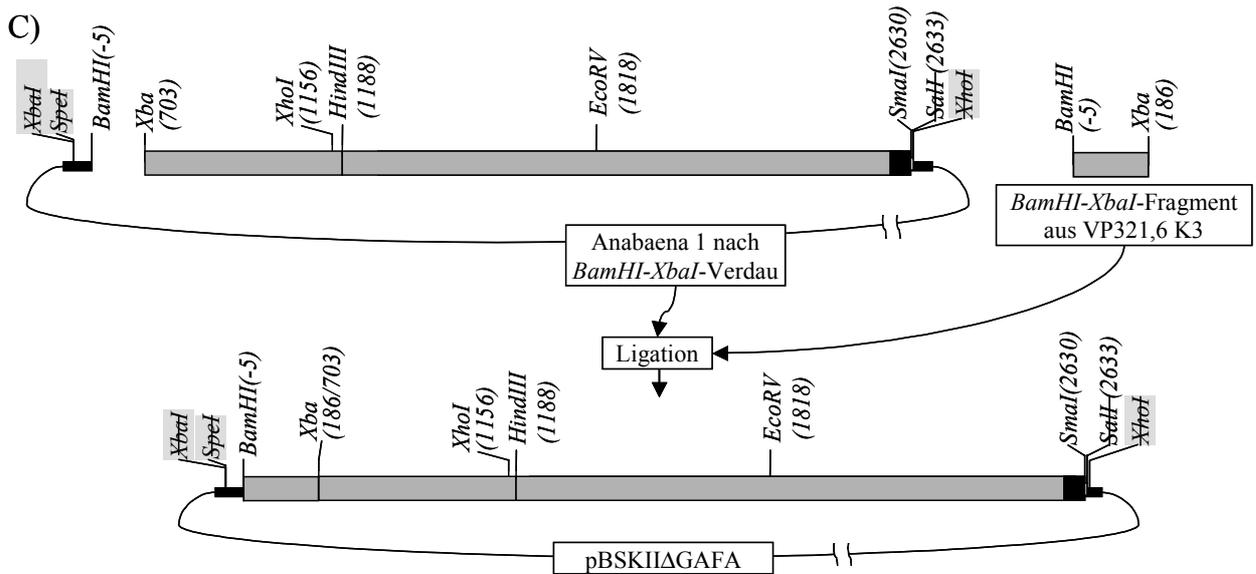


Fig.3-12 C: Klonierungsschema für pBSKIIΔGAF A geschaffen

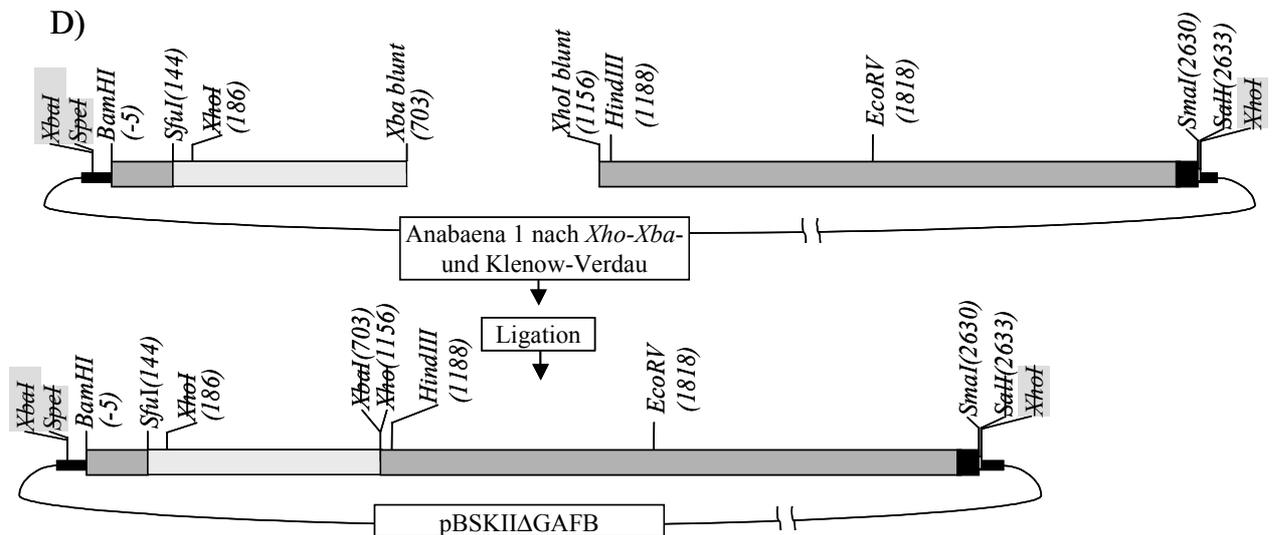


Fig.3-12 D: Aus Anabaena 1 wurde pBSKIIΔGAF B kloniert. Die Nummerierung der Schnittstellen ist wie in B)

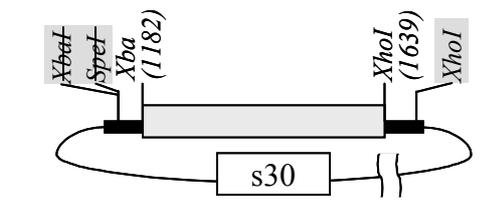
3.9.3.5 *CyaB*_{RattenGAF}²⁹

Analog zu Abschnitt 3.9.3.4, aber mit einer cDNA-Bank aus Ratten-Darm³⁰, wurden per PCR mit Mutagenese-Primern die Subklone s29 und s30 mit den eingeführten *Sfu*I-, *Xba*I- und *Xho*I-Schnittstellen hergestellt (Tab. 3-8).

²⁹ Auch als RAB bezeichnet

³⁰ Wurde von Dr. T. Seebacher zur Verfügung gestellt.

Tab. 3-8: Subklone mit Ratten GAF-A und B (hellgrau). Die Nummerierung der inserierten SfuI, XbaI und XhoI Schnittstellen ist relativ zur Ratten-PDE2 (Locus ID: 81743, Protein ID: NP_112341.1). Da die Ratten-GAF-A-Domäne mit E207 beginnt, kam es durch die Einführung der SfuI-Schnittstelle zu keiner Sequenzänderung. Da nach der CyaB1-GAF-B-Domäne die ASn LE folgen (XhoI-Schnittstelle), blieb beim Einfügen der mutierten Ratten-GAF-B die CyaB1-Sequenz unverändert.

Klon	Primer	Größe (bp/AS)	AS-Mutation	Orientierung des Inserts in <i>pBluescriptII SK(-)</i>
s29	mouse sfu neu s mouse xba as	571 D206-D396 (GAF-A)	keine	
s30	mouse xba s mouse xho as	454 L395-E548 (GAF-B)	E547L A548E	

Aus s29 und s30 wurde Chimäre1 konstruiert (Fig.3-13). Aus diesen wurde das chimäre DNA-Fragment über die *BamHI*(-5)- und *SmaI*(2630)-Schnittstellen analog zu Abschnitt 3.9.3.4 in die MCS von *pQE30* eingesetzt, so dass CyaB1_{RattenGAF} entstand.

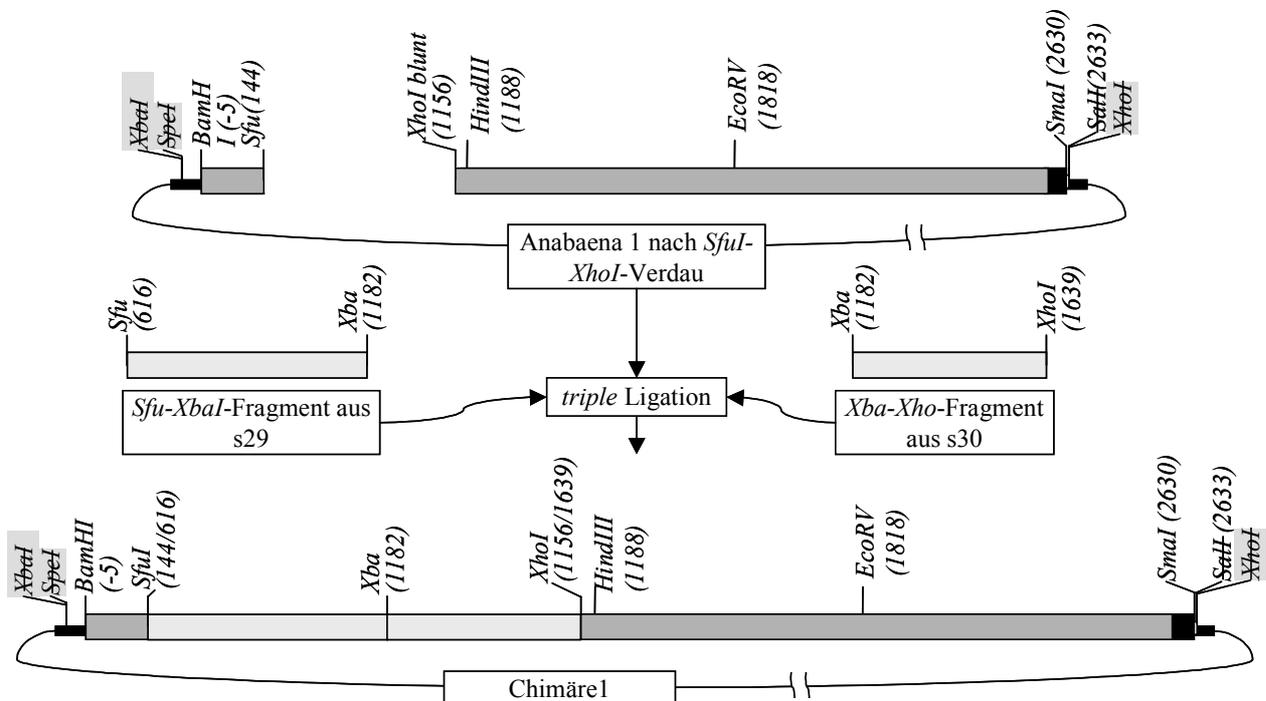


Fig.3-13: Klonierungsschema für Chimäre1. Die Nummerierung der Schnittstellen in der Ratten DNA (Rautenmuster) bezieht sich auf die Ratten-PDE-2 (LocusID:81743,Protein ID NP_112341.1).

3.9.3.6 *CyaB1_{mycocat}*³¹

Der Klon MycoCat³², enthält ein DNA-Fragment, das für die katalytische Domäne von Rv1625c (AS 204-443) codiert und über *Bam*HI- und *Sac*I-Schnittstellen in die MCS von *pQE30* eingesetzt wurde. Aus MycoCat und VP360,2 KLon7 wurde Clon B generiert (Fig. 3-14 A) aus dem das Chimäre DNA-Fragment in VP321,6 K3 eingesetzt wurde, so dass *CyaB1_{mycocat}* entstand (Fig.3-14 B).

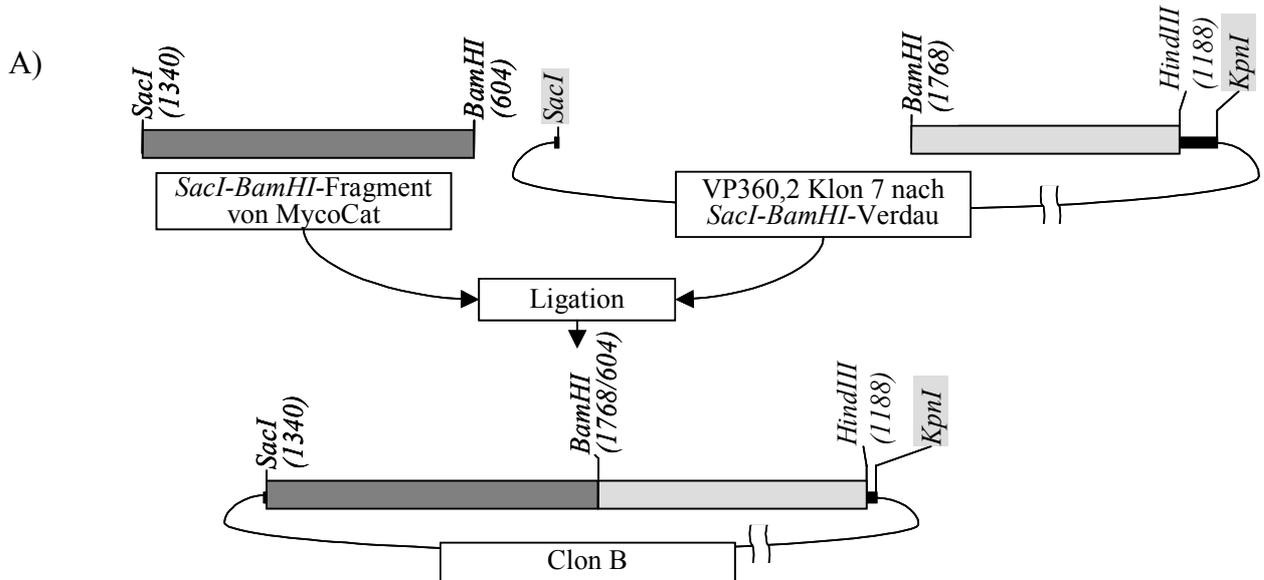


Fig.3-14 A: Klonierungsschema für Clon B. Die Nummerierung der AS bezieht sich auf die Lage im Ursprungsenzym. Bei Chimären Fragmenten (dunkelgrau für Rv1625c-Fragment) ist die Position relativ zu *CyaB1* (hellgrau) und des Ursprungproteins angegeben.

³¹ Auch als Anamyco bezeichnet

³² Wurde von Dr. Y. L. Guo zur Verfügung gestellt

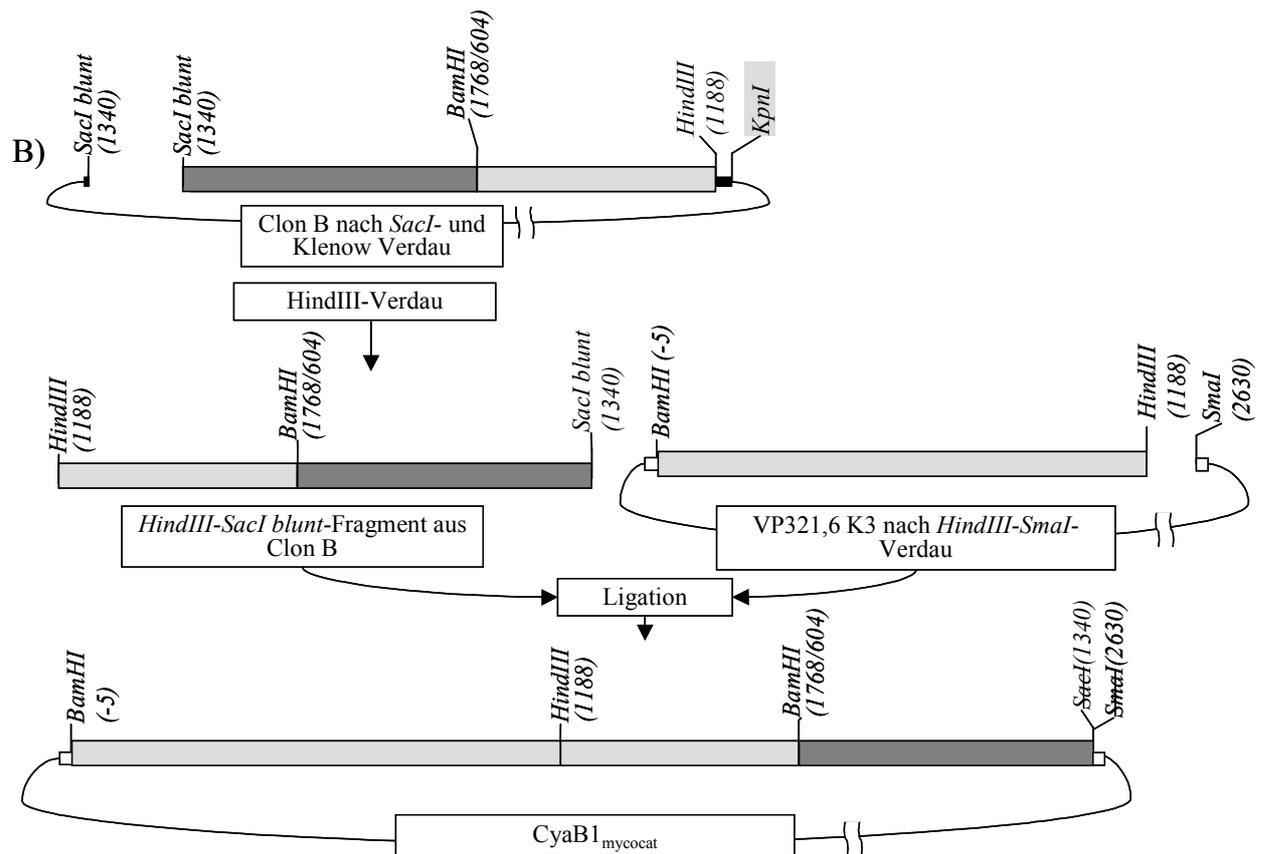


Fig.3-14 B: Klonierungsschema für *Cyab1_{mycocat}*. Die Nummerierung der AS und die Schattierung ist wie in A).

4 Ergebnisse

Das *Anabaena*-CyaB1-Gen codiert für ein Protein [SMART-Analyse (Letunic et al., 2002; Schultz et al., 1998)] mit zwei tandemartig verknüpften GAF-Domänen, einer PAS-Domäne und einer katalytischen AC-Domäne [Fig.4-1; (Ho et al., 2000; Katayama and Ohmori, 1997)]. Ein Abgleich mit der *Pfam*-Datenbank (Bateman et al., 2002) zeigt C-terminal eine TPR-ähnliche Domäne an. Ein Alignment der katalytischen Domäne mit der C1a-Domäne der ACV aus Hund zeigt 21 % Identität bzw. 31 % Ähnlichkeit und mit der C2-Domäne der ACII aus der Ratte 18 % Identität bzw. 31 % Ähnlichkeit (Fig.4-2). Damit ist CyaB1 eine Klasse-III-AC. Der Vergleich mit diesen Mammalia-ACn wurden wegen der verfügbaren Kristallstruktur gewählt (Tesmer et al., 1997). Man erkennt weiter, dass die für die Katalyse relevanten ASn in einer einzigen Domäne liegen, während sie in den Mammalia-ACn auf C1a- und C2 verteilt sind. Die Mammalia-ACn, deren katalytische Schleifen über eine C1b-Domäne und einen 6 TM-Bereich verbunden sind, funktionieren daher als Pseudoheterodimere, während bakterielle ACn als Homodimere katalytisch aktiv sind (Guo et al., 2001).

Das Alignment mit CyaC aus *S. aurantiaca* und Rv3645c aus *M. tuberculosis* (Fig.4-2) zeigt darüber hinaus Unterschiede, die für eine Gruppe bakterieller Klasse-III-ACn typisch sind. Das kanonische Aspartat (D1018 in ACII-C2), das über Wasserstoffbrücken an das N¹- bzw. N⁶-Atom des Adeninrings von ATP bindet, wie die Kristallstruktur vermuten lässt (Tang et al., 1995; Tesmer et al., 1997), ist durch Thr (T721 in CyaB1) ersetzt. Sequenzvergleiche mit vergleichbaren bakteriellen ACn zeigen eine drei AS lange Lücke in einem sonst konservierten FX₂FD-Motiv der C1a-Domäne aller Mammalia-ACn (in Fig.4-2 mit Balken markiert). Ebenso gibt es eine zusätzliche (variable) AS in einem hochkonservierten Block der C1a-Domäne (mit Pfeil markiert). Diese Längenvariationen müssen strukturell kompensiert werden, um die katalytischen Aminosäuren in der Tertiärstruktur richtig zu positionieren und den bekannten katalytischen Mechanismus zu ermöglichen. Daneben besteht die Möglichkeit eines neuartigen katalytischen Mechanismus. Für Untersuchungen in diese Richtung wurde CyaB1 zunächst ohne seine N-terminalen Domänen als CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ exprimiert.

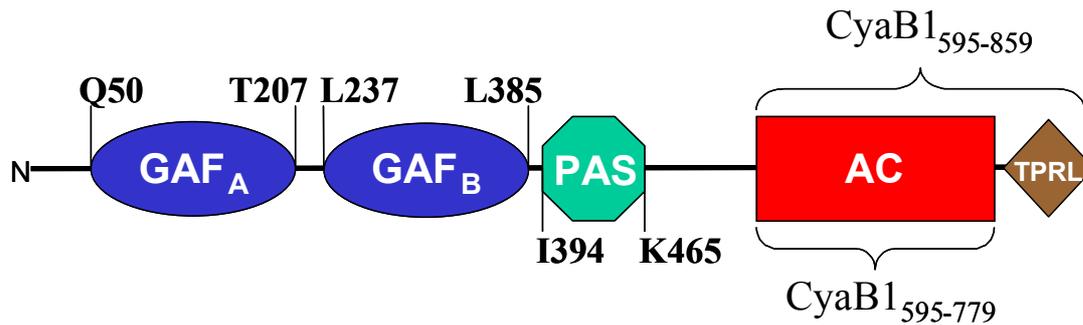


Fig.4-1: Übersicht über den modularen Aufbau von CyaB1. Es ist jeweils die entsprechende Position der Domänen und flankierenden AS angegeben.

cyaB1	: GERKEVTVLFSDIRGYTTL-TENLGAA---EVVSLLNQY---FETMVEAVFNYEGTLDKFIGD	650
StigAC	: GEKREVTVLFA DIRNFTGLAESLPPE----QVVGVLNQV---LGRLSDAVLTCGGTLDKFLGD	215
MycoAC	: DKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPA----DLVRFLDRLYSADFELV---DQHGLEKIKVSGD	301
VC1	: QKHDNVSILFADIEGFTSLASQCTAQ----ELVMTLNELFARFDKLA---AENHCLRILKILGD	440
IIC2	: QSYDCVCVMFASIPDFEKEFYTESDVNKEGLECLRLLEI IADFDDL LSKPKFSGVEKIKTIGS	942
cyaB1	: ALMAVFGAPLPLTEN-----HAWQAVQSALDMRQRLKEFNQRRITQAQPQIKIGIGIS	703
StigAC	: GLMAVWVGAPVHRTDDALRALQAAM-MMTAMVELRQAAQAEWAANERLGR--PLVLELGIGIN	275
MycoAC	: SYMVVSGVVERP-----RPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGN----PVPLRVGLA	349
VC1	: CYYCVSGLPEA-----RADHAHCCVEMGMDMIEAISLVREVTGV----NVNMRVGIH	488
IIC2	: TYMAATGLSAIPSQEHAQEPERQYMHIGTMVEFAYALVGKLDAINKHSFN----DFKLRVGIN	1001
cyaB1	: SGEVVSIGNIGSHKRMDYTVIGDGVNLSRLETVTKEYGCDIILSEFTYQLCSDRIWVRQLDKI	766
StigAC	: SGLAVAGNIGGSMRTEYTCIGDAVNVAARLCALAGPGEILAGERTRELVSH-REMPFEDLPPV	337
MycoAC	: TGPVVAGVVGSRFFFDVWGDVNVASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKD--DFVLRERGHI	409
VC1	: SGRVHCGVVLGL-RKWQFDVWSNDVTLANHMEAGGKAGR IHIKATLSYNGDYEVEPGCGGER	550
IIC2	: HGPVIAGVIGA-QKPYDIDWENTVNVASRMDSTGVLDKIQTVE-ETSLILQTLGYTCTCRGII	1062
cyaB1	: RVKGGKHQAVNIYELI	781
StigAC	: RLKGGKQPPVPLRVL	352
MycoAC	: NVKGGKVMRTWYLIG	424
VC1	: NAYLKEHSIETFLIL	565
IIC2	: NVKGGKDLKTYFVNT	1077

Fig.4-2: Alignment der katalytischen Domänen CyaB1, CyaB aus *S. aurantiaca* (StigAC), Rv1625c aus *M. tuberculosis* (MycoAC), der C1a-Domäne der ACV (VC1) und der C2-Domäne der ACII (IIC2). Dreiecke markieren die mutierten Aminosäuren, die für Metallbindung (D650), Stabilisierung des Übergangszustands (N728 und R732), und Substraterkennung (K646 und T721) verantwortlich sind. T721 ersetzt ein kanonisches Asp der katalytischen C2-Domäne der Mammalia-AC. Invers schwarze Schattierung kennzeichnet 100 %, dunkelgrau 80 % und hellgrau 60 % Ähnlichkeit. Der Balken und Pfeil markieren einen Sequenzeinschub und einen entsprechenden Einschub einer variablen AS, die für die Klasse-IIIb-ACn wie CyaB1 und StigAC charakteristisch sind.

4.1 Biochemische Charakterisierung von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉

4.1.1 Expression und Reinigung von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉

Von PD Dr. J. Linder wurden in Vorversuchen mehrere N-terminale Verkürzungen von CyaB1₁₋₈₅₉ synthetisiert, von denen die kürzeste aktive bei G595 (GERKE-Motiv) beginnt. Das Protein CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ (im Laborjournal auch als F4 bezeichnet) hat ein berechnetes MG von 32204 Da und der berechnete Isoelektrische Punkt liegt bei pH 6,65. Im SDS-PAGE zeigte das gereinigte Protein eine einzige Bande bei 29 kDa (Fig.4-3). Durch Optimierung der Expression und Reinigung konnte die Ausbeute von ca. 200 µg gereinigtem Protein pro 200 ml Expressionskultur auf etwa 1,5 mg gesteigert werden. Dabei wurde die IPTG-Konzentration von anfangs 30 µM auf bis zu 300 µM erhöht und 10 mM MgCl₂ beim Induzieren zugegeben. Der Hauptteil des Proteins wurde unlöslich in *inclusion bodies* produziert, gleichzeitig nahm aber auch die Menge an löslichem und reinigbarem Protein zu.

Trotz 20-50 % Glycerol im Dialysepuffer ging ca. 30 % des Proteins durch Aggregation verloren. Wurde bei Temperaturen > 28 °C exprimiert, nahm die Ausbeute an gereinigtem Protein zu, allerdings nahmen auch die Verluste beim Dialysieren zu.

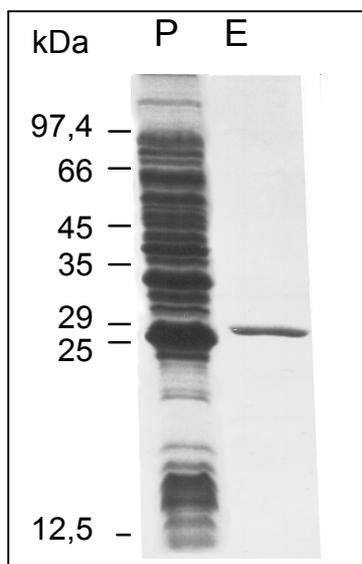


Fig.4-3: SDS-PAGE der Expression von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ in *E. coli*. Im Zentrifugationspellet (P) ist viel unlösliches Protein bei 29 kDa zu erkennen. 150 mg Bakterien-Pellet (Feuchtwicht) wurde in 200 µl SDS-Puffer und 200 µl H₂O suspendiert und nach erneuter Zentrifugation vom Überstand 1,5 µl aufgetragen. (E) Das Eluat der NiNTA-Affinitätsreinigung mit 2 µg Protein.

4.1.2 Lagerung und Stabilität

Für die Lagerung stellte sich heraus, dass ein Glycerolzusatz unabhängig von der Temperatur vorteilhaft für die Stabilität ist. Bei -80 °C sank die spezifische Aktivität nach zwei Tagen mit 20 % Glycerol um 50 % und mit 35 % Glycerol um 20 %.

Bei $+4\text{ °C}$ mit 20 % Glycerol nahm die Proteinmenge nach 34 Tagen um etwa 50 % und die spezifische Aktivität um 40 % ab. Ohne Glycerol waren nach 49 Tagen weder Protein noch enzymatische Aktivität feststellbar. Wurde CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ ohne Glycerol bei -20 °C eingefroren, war nach dem Auftauen weder lösliches Protein noch enzymatische Aktivität wieder zu finden. Die beste Stabilität zeigte CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ bei -25 °C und 20-35 % Glycerolgehalt (siehe Fig.4-4), da hier der Glycerolpuffer nicht durchgefroren ist. CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ kann dadurch vielleicht seine native Konformation behalten.

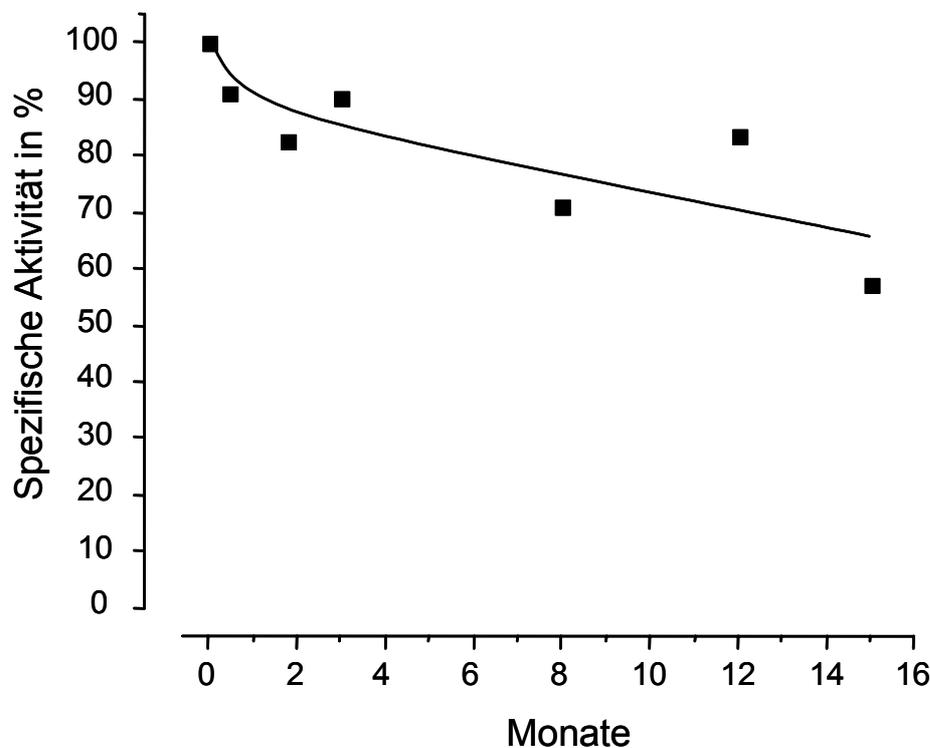


Fig.4-4: Haltbarkeit von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉, das bei -25 °C in 20-35 % glycerolhaltigem Puffer gelagert wurde. 100 % Aktivität entsprechen $600\text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, Testbedingungen: $75\text{ }\mu\text{M Mn-ATP}$, 45 °C , pH 8,5 MOPS/NaOH.

4.1.3 Cofaktor

Wie alle Adenylatcyclasen benötigt CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ ein zweiwertiges Kation als Cofaktor³³, da der Me^{2+} -ATP-Komplex das eigentliche Substrat darstellt. Röntgenstrukturuntersuchungen an kristallisierten katalytischen Zentren von Mammalia Klasse-III-ACn zeigten, dass zwei Me^{2+} -

³³ Routinemäßig werden in unserem Labor bei den ersten AC-Tests 2 mM Mn^{2+} zugesetzt.

Ionen (Mg^{2+} , Mn^{2+} aber auch Zn^{2+}) in die katalytische Tasche binden (Tesmer et al., 1997; Tesmer et al., 1999). Für CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ waren die EC_{50} -Werte $250 \mu\text{M}$ für Mg^{2+} und $100 \mu\text{M}$ für Mn^{2+} . Sättigung war bei 5 mM Mg^{2+} bzw. 1 mM Mn^{2+} erreicht (Fig.4-5). Zn^{2+} oder Ni^{2+} aktivierten nicht. Da CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ als Me^{2+} -bindendes Protein bei einer massiven Überexpression dem *E. coli* Me^{2+} entziehen und damit zu einem vorzeitigen Wachstumsstopp oder zur erhöhten Bildung von *inclusion bodies* führen könnte, wurde 10 mM MgCl_2 zum LB-Medium zugesetzt. Das führte tatsächlich zu verstärktem Wachstum während der Expression und einer 2-4fach höheren Proteinausbeute, obwohl unklar ist, ob Mg^{2+} vom Medium ins *E. coli*-Cytosol aufgenommen werden kann (s. 3.3.2).

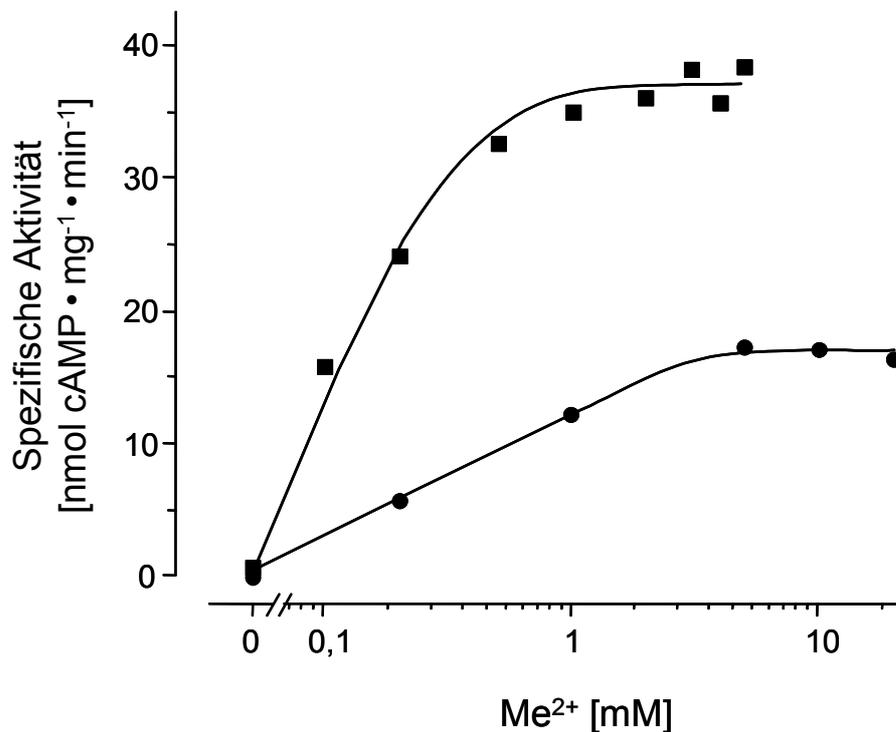


Fig.4-5: Vergleich der Effektivität von Mn^{2+} (■; $0,99 \mu\text{M}$ Protein) und Mg^{2+} (●; $3,3 \mu\text{M}$ Protein) als Cofaktor von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉. AC-Testbedingungen: $75 \mu\text{M}$ ATP, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min in TRIS/HCl, pH 7,5.

4.1.4 Temperaturabhängigkeit

Der AC-Test wurde bei verschiedenen Inkubationstemperaturen und pH 7,5 (TRIS/HCl oder MOPS/NaOH-Puffer, der eine höhere Temperaturstabilität des pH-Werts hat) durchgeführt. Die Temperaturoptima waren nahezu identisch und lagen bei $48 \text{ }^\circ\text{C}$ (Fig.4-6), was für ACn ungewöhnlich hoch ist. Durch Auftragen der Daten des aufsteigenden Kurventeils nach Arrhenius ergibt sich eine Gerade mit der Steigung $m = -5,076$. Daraus lässt sich mit der Gleichung $m = -E_A / (2,3 \cdot R)$ mit $R = 8,31441 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ die Aktivierungsenergie $E_A = 97 \text{ kJ/mol}$ berechnen (Segel, 1975). Die folgenden AC-Tests wurden bei $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt.

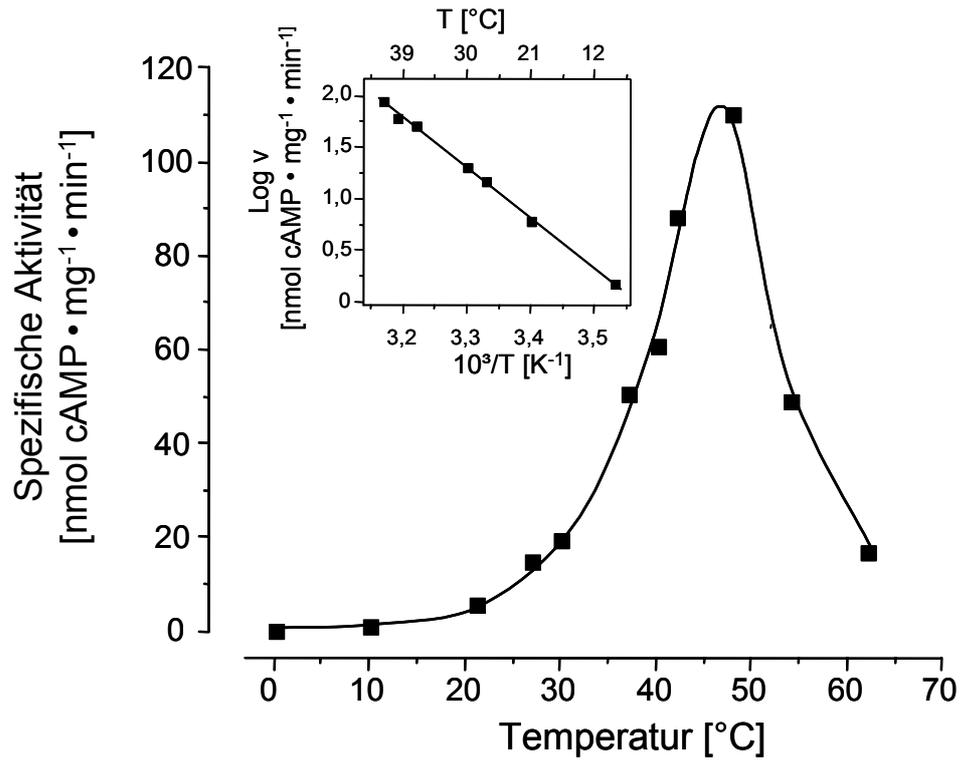


Fig.4-6: Temperaturabhängigkeit und Arrhenius-Plot von CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉. AC-Testbedingungen: 75 μ M ATP, 10 min in MOPS/NaOH-Puffer, pH 7,5.

4.1.5 pH-Optimum

Der pH-Wert hat einen starken Einfluss auf die katalytische Aktivität von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ (Fig.4-7). Von pH 7-8,5 (TRIS/HCl-Puffer) wurde das Enzym 8fach aktiviert. In Glycin-NaOH-Puffer war CyaB1 bei gleichen pH-Wert aktiver und in MOPS/NaOH-Puffer war es gleich aktiv wie in TRIS/HCl-Puffer. Die AC-Tests wurden sowohl bei 30 °C als auch bei 45 °C (Fig.4-7) durchgeführt. Das pH-Optimum von 8,5 blieb davon unberührt. Eine physiologische Bedeutung dieses Wertes ist unwahrscheinlich, da es sich hier nur um einen *in vitro* Test an einem verkürzten (also unvollständigen) Protein handelt.

Die folgenden Versuche wurden bei pH 8,5 durchgeführt.

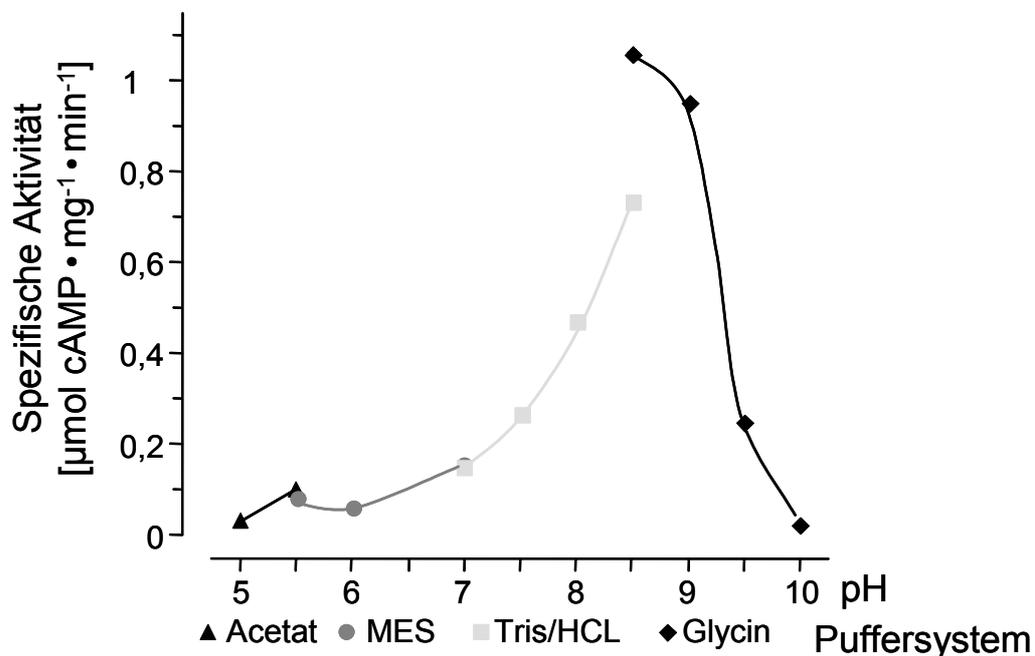


Fig.4-7: Die pH-Abhängigkeit von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ in verschiedenen Puffersystemen. AC-Testbedingungen: 75 µM ATP, 4 min bei 45 °C.

4.1.6 Zeitabhängigkeit

Bei 45 °C (2 min Vorinkubation) war die Reaktion (Fig.4-8) bis zur fünften Minute linear, danach flachte sie leicht ab. Da ab der vierten Minute mehr als 10 % des zugegebenen ATPs (75 µM) verbraucht war, könnte die Abnahme der ATP-Konzentration dafür verantwortlich sein. Die folgenden Versuche wurden für 4 min inkubiert.

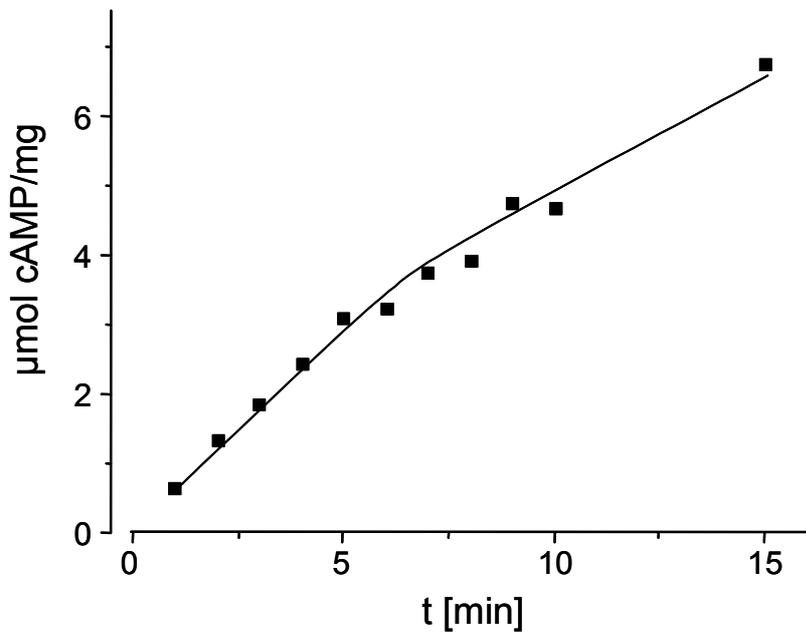


Fig.4-8: Zeitverlauf des AC-Tests von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉. AC-Testbedingungen: 75 µM ATP, 45 °C in MOPS/NaOH-Puffer, pH 8,5.

4.1.7 Proteinabhängigkeit

Versuche von PD Dr. J. Linder mit CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ bei 30 °C und pH 7,5 zeigten einen Anstieg der spezifischen Aktivität mit der Proteinkonzentration. Das deutet auf ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht hin, bei dem Homodimere für die Katalyse verantwortlich sind. Bei 45 °C und pH 8,5 war das Enzym so aktiv, dass ab 0,5 µg Protein nach 4 min mehr als 30 % Substrat umgesetzt waren. Bei größeren Proteinmengen führten Substratverarmung und Hemmung durch das Reaktionsprodukt PP_i zu niedrigeren spezifischen Aktivitäten.

Deshalb wurde die Proteinabhängigkeit bei 30 °C, pH 7,5 und 10 min Reaktionszeit durchgeführt und mit einem Faktor, der die vorher gemessene 40fache pH- und Temperatur-Aktivierung wiedergibt, normalisiert (Fig.4-9). Die so erhaltenen Werte stimmten gut mit denen bei niedrigen Proteinmengen gemessenen (ATP-Umsatz unter 20 %) überein. Von 16 bis 660 nM CyaB1 stieg die spezifische Aktivität um das 8fache. Halbmaximale Aktivität (= K_{diss}) lag bei 0,16 µM vor.

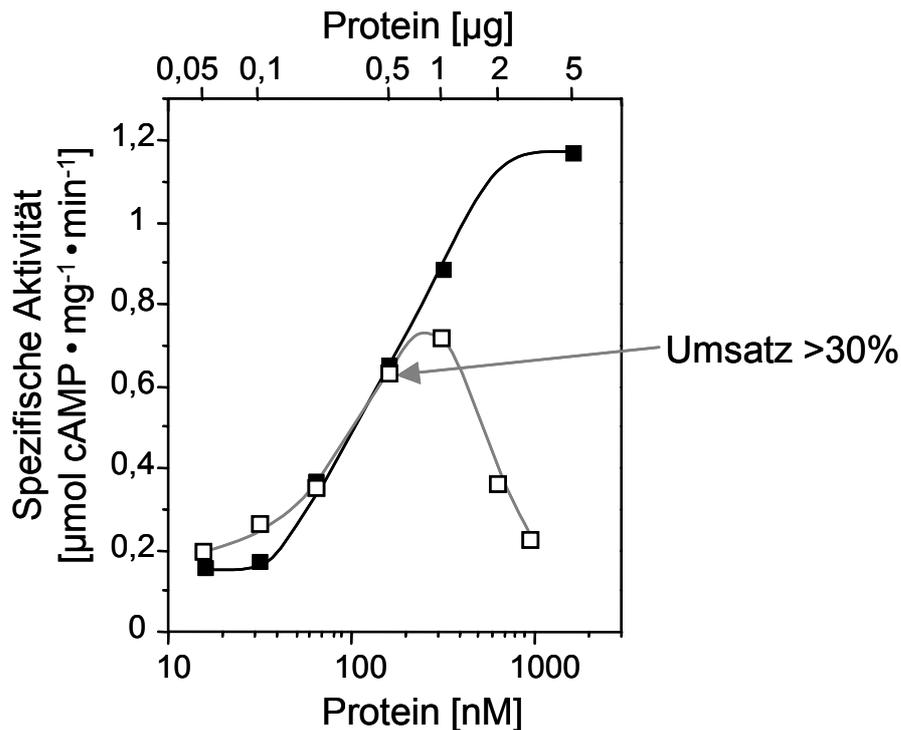


Fig.4-9: Proteinabhängigkeit der spezifischen Aktivität von CyaB₁₅₈₉₋₈₅₉ gemessen 4 min bei 45 °C in MOPS/NaOH-Puffer, pH 8,5 (□) und 10 min bei 30 °C in TRIS/HCL, pH 7,5 (■). Letztere Werte wurden mit 40 multipliziert (Normalisierung), um eine einheitliche Darstellung zu ermöglichen.

4.1.8 Substratspezifität

Um zu untersuchen, ob neben ATP auch GTP als Substrat dient, wurde [α -³²P]-GTP bei identischen Testbedingungen eingesetzt. Als interner Standard diente ³H-cGMP und der Stopppuffer enthielt cGMP und GTP. Es wurde keine GC-Aktivität gefunden. Die Kontrolle (Paramecium-GC-Präparation aus HEK293-Zellen³⁴) war positiv.

4.1.9 Kinetische Messungen

Bei steigenden ATP-Konzentrationen im AC-Test (Fig.4-10 A) zeigt CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉ eine Substratabhängigkeit nach dem Michaelis-Menten-Modell. Die Untersuchungen wurden bei sättigenden Konzentrationen von Mn²⁺ bzw. Mg²⁺ durchgeführt. Die Enzymkonzentrationen (132 nM mit Mn-ATP und 1,65 µM mit Mg-ATP als Substrat) wurden so angepasst, dass die Umsätze nicht höher als 15 % waren. Die Sättigung beginnt bei 75 µM Mn-ATP bzw. 500 µM Mg-ATP (Fig.4-10 A und Fig. 4-11 A). Nach Lineweaver-Burk-Auftragung (Fig.4-10 B) ist K_M 11 µM und V_{max} 309 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹ für Mn-ATP. Für Mg-ATP ist K_M 334 µM und V_{max} 655 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹ (Fig. 4-11 B). Wegen der unterschiedlichen Proteinkonzentrationen lassen sich die V_{max} -Werte für Mn-ATP und Mg-ATP nicht vergleichen.

³⁴Wurde von PD Dr. J. Linder zur Verfügung gestellt.

Der Hill Plot (Fig.4-10 C) hat eine Steigung von $m = 1$, d. h. es liegt keine Kooperativität der zwei gebildeten katalytischen Zentren des Homodimers vor und ATP hat keinen allosterischen Effekt. Für Mg-ATP wurde ebenfalls eine Gerade mit der Steigung $m = 1$ erhalten (Fig. 4-11 C).

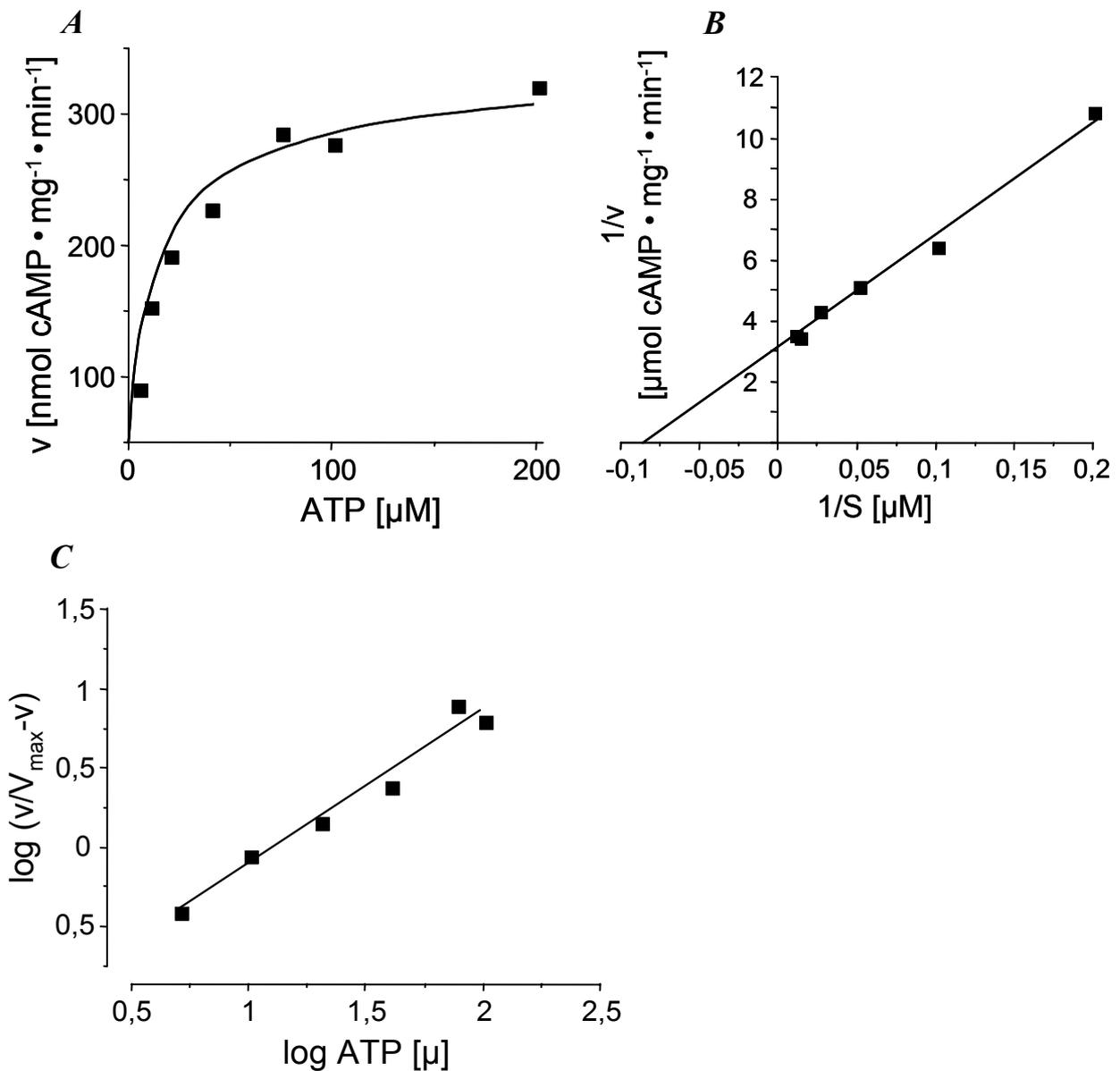


Fig.4-10: Substratabhängigkeit von 132 nM CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ mit 5-200 μM ATP und 2 mM Mn²⁺ bei 45 °C, 3 min, pH 8,5 (MOPS/NaOH); Auftragung nach: **A** = Michaelis-Menten; **B** = Lineweaver-Burk; **C**: Hill-Plot.

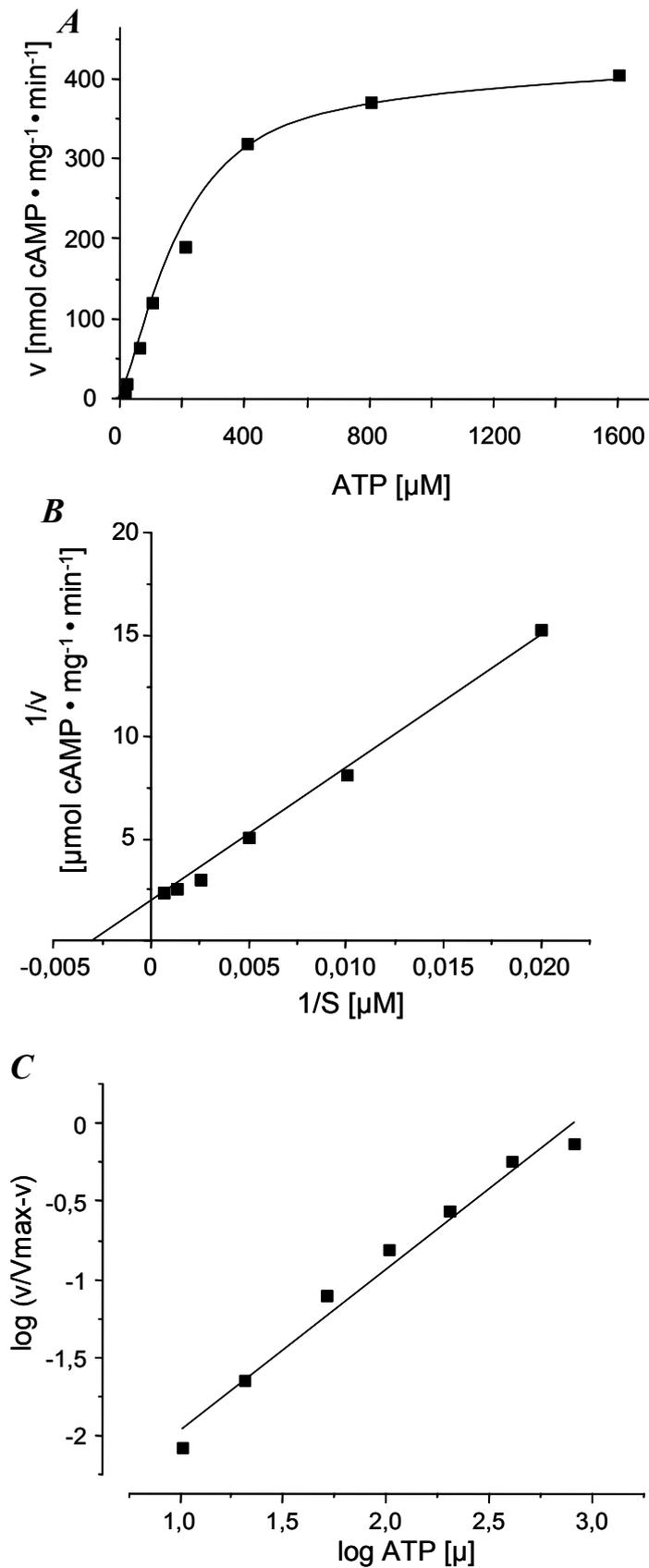


Fig. 4-11: Substratabhängigkeit von $1,65 \mu\text{M}$ CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉ mit 20-1600 μM ATP und 10 mM Mg^{2+} bei 45 °C, 3 min, pH 8,5 (MOPS/NaOH); Auftragung nach: **A** = Michaelis-Menten; **B** = Lineweaver-Burk; **C**: Hill-Plot.

4.1.10 Größenbestimmung mit Gelfiltration

Mit Chromatographie an einer Sephadex-200-HR-30/10-Säule wurde überprüft, ob CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ bevorzugt als Mono- oder Multimer vorliegt. Nur die Fraktionen des zweiten Peaks der OD₂₅₄-Kurve (Fig.4-12) zeigten AC-Aktivität. Er eluierte bei 16 ml, was einer Größe von 32 kDa und damit der theoretischen Monomergöße entspricht. Der Puffer-Peak bei 22 ml entstand wegen kleiner Unterschiede zwischen Lagerungs- und FPLC-Puffer. Der erste Peak wurde vielleicht aus aggregiertem Enzym oder kleineren Verunreinigungen gebildet.

Die effektive Proteinkonzentration der aktivsten Fraktion (5,3 µM) ist an sich groß genug für die Bildung stabiler Dimere unter AC-Testbedingungen (siehe Proteinabhängigkeit 4.1.7 und Rekonstitutionsversuche mit Mutanten 4.2.2.1). Im AC-Testansatz ist aber ATP enthalten, das vielleicht die Bildung von stabilen Dimeren fördert. Im FPLC-Puffer ist die Assoziation der CyaB1₅₉₅₋₈₅₉-Monomere bei gleichen Proteinkonzentrationen zu instabil, um Dimere zu bilden.

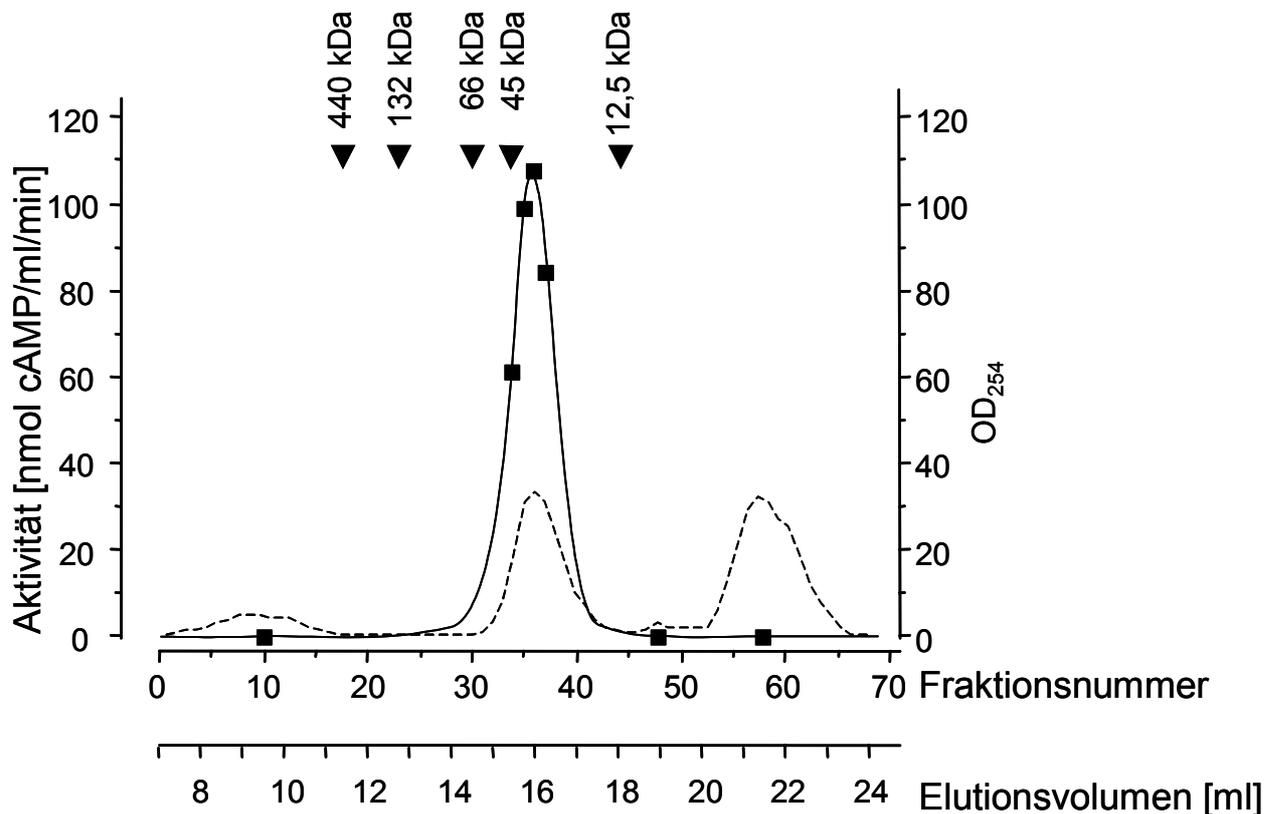


Fig.4-12: Chromatographie von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ (100 µl mit 340 µg Protein aufgetragen) an Superdex 200 HR 10/30. Die Flussrate war 0,5 ml/min FPLC-Puffer (50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ und 20% Glycerol). Markerproteine (Pfeile) waren Cytochrom (12,5 kDa), Ovalbumin (45kDa), BSA (66 kDa und 132 kDa als Dimer) und Ferritin (440 kDa). Ab 7 ml wurde fraktioniert (250 µl-Fraktionen) und auf enzymatische Aktivität getestet (4-40 µl Probe, 75 µM Mn-ATP, 45 °C und pH 8,5). Der Absorptionsverlauf (- - -) bei 254 nm ist aufgetragen. 25 Einheiten entsprechen einer OD₂₅₄ von 0,02.

4.1.11 Einfluss von Chemikalien auf CyaB1₅₉₅₋₈₅₉

4.1.11.1 NaCl

Bei der Gelchromatographie (s. o.) ist die Ionenstärke des Puffers kritisch. Sie sollte so groß sein, dass Beeinträchtigungen der nativen Konformation vernachlässigt werden können und Interaktionen mit dem Säulenmaterial ausgeschlossen sind. Die Aktivität von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ wird bis 50 mM NaCl nur gering beeinträchtigt (Fig.4-13), höhere NaCl-Konzentrationen hemmen.

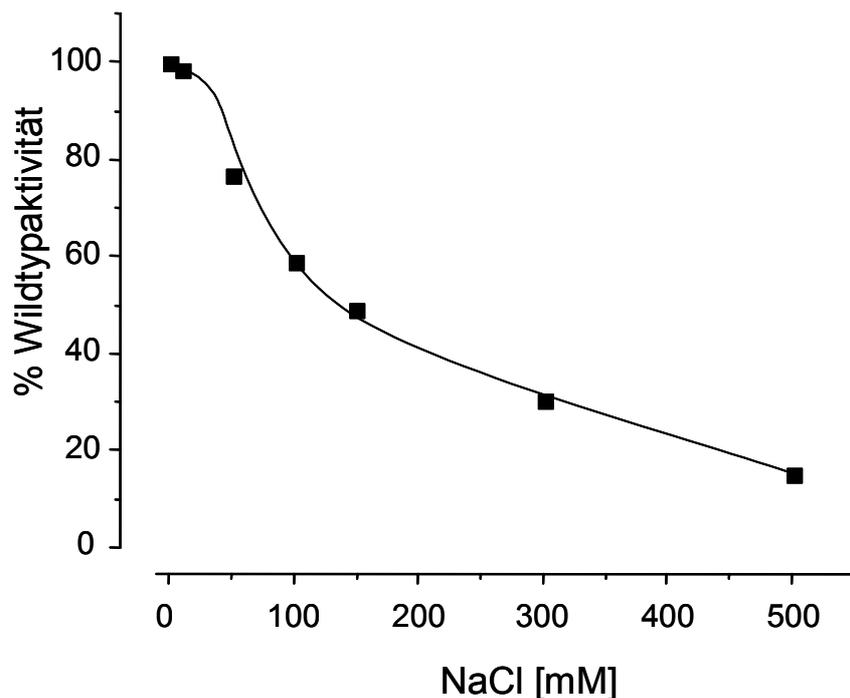


Fig.4-13: Einfluss von NaCl auf die Aktivität von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉. 100 % entsprechen 506 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹, Testbedingungen: 75 µM Mn-ATP, 45 °C, pH 8,5 MOPS/NaOH

4.1.11.2 Tenside

Es wurde untersucht, bis zu welcher Konzentration Tenside zugesetzt werden können, um die Stabilität von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ bei der Reinigung und Lagerung zu gewährleisten. Proteine mit TPR-Domänen reagieren oft empfindlich auf Tensidzusatz (Lamb et al., 1995).

LDAO und DDM sind wegen ihrer speziellen Molekülstruktur gut für Kristallisationsversuche geeignet (Ducruix, 1999), hemmen aber CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ schon ab 0,01 % sehr stark (siehe Tab. 4-1). Triton X100, Brij 35 und Tween 20 sind wegen ihrer undefinierten Zusammensetzung für Kristallisationsversuche ungeeignet. Sie beeinträchtigen die Aktivität weniger stark. Die Proteinaggregation konnte durch Tenside nicht verringert werden.

Tab. 4-1: Einfluss verschiedener Tenside auf die Aktivität von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉. 100 % Aktivität entsprechen 301 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹ (75 μM Mn-ATP, 45 °C und in MOPS/NaOH pH 8,5).

Tensid Konzentration	AC-Aktivität (%)			
	0,005%	0,01%	0,05%	0,1%
LDAO	33	0,3	0,03	0
DDM	72	32	0,8	0,8
Brij 35	n.t.	n.t.	n.t.	0,9
Triton X100	99	94	74	77
Tween 20	104	109	97	82

4.1.11.3 Harnstoff

Harnstoff ist chaotrop, d. h. er zerstört H-Brücken. Bis 1M beeinträchtigt er die katalytische Aktivität von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ nicht wesentlich (Fig.4-14). Ab 1,5 M ist die AC inaktiv. Die Proteinaggregation konnte durch 1 M Harnstoff im Dialysepuffer nicht verringert werden.

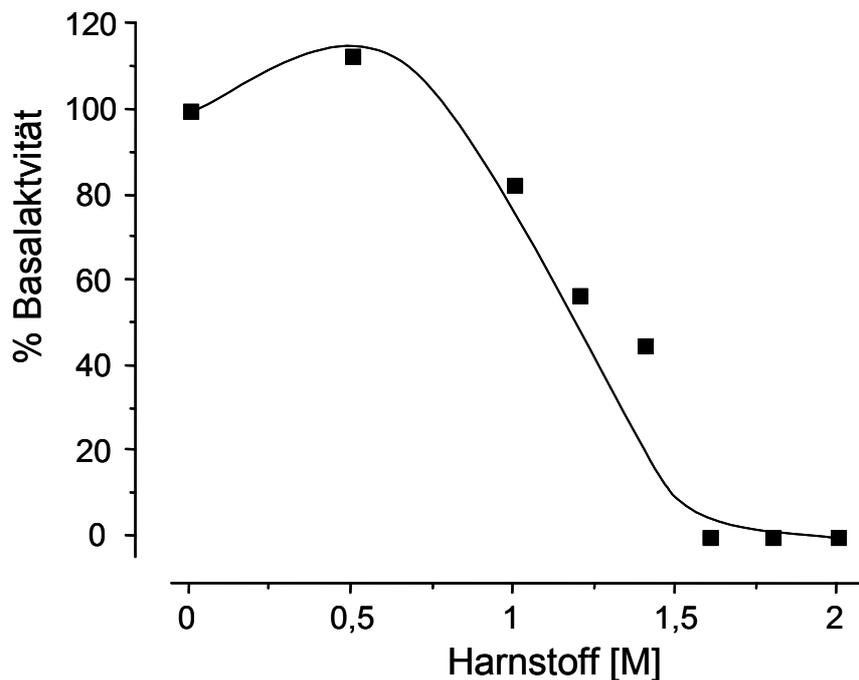


Fig.4-14: Einfluss von Harnstoff auf die Aktivität von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉. 100 % entsprechen 53 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹, Testbedingungen: 75 μM Mn-ATP, 37 °C, pH 7,5 TRIS/HCl.

4.1.11.4 Nukleosidtriphosphate und Pyrophosphat

GTP, CTP, UTP und ITP hemmen im großen Überschuss (1mM) CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ (Tab. 4-2). Die Hemmung war nicht wesentlich vom Nukleosidrest abhängig und kann mit unspezifischer Hemmung durch den Pyrophosphatrest erklärt werden. Ein Zusatz von 1 mM PP_i reduzierte die

Aktivität um etwa 95 % (Fig.4-15). Der Grund für die leichte Aktivierung durch PP_i -Konzentrationen, die in der Nähe der Substratkonzentration ($75 \mu\text{M}$) liegen, ist unklar.

Tab. 4-2: Einfluss verschiedener Nucleosidtriphosphate auf die Aktivität von CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉. 100 % Aktivität entsprechen $301 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, Testbedingungen: $75 \mu\text{M Mn-ATP}$, $45 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 8,5 MOPS/NaOH.

NTP (1mM)	Restaktivität (%)
GTP	16
CTP	28
UTP	13
ITP	11

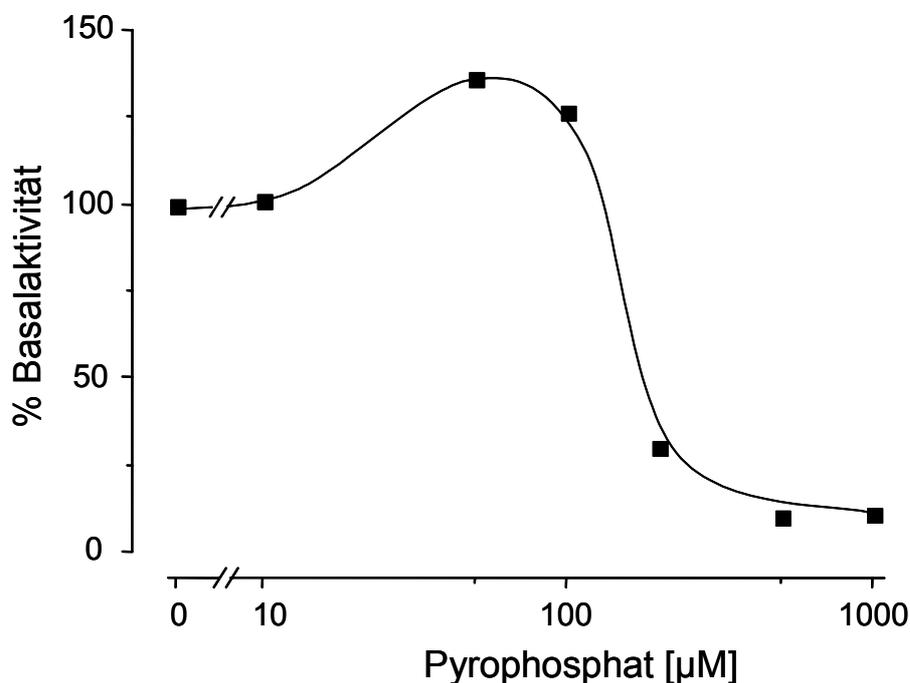


Fig.4-15: Effekt von Pyrophosphat auf CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉. 100 % entsprechen $265 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, Testbedingungen: $75 \mu\text{M Mn-ATP}$, $45 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 8,5 MOPS/NaOH

4.1.11.5 2',3'AMP

2',3'AMP gehört zur Gruppe der P-Site-Inhibitoren, die als Adenosin- oder Adeninanaloga in die Purintasche des AC-katalytischen Zentrums binden (Dessauer und Gilman, 1997; Johnson und Shoshani, 1990; Johnson und Shoshani, 1994; Tesmer et al., 2000). Dort besetzen sie, vorzugsweise zusammen mit Pyrophosphat, die Stelle des Abgangsproduktes cAMP und bilden einen *dead end*-Komplex, der dem Enzym-Produktkomplex ähnelt.

$0,8 \text{ M } PP_i$ hemmte CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉ zu 95%. Bei pH 7,5 wurde die katalytische Aktivität durch 2',3'AMP sogar leicht aktiviert (Fig.4-16), während bei pH 8,5 eine Hemmung auftrat. Ein vergleichbares Verhalten wurde für Mammalia-ACn noch nicht beschrieben. Mit Mutanten wurde versucht, diesen Effekt weiter zu klären (s. 4.2.2.4).

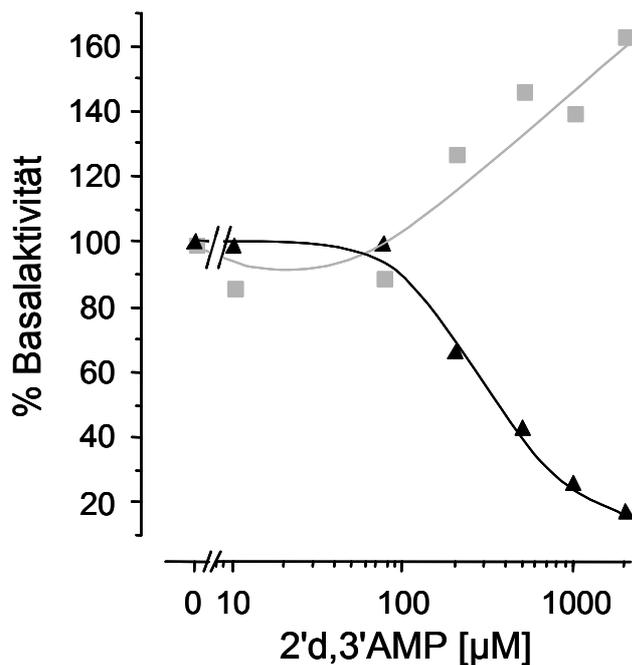


Fig.4-16: 2',3'AMP aktiviert CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ bei pH 7,5 (■) und hemmt bei pH 8,5 (▲). 100 % entsprechen 408 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹ bei 45 °C und pH 8,5. Bei 45 °C und pH 7,5 sind 100 % = 98 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹.

4.1.11.6 Bikarbonat

Bikarbonat aktiviert eine lösliche Mammalia-AC aus Spermien und einige cyanobakterielle ACn wie CyaC aus *S. platensis* (Chen et al., 2000). Wie bei CyaB1 ist bei diesen ACn an der Stelle des purinbindenden Aspartats (D1018 bei ACII-C2) ein Threonin zu finden. Sie gehören aufgrund von Sequenzvergleichen zu den Klasse-IIIb ACn. Auch CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ war durch HCO₃⁻ (mit Na⁺ oder K⁺ als Gegenion) bei konstantem pH-Wert bis zu 3,5fach aktivierbar (Fig.4-17). Bei pH 8,5 führten mehr als 30 mM KHCO₃ zur Aktivitätsabnahme, da bei diesem pH-Wert MnCO₃ als Präzipitat ausfiel und so den Cofaktor Mn²⁺ entzog. Bei pH 7,5 lag das HCO₃⁻/CO₃²⁻-Gleichgewicht mehr auf der Seite des Bikarbonats, so dass bis 80 mM KHCO₃ kein MnCO₃ ausfiel.

Die physiologische Rolle der Bikarbonataktivierung in *Anabaena* wird z. Z. mit CyaB1-*knock out*-Mutanten in Kooperation mit M. Cann (Durham, UK) untersucht.

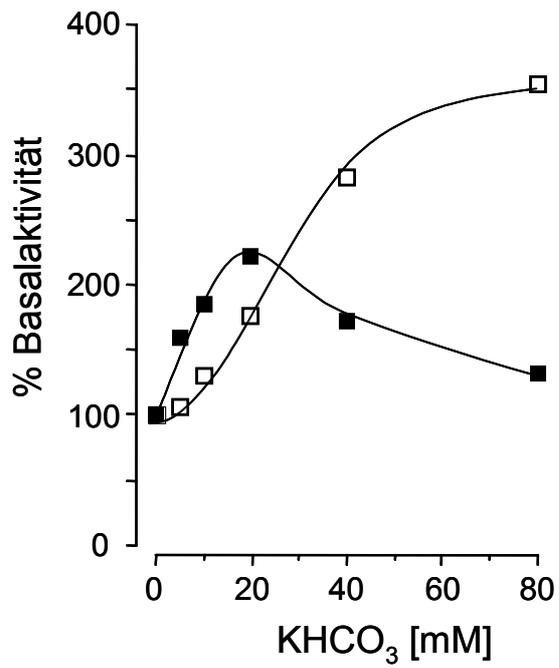


Fig.4-17: Bikarbonataktivierung von CyaB₅₉₅₋₈₅₉ bei pH 8,5 (■) und bei pH 7,5 (□). 100 % entsprechen 264 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹ bei 45 °C und pH 8,5. Bei 45 °C und pH 7,5 sind 100 % = 193 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹.

4.2 Charakterisierung der Mutanten von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉

Nachdem die optimalen Expressions-, Reinigungs- und Reaktionsbedingungen für CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ ermittelt wurden, untersucht dieser Abschnitt den Effekt von Punktmutationen (s. Fig.4-2, S. 60).

4.2.1 Expression und Reinigung

Alle Mutanten außer CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646Q waren ähnlich gut wie CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ exprimier- und reinigbar (Fig.4-18). Das Wachstum der *BL21(D3)[pREP4]*-Expressionszellen mit CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646Q war nach Induktion mit IPTG reduziert. In den Zellen war kein rekombinantes Protein per SDS-PAGE zu erkennen (nicht gezeigt).

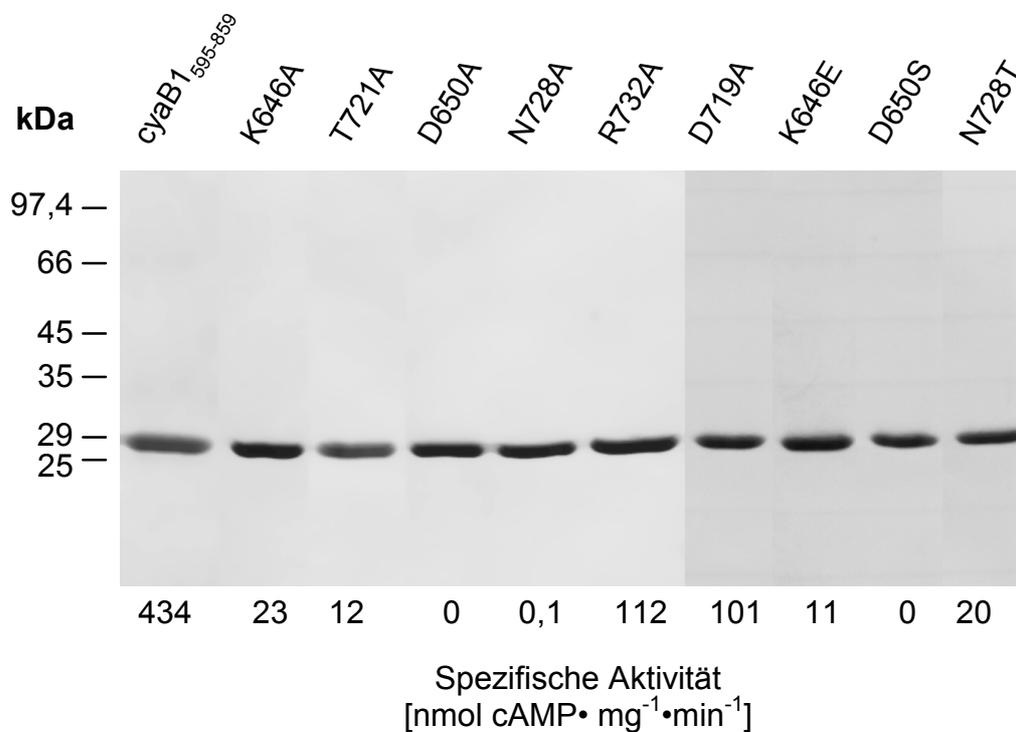


Fig.4-18: SDS-PAGE des gereinigten CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ und der Punktmutanten (je 2 µg Protein aufgetragen). Die spezifischen Aktivitäten wurden mit 132 nM CyaB1₅₉₅₋₈₅₉, 265 nM K646A, 132 nM T721A, 3,3 µM D650A, 0,66 µM N728A, 248 nM R732A und je 265 nM von D719A, K646E, D650S und N728T bei 45 °C und pH 8,5 mit 75 µM Mn-ATP bestimmt.

4.2.2 Mutanten zur Charakterisierung des katalytischen Zentrums

4.2.2.1 CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A/-N728A

Gemäß der bekannten Struktur des katalytischen Zentrums der Mammalia-ACn ist CyaB1 D650 an der Bindung des Metall-Cofaktors beteiligt und N728 stabilisiert den Übergangszustand (Tesmer et al., 1997; Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997). Die AC-Aktivitäten der CyaB1₅₉₅₋₈₅₉-

Mutanten waren immer kleiner als 1 % der Wildtyp-Aktivität (Fig.4-18), was die Beteiligung der ASn an der Katalyse nahe legt. CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728A hat einen Defekt in der Stabilisierung des Übergangszustandes, behält aber seine Me-Cofaktorbindung und ist damit funktionell äquivalent zur Mammalia-C1a-AC-Domäne. CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A kann den Übergangszustand stabilisieren und hat einen Defekt in der Me-Cofaktorbindung, so dass es funktionell äquivalent zur Mammalia-C2a-AC-Domäne ist. Wurden 47 nM CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728A (C1a-Äquivalent) vorgelegt und mit steigenden Mengen CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A (C2-Äquivalent) titriert, konnte Aktivität rekonstituiert werden (Fig.4-19). Der Anstieg der Aktivität beweist das Modell (Fig.5-1 A, B und C), wonach durch Dimerisierung ein der Mammalia-ACn ähnliches Heterodimer mit einem katalytischen Zentrum rekonstituiert wird. Aus der halbmaximalen Aktivierung durch CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A ergibt sich eine Dissoziationskonstante (K_{diss}) der beiden Monomere von 2 μM . Auch CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646E und CyaB1₅₉₅₋₈₅₉T721A (s.u.) eigneten sich für Rekonstitutionsversuche mit komplementären Mutanten. K646 ist im katalytischen Zentrum von CyaB1 für die Substratbindung (s. 4.2.2.3 und 4.2.3) und T721 für die Substratorientierung (s. 4.2.2.2) verantwortlich. Bei einem Überschuss von katalytisch inaktivem CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A (als C2-Äquivalent) konnte mit CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646E oder -T721A AC-Aktivität rekonstituiert werden (Tab. 4-3). Eine Rekonstitution von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728A (C1a-Äquivalent) mit Mutanten, die laut obigem Modell gleichfalls C₁-Analoge sind, war unmöglich (Tab. 4-3). Die resultierende Modellvorstellung (Fig.5-1 D) stimmte mit dem kanonischen Mammalia-AC-Modell überein:

- N728 und D650 werden im Homodimer von CyaB1 von der jeweils komplementären Proteindomäne dem katalytischen Zentrum zur Verfügung gestellt,
- N728, K646 und T721 liegen auf der funktionell identischen Proteindomäne.

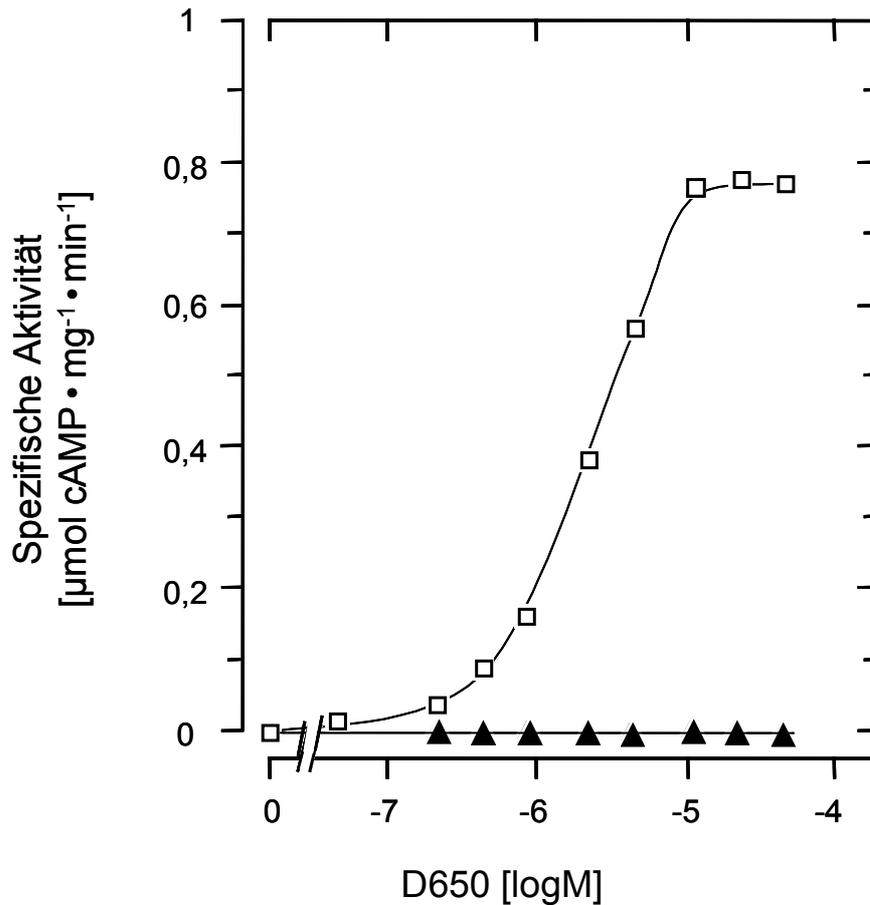


Fig.4-19: Rekonstitution der AC-Aktivität von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728A mit steigenden Mengen CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A (□) und Kontrolle mit CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A alleine (▲). Die spezifischen Aktivitäten der Mischungen beziehen sich auf 47 nM CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728A.

Tab. 4-3: Rekonstitution von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646E und T721A mit CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A oder N728A. Funktionelle Analogie zur C1- und C2-Schleife der Mammalia-AC sind in Klammern angegeben.

Proteinkonzentration		Aktivität
3,1 μM	31 nM	(pmol cAMP/min)
D650A (C ₂)		0,04
+ K646E (C ₁)		2,29
+ T721A (C ₁)		1,19
N728A (C ₁)		1,17
+ K646E (C ₁)		1,18
+ T721A (C ₁)		1,06

4.2.2.2 CyaB1₅₉₅₋₈₅₉T721A/-D719A

In Säuger-ACn ist ein kanonisches Aspartat für die Substraterkennung durch Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung zum N⁶ des ATP verantwortlich (Tesmer et al., 1999). An seiner Stelle steht in CyaB1 das Threonin721 (s. Fig.4-2). Die Substratspezifität von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ wird

dadurch nicht verändert, da GTP nicht als Substrat akzeptiert wird (s. 4.1.8). Mit den Mutanten CyaB1₅₉₅₋₈₅₉T721A und -D719A wurde geprüft, ob T721 die Funktion des Aspartat übernimmt oder das in der Nähe liegende D719 den Purinring bindet. CyaB1₅₉₅₋₈₅₉T721A zeigte nur 3 % Wildtyp-Aktivität (Fig.4-18), während CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D719A mit 25 % Wildtyp-Aktivität deutlich aktiver war. Der Verlust von D719 spielt folglich für die Katalyse eine geringere Rolle, während T721 essentiell ist. Bei beiden Mutanten hat die Mutation die Substrat-Affinität nicht beeinträchtigt, da der K_M -Wert (9 μM Mn-ATP für T721A und 3 μM für D719A) gegenüber Wildtyp nicht erhöht ist (s. Tab. 4-4). Gleichzeitig wurde bei T721A V_{max} stärker erniedrigt als bei D719A (17 gegenüber 70 $\text{nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), was auf eine gestörte Positionierung des ATP für die Cyclisierungsreaktion schließen lässt.

4.2.2.3 CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646A

Gemäß der Mammalia-AC-Kristallstruktur (Tesmer et al., 1999) sollte K646 in CyaB1 eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N¹ des ATP ausbilden und damit das Substrat definieren. Die Mutation K646A reduzierte die spezifische Aktivität auf 5 % (Fig.4-18). Der K_M -Wert war mit 61 μM für Mn-ATP 5fach erhöht und V_{max} war auf 63 $\text{nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ reduziert (Tab. 4-4). Das Temperaturoptimum von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646A (Daten nicht gezeigt) war mit 41 °C niedriger und die Aktivierungsenergie mit 100 kJ/mol höher als beim Wildtyp (48 °C und 97 kJ/mol). Das alles spricht dafür, dass K646 wie bei den Säuger-ACs für die Substratbindung verantwortlich ist.

4.2.2.4 CyaB1₅₉₅₋₈₅₉R732A

Gemäß dem Mammalia-AC-Modell sollte R732 bei CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ für die Stabilisierung des Übergangszustands sorgen. Dabei wird durch das positiv geladene Arginin ein 5-bindiger Übergangszustand des α -Phosphors des ATP stabilisiert, weil dessen erhöhte negative Ladung durch die positive des Arginin-Kations zum Teil neutralisiert wird (Tesmer et al., 1997). CyaB1₅₉₅₋₈₅₉R732A hatte etwa 25 % der Wildtyp-Aktivität (Fig.4-18) und ist mit einem unveränderten K_M -Wert (14 μM Mn-ATP) und einer reduzierten V_{max} (57 $\text{nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) eine reine V_{max} -Mutante (Tab. 4-4). Damit wird für R732 im Einklang mit Mutationsstudien von Mammalia-ACn (Guo et al., 2001; Tang et al., 1995; Yan et al., 1997) eine Beteiligung an der Stabilisierung des Übergangszustands nahegelegt.

In der pH-Abhängigkeit war CyaB1₅₉₅₋₈₅₉R732A bis pH 7,5 gleich aktiv wie der Wildtyp (Fig.4-20) und im Unterschied zum Wildtyp durch pH-Erhöhung nicht weiter "aktivierbar". Gleichzeitig wurde CyaB1₅₉₅₋₈₅₉R732A durch den P-Site-Inhibitor 2',3'-AMP bei pH 7,5 analog zum Wildtyp aktiviert, aber bei pH 8,5 nicht wie der Wildtyp gehemmt (Fig.4-21 A und B). Die Mutation R732A lässt bei CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ offensichtlich noch eine Cyclisierungsreaktion zu, führt

aber zum Verlust der "pH-Aktivierbarkeit" und der Hemmbarkeit durch P-Site-Inhibitoren bei pH 8,5.

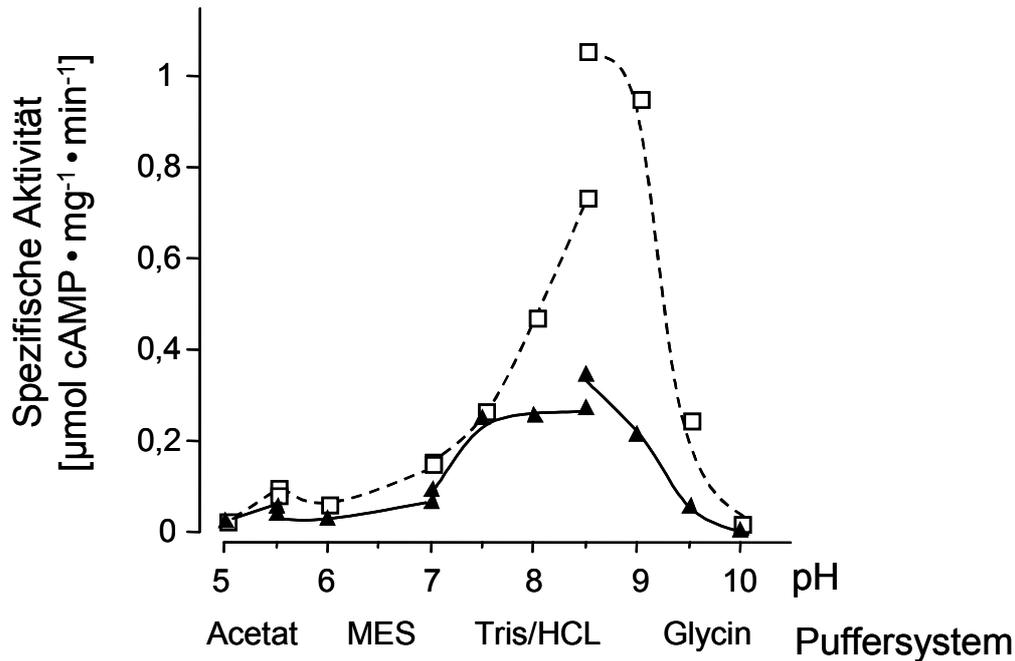


Fig.4-20: Vergleich der pH-Optima von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉R732A (▲) und dem Wildtyp (□ und gestrichelte Linie) unter gleichen Puffersystemen und Assaybedingungen

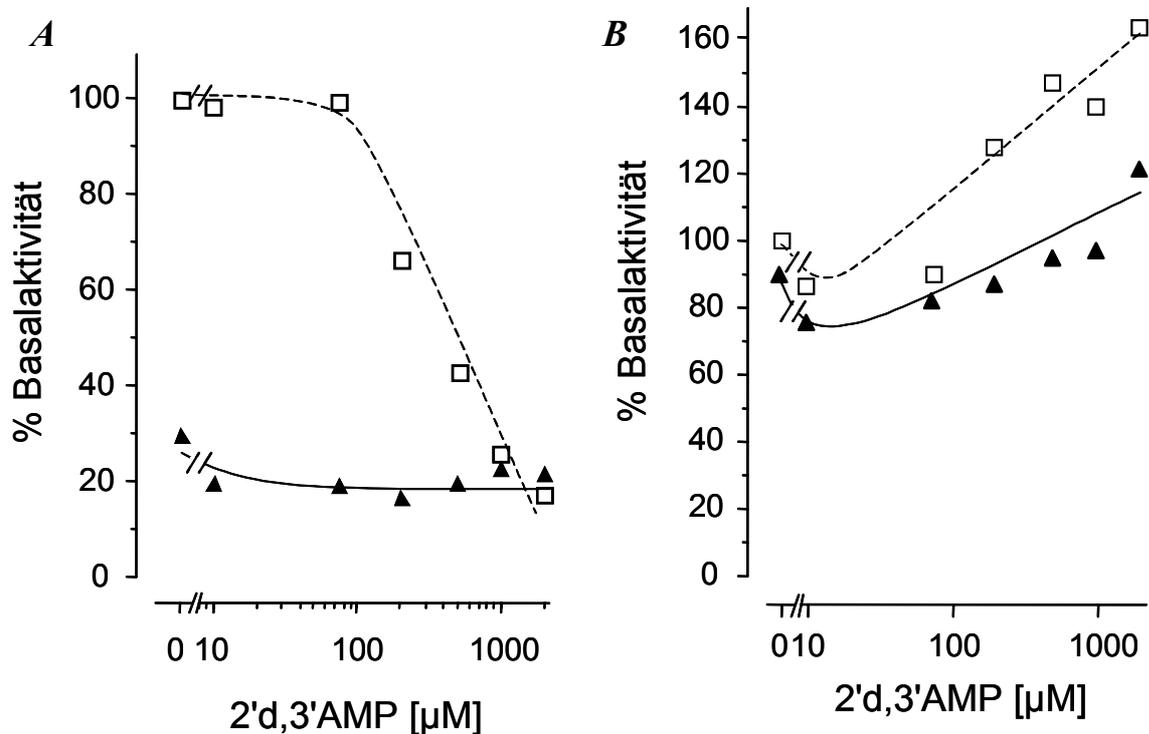


Fig.4-21: Effekt von 2',3'-AMP auf CyaB1₅₉₅₋₈₅₉R732A (▲) und dem Wildtyp (□ und gestrichelte Linie) bei A) pH 7,5 und B) bei pH 8,5. 100 % entsprechen 408 nmol cAMP \cdot mg⁻¹ \cdot min⁻¹ bei 45 °C und pH 8,5. Bei 45 °C und pH 7,5 sind 100 % = 98 nmol cAMP \cdot mg⁻¹ \cdot min⁻¹.

4.2.3 Versuche zur Änderung der Substratspezifität mit CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646E

Die katalytischen Zentren von Guanylatcyclasen und Klasse-III-ACn sind sehr ähnlich, wie aus Sequenzvergleichen, Mutagenesestudien und Modellierungsstudien auf Basis der AC-Kristallstrukturen hervorgeht. Mutationen der in GCn hochkonservierten Substratbindenden ASn E nach K und C nach D erzeugten Proteine mit AC-Aktivität (Beuve, 1999; Linder et al., 1999; Tucker et al., 1998). Die Versuche, ACn durch Einführung der Mutationen Q503R (ACV-C1) und K938E/D1018C (AC II C2) in GCn umzuwandeln, waren nur bedingt erfolgreich (Sunahara et al., 1998).

Bei CyaB1 befinden sich an den Positionen für K, Q und D die ASn K646, D719 und T721. Nur für die Mutante K646A konnte eine Veränderung der Substrataffinität nachgewiesen werden (s. 4.2.2.3), während D719A und T721A reine V_{\max} Mutanten waren. Da T721 und in geringerem Maße D719 eher an der Orientierung als an der Bindung des Substrats beteiligt sind, kommt nur K646 als Ziel für eine Austauschmutation nach E in Frage. Die Mutante CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646E zeigte aber keine GC-Aktivität (Daten nicht gezeigt) und gleichzeitig konnte AC-Aktivität erhalten werden. Diese war geringer als die von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646A, aber der K_M war vergleichbar (Fig.4-18 und Tab. 4-4). Die Mutation K646 nach E reicht nicht aus, um die Substratspezifität von CyaB1 zu ändern und die funktionelle Konformation der katalytischen Domäne zu zerstören.

4.2.4 Versuche zur Forskolinstimulierbarkeit von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650S im Verbund mit CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728T

Forskolin³⁵ vermag die Aktivität der Mammalia-ACn Typen I-VIII zu stimulieren, indem es in die nichtkatalytische Tasche des Pseudoheterodimers bindet und die funktionelle Dimerisierung der C1/C2-Schleifen erhöht und optimal orientiert (Tesmer et al., 1997; Zhang et al., 1997). In der Forskolinbindetasche sind zwei ASn maßgeblich an der Bindung des Diterpens beteiligt: T512 (ACV-C1) und S942 (AC-II-C2). Diese beiden AS befinden sich an der Position des Metallbindenden D440 (ACV-C1) und des Übergangszustand-stabilisierenden N1025 (AC-II-C2) der katalytischen Tasche. In CyaB1 befinden sich in den zwei katalytischen Taschen des Homodimers an den entsprechenden Positionen D650 und N728 (Fig.5-1 A). Durch Mischung der beiden Mutanten CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650S und CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728T sollte ein Heterodimer mit einer einzigen intakten katalytischen Tasche und einer durch die Mutation nach Serin und Threonin inaktivierten Tasche (ähnlich wie Fig.5-1 D) entstehen, die Forskolin binden könnte. Die N728T-Mutante zeigte analog zu anderen Mutationsstudien (Yan et al., 1997) deutlich mehr Restaktivität als die N728A-Mutante (Fig.4-18) und im Gegensatz zu dieser wurde ein K_M von 7

³⁵ Forskolin ist ein blutdrucksenkendes Diterpen, das in der indischen Pflanze *Coleus forskohlii* vorkommt.

μM Mn-ATP und eine reduzierte V_{max} mit $19 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Tab. 4-4) gefunden. CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉D650S war inaktiv (Fig.4-18) und die Mischung mit einer äquivalenten Menge CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉N728T ergab aktive Heterodimere (5fache Aktivität in Fig.4-22). Diese Heterodimere (wie auch die Mutanten allein) waren jedoch nicht mit Forskolin stimulierbar.

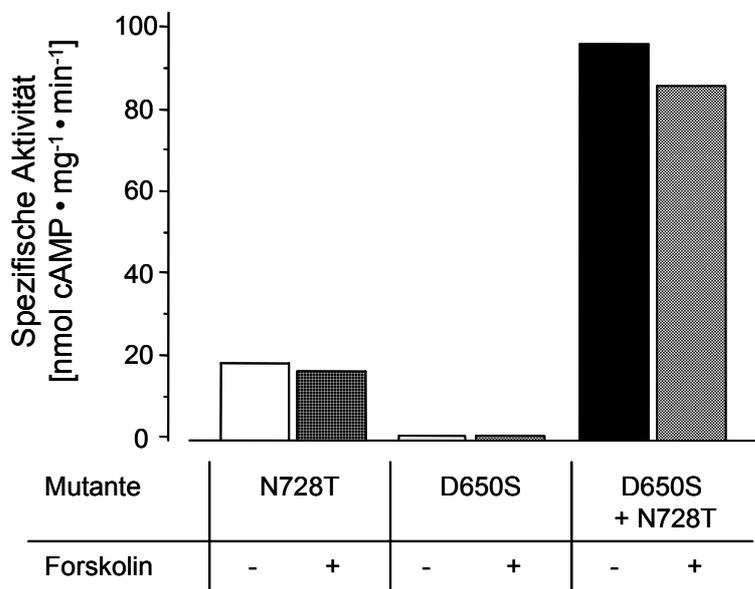


Fig.4-22: Rekonstitution von AC-Aktivität der Mischung von 124 nM CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉N728T mit der gleichen Menge D650S.

4.2.5 Zusammenfassung

Aufgrund der niedrigeren Restaktivität der Mutanten mussten für die kinetischen Untersuchungen teilweise höhere Proteinmengen eingesetzt werden (Tab. 4-4). Von D650A und N728A konnte wegen der geringen Restaktivität kein K_M oder V_{max} -Wert bestimmt werden. K646A und K646E zeigten außer einem erniedrigten V_{max} -Wert einen erhöhten K_M -Wert, was auf eine Beteiligung von K646 an der Substratbindung hinweist. T721A, D719A, R732A und N728T sind reine V_{max} -Mutanten, was eine Beteiligung dieser AS an der Katalyse der Cyclisierungsreaktion nahe legt.

Tab. 4-4: Kinetische Parameter der Mutanten von CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉ im Vergleich mit dem Wildtyp. Testbedingungen: $1\text{-}120 \mu\text{M}$ Mn-ATP, 4 min bei 45°C und pH 8,5 (MOPS/NaOH)

Mutation	-	T721A	D719A	R732A	K646A	K646E	N728T
K_M (μM Mn-ATP)	11	9	3	14	61	56	7
V_{max} ($\text{nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	309	17	70	57	63	16	19
Hill Koeffizient	1	1	0,9	1	1	1,1	1
<i>Protein (nM)</i>	<i>124</i>	<i>931</i>	<i>186</i>	<i>124</i>	<i>621</i>	<i>496</i>	<i>248</i>

4.3 C-terminale CyaB1 Verkürzungen

Die potentielle Bedeutung der TPRL-Domäne (AS 789-843) für die korrekte Faltung, Löslichkeit und Aktivität wurde mit verschiedenen Ansätzen untersucht. Damit sollten die Ursache für die enormen Expressionsprobleme von ähnlichen ACn mit TPRL-Domäne aus *Paramecium* und *Plasmodium falciparum* geklärt werden. Diese wurden zeitgleich zu dieser Arbeit von Dr. K. Hambach und J. Weber bearbeitet. Außerdem wurde gleichzeitig von Arne Hammer eine Klasse-IIIb-AC aus *Stigmatella aurantiaca* (CyaB), die keine TPRL-Domäne besitzt, löslich und aktiv exprimiert.

In Versuchen von PD Dr. J. Linder wurden vier C-terminale Verkürzungen des katalytischen Bereichs, CyaB1₅₉₅₋₇₇₉, CyaB1₅₉₅₋₇₈₁, CyaB1₅₉₅₋₇₈₆ und CyaB1₅₉₅₋₇₉₂, konstruiert. Sie alle endeten in einem unkonservierten *Linker*-Bereich aus 11 AS zwischen katalytischem Zentrum und der TPRL-Domäne. Bei keinem der in *E. coli* exprimierten Konstrukte konnte ein lösliches Protein mit AC-Aktivität erhalten werden.

4.3.1 C-terminale Holoenzymverkürzungen

Es wurde untersucht wie sich die Anwesenheit der N-terminalen Domänen auf Löslichkeit und Aktivität der C-terminalen Verkürzungen von CyaB1 auswirkt. Erste Expressionsversuche von PD Dr. J. Linder mit dem Holoenzym zeigten, dass *E. coli*-Homogenate hohe AC-Aktivität besaßen. Darauf aufbauend wurden die Holoenzymverkürzungen CyaB1₁₋₇₇₉, CyaB1₁₋₇₈₆ und CyaB1₁₋₇₉₂³⁶ (s. o.) konstruiert und in *pQE30* kloniert.

In den Niederschlägen der Zellhomogenate der Verkürzungen ist per SDS-PAGE jeweils eine überexprimierte Bande zu erkennen, die unlösliches Protein (*inclusion bodies*) bei etwa 82 kDa und beim Holoenzym bei etwa 90 kDa zu sehen (berechnetes MG für CyaB1₁₋₇₇₉ = 88,8 kDa, CyaB1₁₋₇₈₆ = 89,6 kDa, CyaB1₁₋₇₉₂ = 90,3 kDa und Holoenzym = 98,2 kDa; Fig.4-23). Im Überstand ist keine überexprimierte Bande zu erkennen. Nur beim Holoenzym konnte AC-Aktivität nachgewiesen werden (Tab. 4-5). Versuche mit einer weiteren Holoenzymverkürzung CyaB1₁₋₇₈₁ (Daten nicht gezeigt) waren ebenfalls negativ.

³⁶ Diese Konstrukte wurden im Laborjournal auch als J25, J14 und J12 bezeichnet.

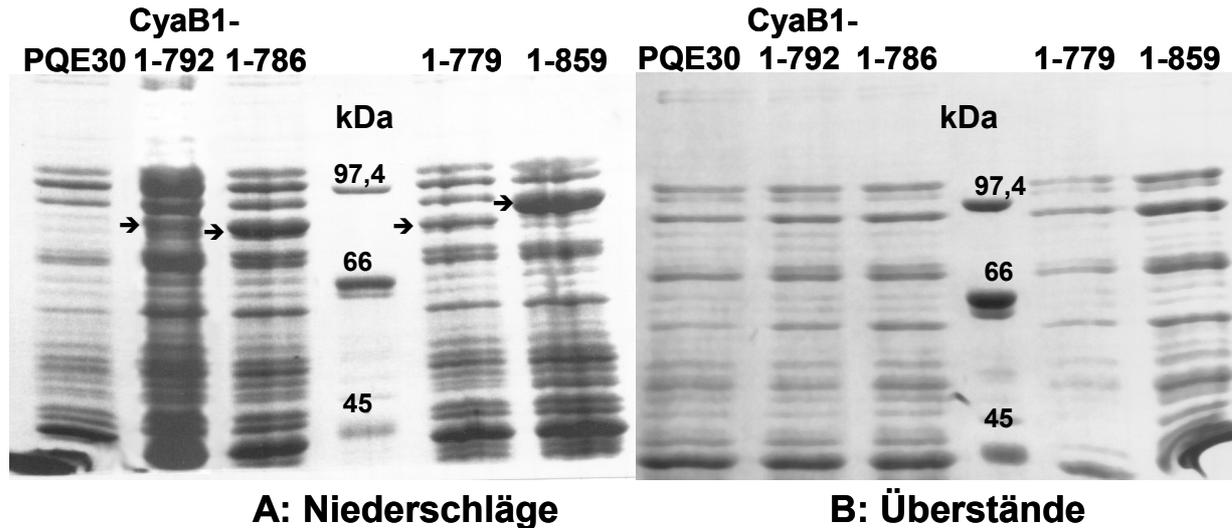


Fig.4-23: SDS-Page der unlöslichen **A)** und löslichen **B)** Proteinfractionen der Holoenzymverkürzungen im Vergleich mit *pQE30* als Negativ- und Holoenzym als Positivprobe. Die Niederschläge der Verkürzungen und des Holoenzym zeigen Banden mit unlöslichen überexprimierten Proteinen (Pfeile).

Tab. 4-5: Spezifische AC-Aktivität löslicher Protein-Fractionen der exprimierten Holoenzymverkürzungen und der Negativ- und Positivkontrolle (*pQE30* Leervektor und Holoenzym).

	<i>pQE30</i>	CyaB1 ₁₋₇₇₉	CyaB1 ₁₋₇₈₆	CyaB1 ₁₋₇₉₂	Holoenzym
Spezifische Aktivität (pmol cAMP • mg ⁻¹ • min ⁻¹)	2,7	5,1	2,0	3,7	785,2

4.3.2 Coexpression von CyaB1₅₉₅₋₇₈₆/CyaB1₇₈₆₋₈₅₉ im RTS500

Es wurde untersucht, ob die Faltungsprobleme des katalytischen Zentrums ohne TPRL durch gleichzeitige Expression der TPRL-Domäne im selben Reaktionsansatz gelöst werden können. TPR-Protein-Wechselwirkungen können bei der kotranslationellen Faltung von Proteinen eine Rolle spielen (Lamb et al., 1995). Wenn die TPRL-Domäne durch Rückfaltung die katalytische Domäne stabilisiert, könnten sich lösliche und aktive Assoziationsprodukte aus beiden bilden. Es wurde mit dem *RTS500-in-vitro*-Expressionssystem der Firma Roche gearbeitet. Die Funktionsfähigkeit des RTS500 wurde mit dem *pIVEX GFP*³⁷-Kontrollplasmid der Firma Roche und mit CyaB1₅₉₅₋₈₅₉, das in *pIVEX2.4c* kloniert wurde, getestet. Die Ausbeute an gereinigtem GFP lag mit 90 µg unter den Herstellerangaben (300-500 µg). Von *pIVEX-CyaB1*₅₉₅₋₈₅₉ (10 µg Plasmid-DNA im Reaktionsansatz, Expressionsdauer 15 h) konnte 30 µg aktives Protein gereinigt werden, während ein Großteil des Expressionsproduktes unlöslich war.

Zunächst wurde geprüft, ob in der *in vitro* Expression die C-terminale Verkürzung des katalytischen Zentrums *pIVEXCyaB1*₅₉₅₋₇₈₆ ähnlich schlecht exprimierbar war wie *in vivo*. Es wurde

³⁷ Der Vektor enthält ein Gen für *green fluorescent protein*.

mit 10 µg Plasmid 15 Stunden exprimiert. Nur im unlöslichen Rückstand war ein Expressionsprodukt sichtbar (Fig.4-26 A). Im Eluat einer *NiNTA*-Reinigung wurde per *Western Blot* mit Immunodetektion durch HexaHis-tag-Antikörper kein Protein gefunden (Fig.4-26 B). Ein AC-Test zeigte keine Aktivität. Auch nach der Coexpression mit je 7,5 µg Plasmid-DNA von *pIVEXCyaB1₅₉₅₋₇₈₆* und *pIVEXCyaB1₇₈₆₋₈₅₉* (codiert für die TPRL-Domäne) konnte nur unlösliches Protein bei 20 kDa und bei 10 kDa nachgewiesen werden (Berechnetes MG: CyaB1₅₉₅₋₇₈₆ = 23,8 kDa und CyaB1₇₈₆₋₈₅₉ = 11,0 kDa; Pfeil in Fig.4-24 A und B). AC-Aktivität war nicht messbar.

Da die katalytische Domäne von CyaB1 auch bei gleichzeitiger Expression der TPRL-Domäne nicht funktionell ist und die TPRL-Domäne selbst nicht löslich exprimierbar ist, stellt CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ wahrscheinlich die minimale katalytische Einheit dar.

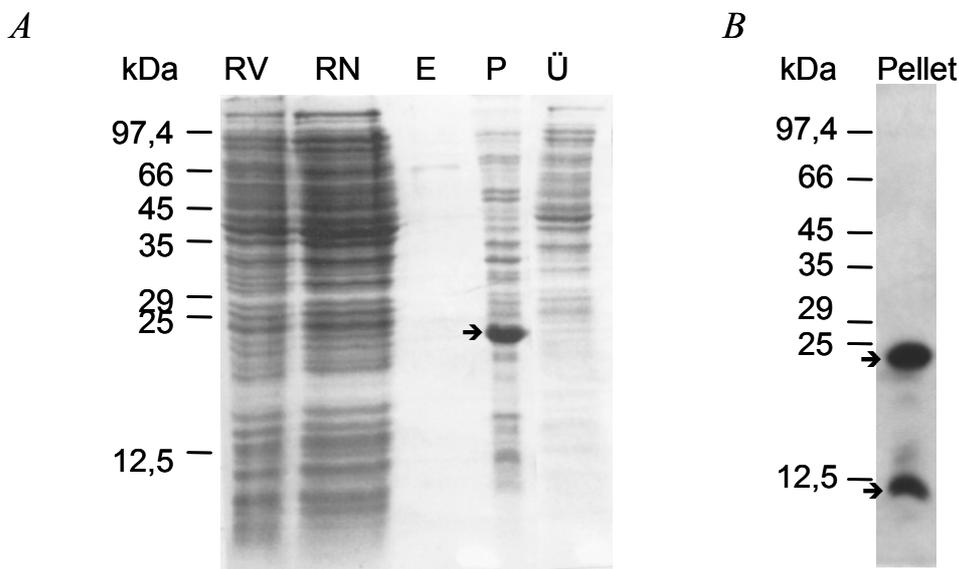


Fig.4-24: SDS-PAGE **A)** Expressionsversuche mit RTS500 von *pIVEXcyaB1₅₉₅₋₇₈₆* allein; **B)** *Western Blot* der Coexpression mit *pIVEXCyaB1₇₈₆₋₈₅₉*. In **A)** sind je 6 µl Reaktions-Lösung vor Expression (RV), nach Expression (RN), der lösliche Zentrifugationsüberstand (Ü) und 20 µl vom Eluat (E) der *NiNTA*-Reinigung aufgetragen. Das Zentrifugationspellet der Reaktionslösung nach beendeter Reaktion (P) wurde in 50 µl SDS Probenpuffer aufgenommen mit 50 µl H₂O verdünnt und davon 3 µl aufgetragen. **B)** Im *Western Blot* der Coexpression (Auftragung wie in A) wurde rekombinantes Protein nur im Pellet detektiert. Pfeile markieren die unlöslichen Proteine.

4.3.3 Versuche zur Abtrennung des C-Terminus auf Proteinebene mit Faktor-Xa Verdau

Da die C-terminale TPRL-Domäne für die Expression von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ unverzichtbar war, wurde zur Untersuchung ihrer Funktion versucht, das Pferd quasi von hinten aufzuzäumen und die TPRL-Domäne vom fertigen Protein abzuschneiden. Es wäre denkbar, dass die TPRL-Domäne entweder mit der katalytischen Domäne assoziiert und einen stabilen Komplex bildet oder nur für die Proteinfaltung analog einem Chaperonin notwendig ist.

Es wurde eine Faktor-Xa-Protease-Schnittstelle in den *Linker*-Bereich zwischen katalytischer Domäne und C-Terminus eingefügt. Sollte die TPRL-Domäne an das katalytische Zentrum fest

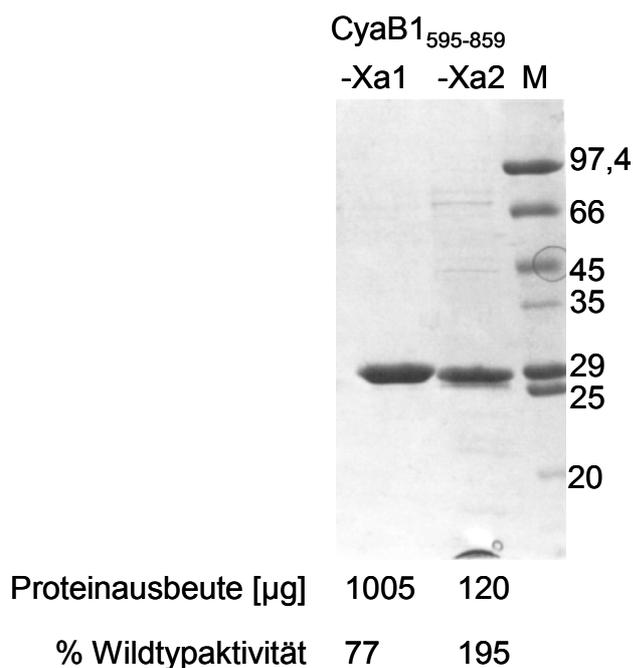


Fig.4-26: SDS-PAGE von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa1 und -Xa2. Darunter sind die Proteinausbeuten von 200 ml *E. coli*-Expressionskultur und die spezifischen Aktivitäten relativ zum Wildtyp angegeben. 100 % Aktivität entsprechen 392 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹ (75 µM Mn-ATP, 4 min bei 45 °C in MOPS/NaOH pH 8,5). Rechts: Markerproteine

4.3.3.2 Faktor-Xa Verdau von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa1 und CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa2

Die Aktivität von Faktor-Xa-Protease im 20 %-glycerolhaltigen Lagerungspuffer von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa1/-Xa2 wurde mit einem von der Firma Calbiochem mitgelieferten Kontrollprotein nachgewiesen (Fig.4-27 A). Dann wurden entsprechende Versuche mit CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa1 und CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa2 bei verschiedenen Faktor-Xa-Konzentrationen, Inkubationszeiten und -temperaturen probiert. Auch bei hohen Faktor-Xa-Mengen (0,4 U/µg Protein bei 22 h Inkubation) ist weder bei CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa1 noch bei CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa2 ein Verdau des Proteins erkennbar (Fig.4-27 B). Letzteres ist nach der Inkubation (20 °C mit 0,1 U Faktor-Xa/µg Protein) größtenteils als unlösliches Aggregat ausgefallen, während bei 0,2 U Faktor-Xa/µg Protein noch Protein in der löslichen Fraktion des Inkubationsansatzes sichtbar ist (schwarzer Pfeil in Fig.4-27 B). CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa1 zeigte unter diesen Bedingungen unabhängig von der Anwesenheit des Faktor-Xa keine Aggregation.

Da die beiden Konstrukte nicht mit Faktor-Xa verdaut werden konnten, musste angenommen werden, dass die Schnittstelle für die Protease an zentraler, unzugänglicher und von anderen Regionen abgeschirmter Stelle des Proteins liegt. Die korrekte Faltung von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ zu einem kompakten Protein ist offensichtlich von der TPRL-Domäne abhängig. Dabei wird der *Linker*-Bereich von außen unzugänglich.

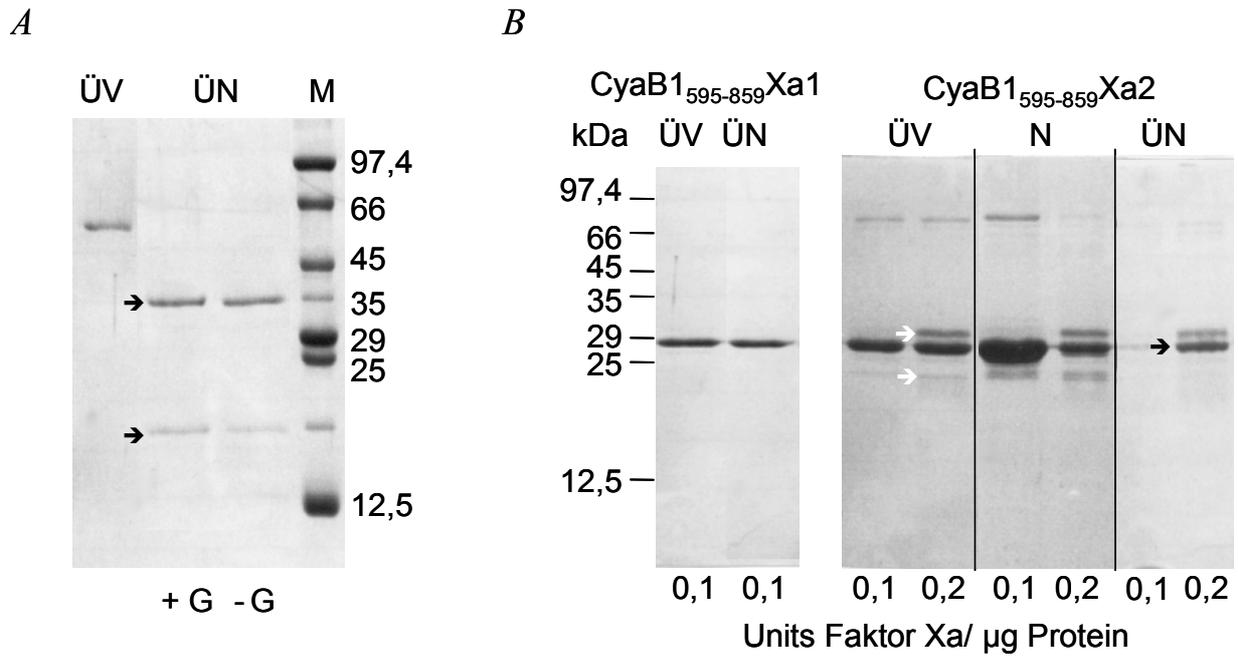


Fig.4-27: A) SDS-PAGE des Kontrollproteins (54 kDa, 10 µg eingesetzt) vor (ÜV) und nach Verdau (ÜN) mit Faktor-Xa (0,05 U /µg Protein). 22 h Inkubation bei 20 °C ohne (-G) und mit 20 % Glycerol (+G). **B)** Verdau von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa1 und -Xa2 mit großen Mengen Faktor-Xa [erscheint als zusätzliche Banden im Überstand vor Verdau (weiße Pfeile)]. Im unlöslichen Niederschlag nach Verdau (N) erscheint aggregiertes CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa2 verstärkt bei niedrigeren Faktor-Xa-Mengen. Mit 0,2 U Faktor-Xa /µg Protein bleibt CyaB1₅₉₅₋₈₅₉Xa2 im Überstand nach Verdau (schwarzer Pfeil in ÜN). Inkubation wie in A aber mit 0,1-0,2 U Faktor-Xa.

4.4 Charakterisierung des Holoenzym

CyaB1 besitzt N-terminal zwei tandemartig angeordnete GAF-Domänen (Fig.4-1) die als GAF-A und GAF-B bezeichnet werden. Ein Alignment mit den GAF-Domänen der Ratten PDE-2 zeigt deutlich konservierte Sequenzbereiche (Fig.4-28). Die GAF-A-Domänen von Ratte und CyaB1 sind zu 27 % identisch und 35 % ähnlich. Die GAF-B-Domänen zeigen 40 % Identität und 48 % Ähnlichkeit zueinander. Bemerkenswert ist auch die Konservierung des NKX_nFX₃DE-Motivs in den GAF-A und -B Domänen von Ratte und CyaB1 (mit — markiert in Fig.4-28). Es wurde angenommen, dass dieses Motiv für die cGMP-Bindung essentiell ist und cGMP als Liganden spezifiziert (Turko et al., 1996). Bei PDE-5 führten Punktmutationen des Asp zu einem Verlust der cGMP Bindung der entsprechenden GAF-Domäne (McAllister-Lucas et al., 1995). Bei PDE-2, -5 und -6 reguliert cGMP allosterisch über Bindung an die GAF-Domänen die Enzymaktivität (Ho et al., 2000). Interessanterweise fehlt einer kürzlich kristallisierten Hefe-GAF-Domäne dieses Motiv und die cGMP-Bindung (Ho et al., 2000).

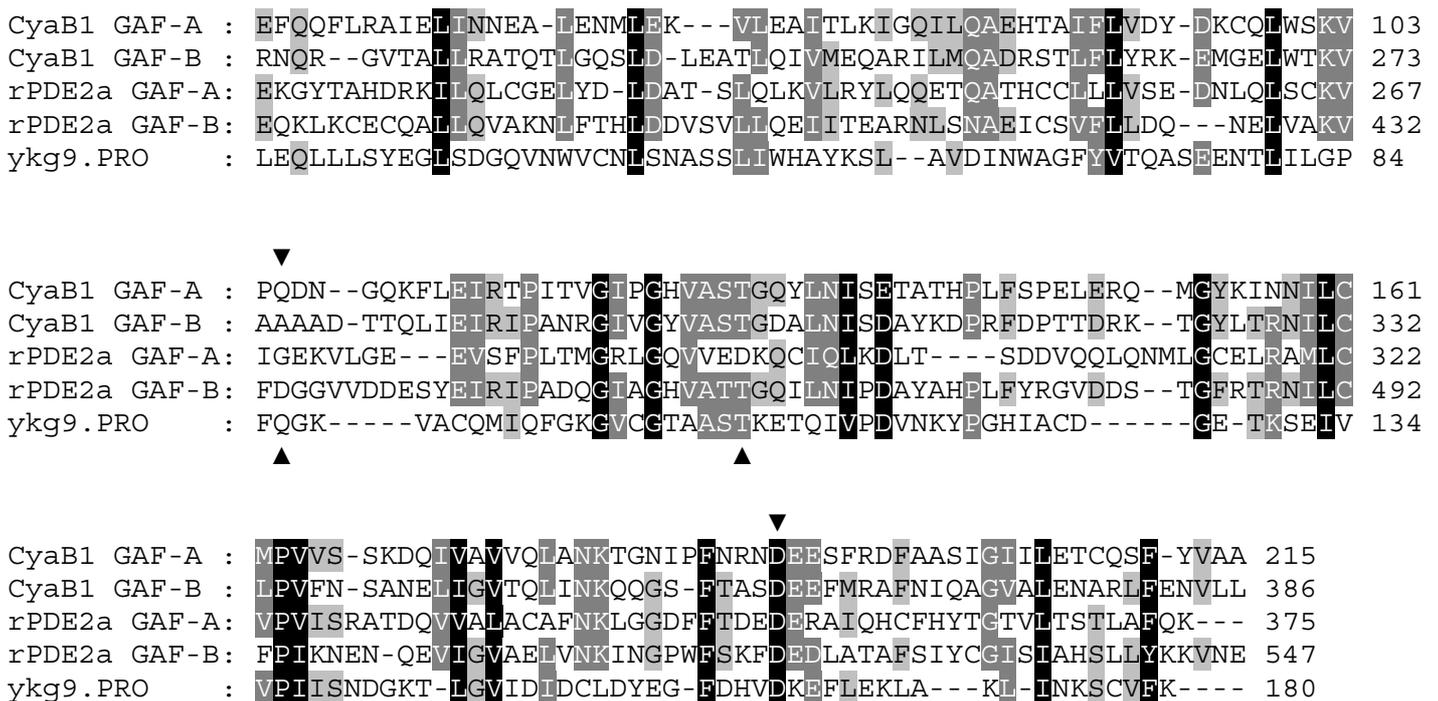


Fig.4-28: Sequenzalignment der GAF-A und -B-Domänen von CyaB1 mit den entsprechenden der Ratten-PDE-2a und der YKG9-GAF-Domäne aus der Hefe, deren Kristallstruktur beschrieben ist (Ho et al., 2000). In CyaB1 wurden Punktmutationen (▼ Q105D und D190A in GAF-A, sowie A275D und D360A in GAF-B) eingeführt. Die Balken in der Unterzeile markieren ein in den GAF-Domänen aus CyaB1 und PDE-2, -5, und -6 hochkonserviertes NKX_nFX₃DE Motiv, das in YKG9 fehlt. Nach einer neuen Kristallstruktur sind D434 und T460 (▲ in der Unterzeile) für die Purinspezifität der PDE-2a verantwortlich (Martinez et al., 2002). Invers schwarze Schattierung kennzeichnet 100 %, dunkelgrau 80 % und hellgrau 60 % Ähnlichkeit.

4.4.1 Expression und Reinigung

Die Expression und Reinigung des Holoenzym war schwieriger als von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉. Unter suboptimalen Expressions-Bedingungen (identisch mit denen für CyaB1₅₉₅₋₈₅₉) wurden >90 % in *inclusion bodies* gefunden. Nur 3 µg Protein/200 ml *E. coli*-Kultur konnte gereinigt werden.

Diese hatten aber beträchtliche AC-Aktivität (160 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹). Die Expressions- und Reinigungsbedingungen wurden für CyaB1 optimiert (Fig.4-29):

- Reduktion der IPTG Konzentration beim Induzieren auf 15 µM,
- Absenkung der Expressionstemperatur auf 20 °C,
- Verlängerung der Expressionszeit auf 20 Stunden,
- Verdreifachung des *E. coli*-Kulturvolumens auf 600 ml pro Reinigungsansatz,
- Inkubation des in Zellysepuffer resuspendierten Expressionspellets mit Lysozym für etwa eine Stunde vor einer Ultraschallbehandlung,
- Zusatz von 20 % Glycerol zu den Zellysis- und Reinigungspuffern.

Damit wurde die Ausbeute verzehnfacht. Die spezifische Aktivität wurde auf 2 µM cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹ gesteigert (AC-Assay mit 5,2 nM gereinigtem Holoenzym bei 37 °C, pH 7,5 mit 75 µM Mg-ATP in Gegenwart von 100 µM cAMP). Weitere Expressionsversuche mit dem *RTS500* und den Vektoren *pIVEX2.4a*, *b* und *c* ergaben Proteinmengen, die zu gering waren, um per *BioRad* ermittelt zu werden.

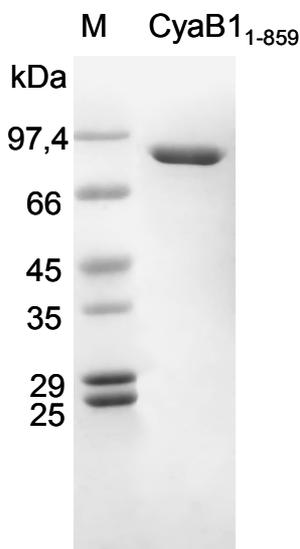


Fig.4-29: SDS-PAGE des gereinigten Holoenzym (2 µg Protein). Links: Markerproteine.

4.4.2 Proteinabhängigkeit

Die Proteinabhängigkeit mit Mn²⁺ oder Mg²⁺ als Cofaktor zeigte einen Anstieg der spezifischen Aktivität mit der Proteinmenge (Fig.4-30). Allerdings war der Anstieg steiler als bei CyaB1₅₉₅₋₈₅₉. Mit Mg-ATP wurden etwa 15fach höhere spezifische Aktivitäten erreicht als mit Mn-ATP

(nicht gezeigt). Diese für ACn ungewöhnliche Effizienz von Mg^{2+} als Cofaktor für die Katalyse wurde auch bei der kinetischen Charakterisierung festgestellt (s. u.).

Der steile Anstieg der Enzymaktivität lässt sich entweder durch die Dimerisierung oder mit einer Produktaktivierung erklären, da im Bereich des steilen Aktivitätsanstiegs von 5 bis 50 nM Protein entsprechend 0,13 bis 23,3 μ M cAMP während der Inkubationszeit gebildet wurde (s. Fig.4-30 und vgl. 4.4.7). Ein Zusatz von 100 μ M cAMP vor Reaktionsstart linearisierte die Proteinabhängigkeit, als wäre das Holoenzym schon in den kleinsten messbaren Konzentrationen als Dimer aktiv. Schon in früheren Versuchen mit teilgereinigten Extrakten fand PD Dr. J. Linder Hinweise auf eine Aktivierung des Holoenzym durch cAMP (persönliche Kommunikation), die mit hochgereinigtem Protein bestätigt wurden. Anfangs war jedoch unklar, ob der interne 2 mM 3 H-cAMP-Standard das Holoenzym aktiviert, oder eventuell als Verunreinigung vorhandene Phosphodiesterasen kompetitiv hemmt. Phosphodiesterasen können selbst in Spuren das zugesetzte oder im AC-Test gebildete cAMP zu 5'AMP abbauen und ihre Hemmung könnte vermeintlich gesteigerte cAMP-Umsätze vortäuschen. Ein Phosphodiesterase-Test des gereinigten Proteins konnte Phosphodiesterase-Aktivität ausschließen. In Standardtests wurde die Holoenzym-Aktivität unter maximal aktivierten Bedingungen (mit 100 μ M cAMP) gemessen, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Ob cAMP das Holoenzym allosterisch aktiviert oder die Dimerisierung der einzelnen inaktiven Monomere steigert oder beides, wurde mit Zeitabhängigkeit (vgl. 4.4.5), kinetischen Untersuchungen des Holoenzym (vgl. 4.4.6) und Studien mit Chimären aus den regulatorischen Domänen von Anabaena und der katalytischen Domäne der AC Rv1625c weiter untersucht (vgl. 4.6.2).

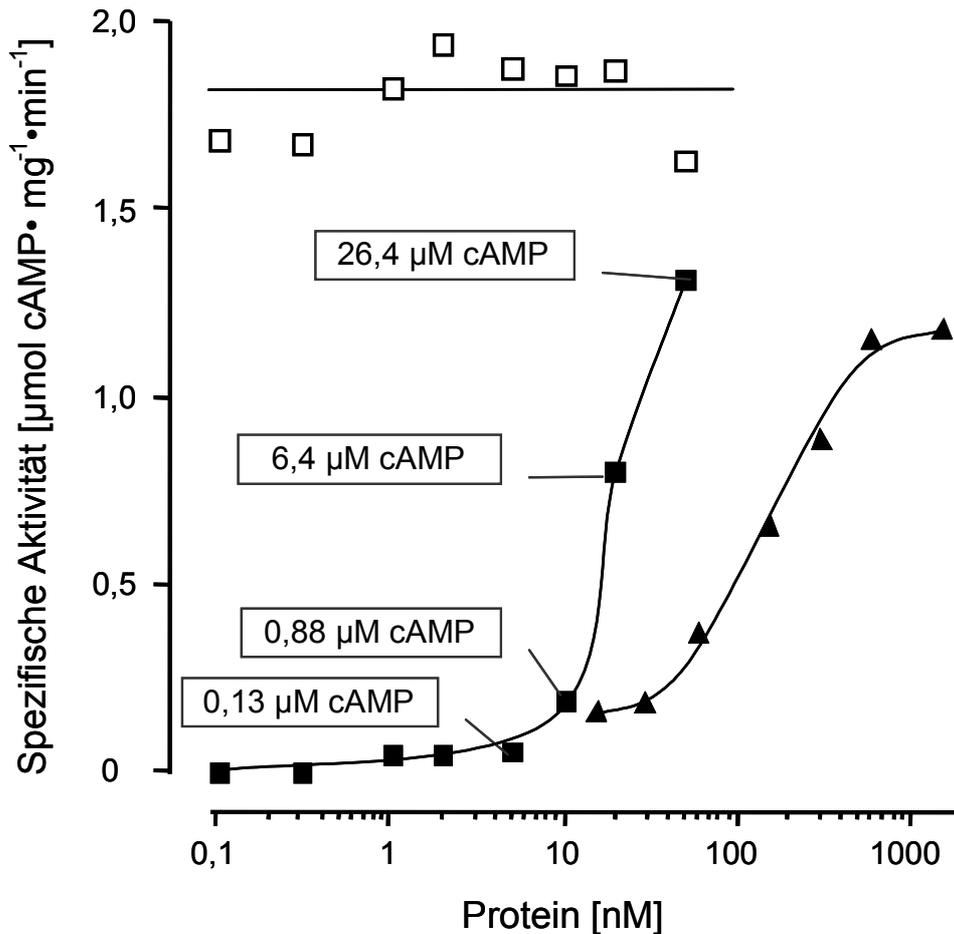


Fig.4-30: Vergleich der Proteinabhängigkeiten des Holoenzym (mit Mg-ATP bei pH 7,5 und 37 °C) ohne (\blacksquare) und mit (\square) Zusatz von 100 μM cAMP und der des katalytischen Zentrums CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ (\blacktriangle , mit Mn-ATP bei pH 8,5 und 45 °C). Im Bereich des steilen Aktivitätsanstiegs beim Holoenzym ohne cAMP sind die im Test gebildeten cAMP-Mengen in Kästen angegeben.

4.4.3 Temperaturoptimum

Die optimale Reaktionstemperatur des Holoenzym (Reaktionsbedingungen: 75 μM Mn-ATP, 5 min in TRIS/HCl pH 7,5 und Gegenwart von 100 μM cAMP; Daten nicht gezeigt) liegt mit 40 °C um 8 °C niedriger als bei CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ (s. 4.1.4). Die Aktivierungsenergie ist mit 65 kJ/mol ebenfalls etwas niedriger als bei CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ (97 kJ/mol).

4.4.4 pH-Optimum

Im Unterschied zu CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ ist die Aktivität in Gegenwart von 100 μM cAMP bei pH 7,5 optimal. Sie ist deutlich vom Puffersystem abhängig (Fig.4-31). In TRIS-HCl pH 7,5 wurden die höchsten Aktivitäten gemessen, während sie mit MES und HEPES bei gleichen pH-Werten um 60 % und 70 % geringer waren. Weitere Tests mit MOPS und TES zeigten ebenfalls verminderte Aktivitäten. Diese Substanzen gehören zu den sogenannten *Good's buffers* (Good and Izawa,

1972). Das sind Zwitterionen mit hoher Pufferkapazität im physiologischen Bereich. MES, TES, HEPES und MOPS enthalten eine Sulfongruppe, die vielleicht in das komplexe Zusammenspiel zwischen den einzelnen Holoenzym-Proteindomänen eingreift.

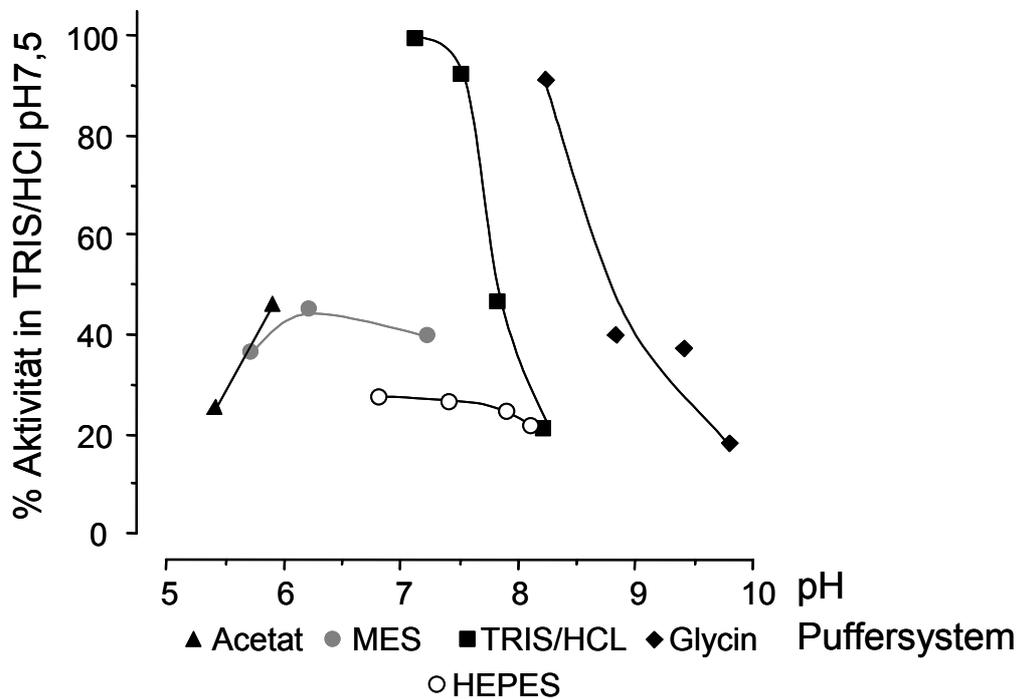


Fig.4-31: Die pH-Abhängigkeit des Holoenzym in verschiedenen Puffersystemen. 100 % Aktivität entsprechen 109 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹ (75 μM Mn-ATP, 5 min bei 37 °C)

4.4.5 Zeitabhängigkeit

Die Zeitabhängigkeit der Umsetzung von ATP zu cAMP (Cofaktor Mg²⁺ oder Mn²⁺) durch das Holoenzym zeigt eine Beschleunigung der cAMP-Synthese (Fig.4-32 A). Zusatz von 100 μM cAMP linearisierte die Zeitabhängigkeit. Berechnet man die spezifische AC-Aktivität für die jeweiligen 1-Minuten-Intervalle, ist ein exponentieller Anstieg zu erkennen (Fig.4-32 B). Da eine störende Verunreinigung durch Phosphodiesterasen im gereinigten Protein ausgeschlossen werden kann, kommt nur das entstandene cAMP als Aktivator in Frage (das ebenfalls entstehende PP_i hemmt CyaB1, siehe Fig.4-15). Die cAMP-Konzentration stieg mit 7,6 nM Holoenzym und Mg-ATP während 10 Minuten Inkubationszeit von 0 bis 1,2 μM (vgl. auch die cAMP-Dosiswirkungskurven in 4.4.7). Mit Mn-ATP wurden entsprechende cAMP Mengen von 102 nM Holoenzym produziert. Um vergleichbare Aktivierung durch das gebildete cAMP zu bekommen, musste die Proteinmenge dem stark unterschiedlichen Reaktionsumsatz mit dem jeweiligen Cofaktor angepasst werden.

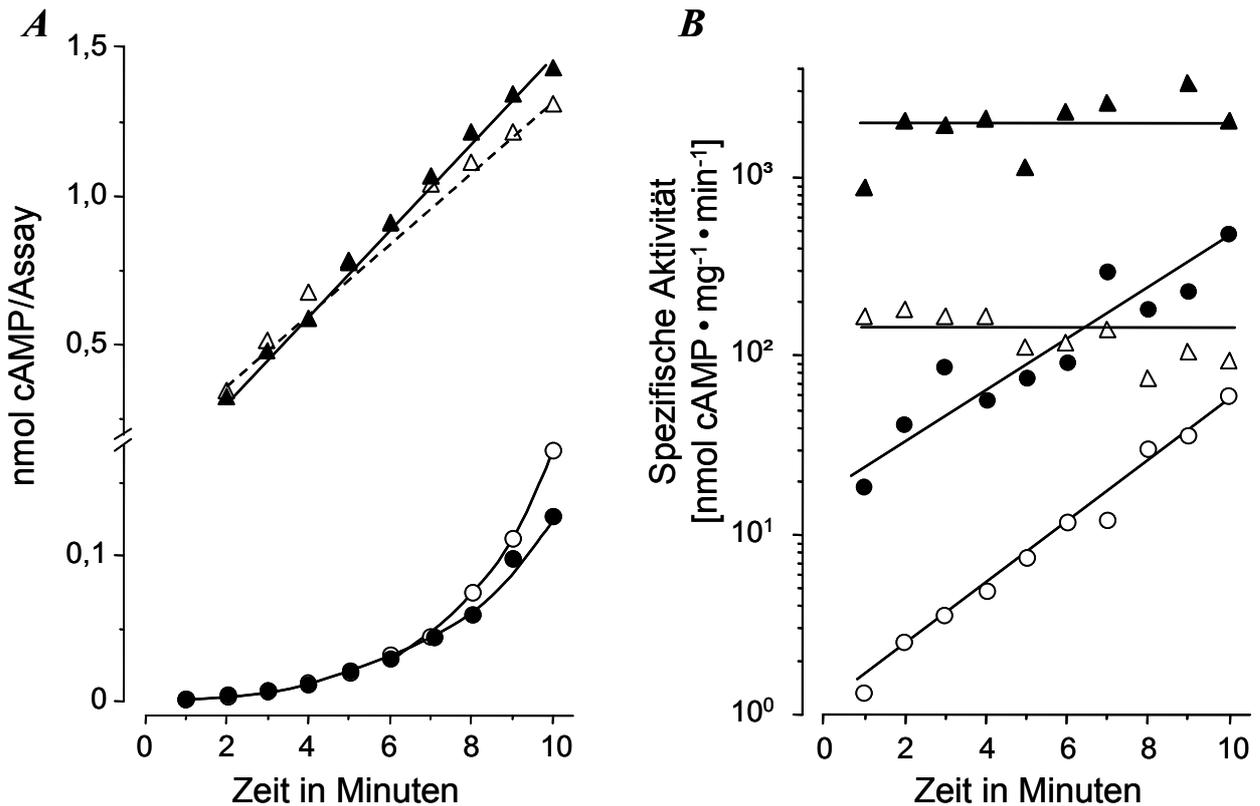


Fig.4-32: A) Zeitabhängigkeit von CyaB1₁₋₈₅₉. **B)** Zeitabhängigkeit der spezifischen Aktivitäten. Als Cofaktor wurde Mn²⁺ (○ ohne und △ mit 100 μM cAMP) und Mg²⁺ (● ohne und ▲ mit 100 μM cAMP) verwendet.

4.4.6 Kinetik

Die Substratkinetik mit Mg-ATP und Mn-ATP wurde mit und ohne 100 μM cAMP als Aktivator bestimmt. Die Inkubationszeit (4 min) und die Proteinmengen wurden so gewählt, dass eine Produktaktivierung minimiert wurde und der ATP-Umsatz unter 15 % lag. Der K_M -Wert für Mn-ATP ist niedriger als für Mg-ATP und durch Zusatz von 100 μM cAMP kaum verändert. Gleichzeitig steigt V_{max} aber um das 20-25fache (siehe Tab. 4-6). V_{max} ist mit Mg-ATP fünfmal höher als mit Mn-ATP. Das ist für ACn ungewöhnlich³⁸. Das Verhältnis V_{max}/K_M ist für beide Cofaktoren gleich und wird durch cAMP-Zusatz um das 25fache erhöht. Dies zeigt, dass die katalytische Effizienz für beide Cofaktoren gleich ist. Der Hill-Koeffizient ist unter allen Bedingungen etwa 1, so dass von keiner Kooperativität der katalytischen Zentren ausgegangen werden kann.

³⁸ Für eine AC aus *B. Liquefaciens* wurde eine höhere Aktivität mit Mg-ATP postuliert (Takai et al., 1974).

Tab. 4-6: Kinetische Charakterisierung des Holoenzym CyaB1₁₋₈₅₉. Testbedingungen: 1-120 μM ATP, 4 min bei 37 °C in TRIS/HCl pH 7,5

	$K_M(\text{ATP})$ (μM)	V_{max} (nmol/mg/min)	V_{max}/K_M	Hill Koeffizient	Protein (nM)
10 mM Mg^{2+}	38	84	2,2	1,0	5,2
2 mM Mn^{2+}	11	24	2,2	1,1	15
10 mM Mg^{2+} + 100 μM cAMP	24	2244	94	1,1	5,2
2 mM Mn^{2+} + 100 μM cAMP	4	479	120	1,0	5,2

4.4.7 Aktivierung durch cAMP und cGMP

Mit Dosiswirkungskurven konnte die cAMP-Aktivierung von CyaB1, die durch die Protein- und Zeitabhängigkeit bewiesen wurde, bestätigt werden. Gleichzeitig zeigen sie die Spezifität im Vergleich zu cGMP (Fig.4-33). Mit Mg^{2+} als Cofaktor werden beide Nukleotide hervorragend diskriminiert: EC_{50} von 1 μM cAMP gegenüber 300 μM cGMP. Mit Mn-ATP erscheint die cAMP Dosiswirkungskurve biphasisch mit einem ersten Maximum bei 100 μM , während mit cGMP keine nennenswerte Stimulierung erkennbar war.

Es ist sichtbar, dass die cAMP-Konzentrationen, die durch das Enzym in der Messung zur Zeit- und Proteinabhängigkeit gebildet wurden und (s. 4.4.2 und 4.4.5) mit dem Ausmaß der Stimulation exakt korrelierten.

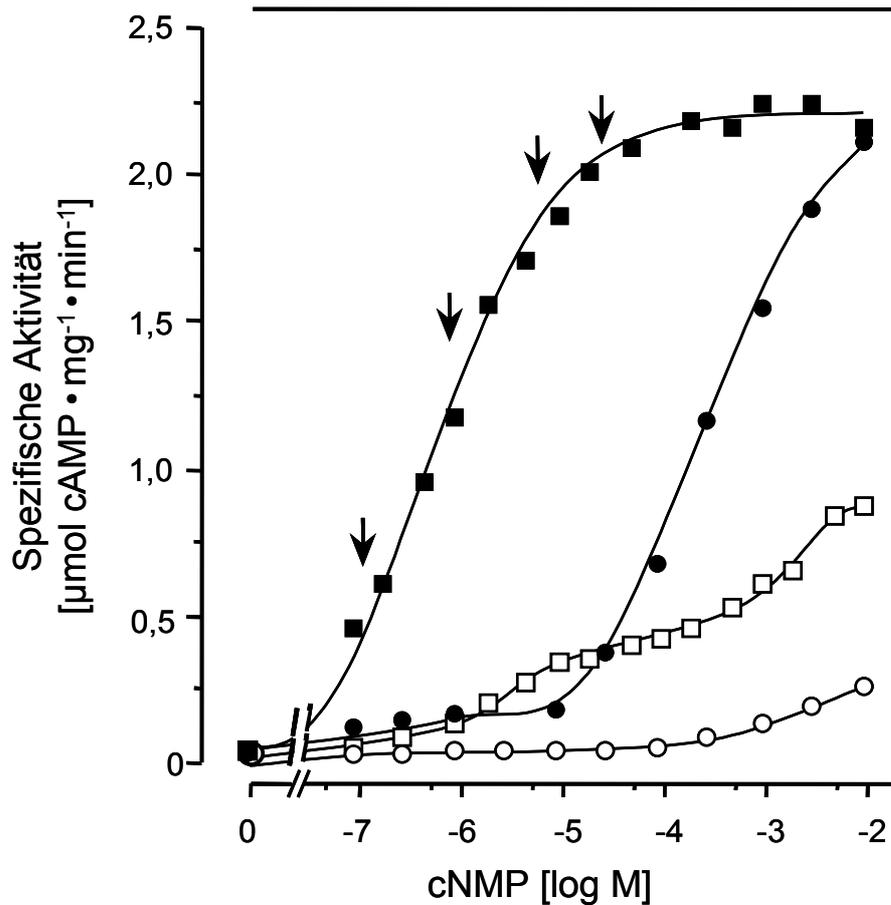


Fig.4-33: Dosis-Wirkungskurve vom Holoenzym mit cAMP (■ mit Mg^{2+} und □ mit Mn^{2+} als Cofaktor) und cGMP (● mit Mg^{2+} und ○ mit Mn^{2+}). Die Pfeile markieren die bei der Messung der Proteinabhängigkeit gebildeten cAMP-Konzentrationen (0,13, 0,88, 6,4 und 26,4 μM). Testbedingungen: 75 μM ATP, 4 min, 37 °C, TRIS/HCl pH 7,5.

4.4.8 Lagerung und Stabilität

Wie bei *CyaB1₅₉₅₋₈₅₉* erwies sich auch beim Holoenzym ein Zusatz von 20 % Glycerol und eine Lagerung bei -25 °C als optimal. Höhere Lagertemperaturen sind weniger gravierend für die Aktivität (Fig.4-34), als bei *CyaB1₅₉₅₋₈₅₉* (vgl. 4.1.2).

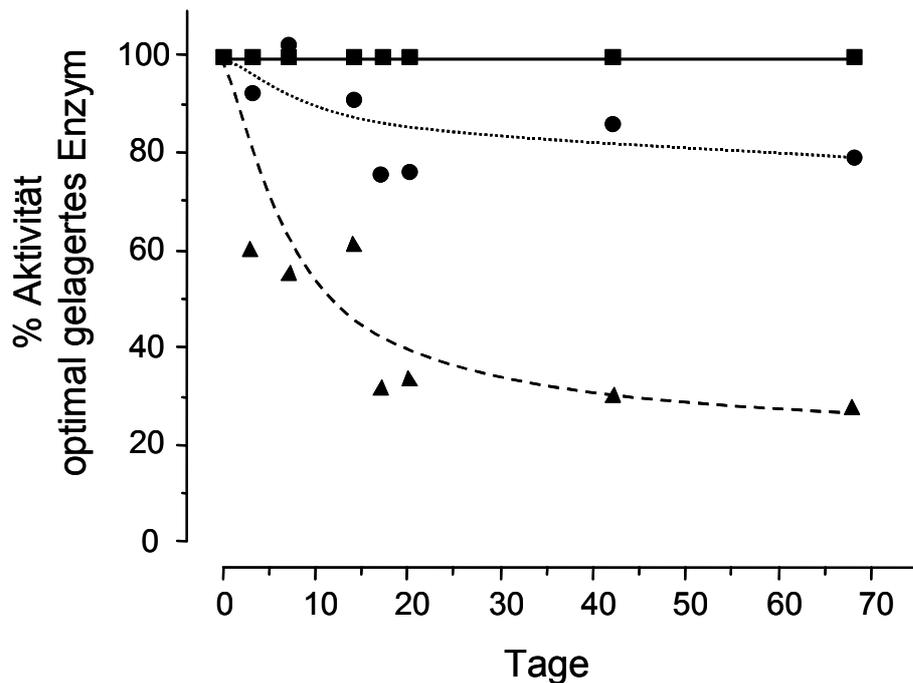


Fig.4-34: Aktivitätsabnahme von CyaB1 nach Lagerung mit 20 % Glycerol bei 4 °C (●), bei 20 °C (▲) und bei -25 °C (■). Die Daten der Aktivitätsmessungen wurden über einen langen Zeitraum mit zwangsläufig stark differierender ^{32}P -ATP-Chargen unterschiedlicher Hersteller durchgeführt. Wegen besserer Vergleichbarkeit wurden sie auf die Aktivität des stets mitgetesteten optimal gelagerten Enzyms normalisiert. 100 % Aktivität entsprechen $132 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($75 \mu\text{M Mn-ATP}$, 4 min bei 37 °C in TRIS/HCl pH 7,5 in Gegenwart von $100 \mu\text{M cAMP}$).

4.4.9 Einfluss anderer Nukleoside und Nukleotidanaloga

Von weiteren Nukleotiden und -analoga, die in Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ und 1 mM auf ihren Effekt überprüft wurden, zeigten lediglich AMP und ADP einen schwachen aktivierenden Effekt (Tab. 4-7). In Dosis-Wirkungskurven mit ADP und AMP verdoppelte $100 \mu\text{M ADP}$ (Mn-ATP) die Aktivität (Fig.4-35). Allerdings erhöhen gleiche Konzentrationen cAMP die Aktivität 11fach (Mn-ATP) bzw. 30fach (Mg-ATP), was die enorme Nukleotidspezifität von CyaB1₁₋₈₅₉ verdeutlicht.

Die Hemmung durch Adenosin (P-Site-Inhibitor), GMP-PNP (Substratanalog für G-Proteine) und 2'3'GMP (P-Site Inhibitor von GCn) wurde nicht weiter untersucht, während die Hemmung durch den P-Site-Inhibitor 2'd,3'AMP im folgenden Abschnitt genauer dargestellt ist.

Tab. 4-7: Einfluss verschiedener Nucleotide und Nucleosidäquivalente auf CyaB1₁₋₈₅₉. 100 % Aktivität entsprechen 40 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹ (75 μM Mn-ATP, 4 min bei 37 °C in TRIS/HCl pH 7,5)

	% Basalaktivität bei Zusatz von	
	100 μM	1 mM
AMP	102	149
ADP	239	139
GMP	94	97
2'GMP	90	77
GMP-PNP	14	1
2'd,3'AMP	49	26
2'3'GMP	59	59
Adenosin	30	21
Inosin	93	91
Hypoxanthin	86	79

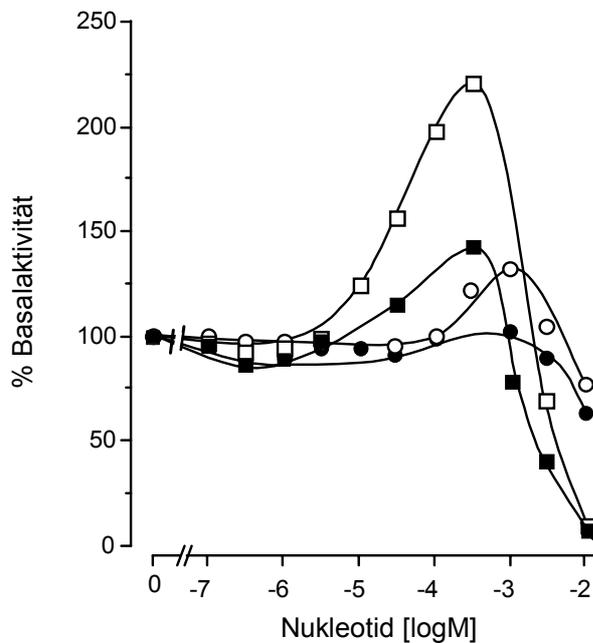


Fig.4-35: Unspezifische Aktivierung des Holoenzym durch AMP (● mit Mg²⁺ bzw. ○ mit Mn²⁺) und ADP (■ mit Mg²⁺ bzw. □ mit Mn²⁺ als Cofaktor). Bei Mg²⁺ als Cofaktor war die Basalaktivität 62 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹ und mit Mn²⁺ 30 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹ (75 μM ATP, 4 min bei 37 °C in TRIS/HCl pH 7,5).

4.4.10 Einfluss von 2'd,3'AMP

Das cAMP-stimulierte Holoenzym wird bei pH 7,5 ähnlich durch 2'd,3'AMP gehemmt wie CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ bei pH 8,5 (Fig.4-36A). Mit Punktmutationen im katalytischen Zentrum wurde deshalb untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der cAMP-Stimulation des Holoenzym und dem pH-Optimum von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ besteht.

Die Mutante CyaB1₅₉₅₋₈₅₉R732A war bei pH 7,5 gleichaktiv wie bei pH 8,5 und 2',3'AMP hemmte nicht (s. 4.2.2.4). Die entsprechende die Mutante CyaB1₁₋₈₅₉R732A sollte nicht cAMP-aktivierbar sein, wenn R732 an der cAMP-Stimulation ähnlich beteiligt wäre, wie am pH-Optimum von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉. Die gereinigte Mutante CyaB1₁₋₈₅₉R732A zeigte nur 25 % Wildtypaktivität (Fig.4-36 B). Die niedrige Basalaktivität war aber 100fach mit cAMP stimulierbar, d. h. die cAMP-Stimulation wurde durch den Verlust des Übergangszustandstabilisierenden R732 nicht beeinträchtigt.

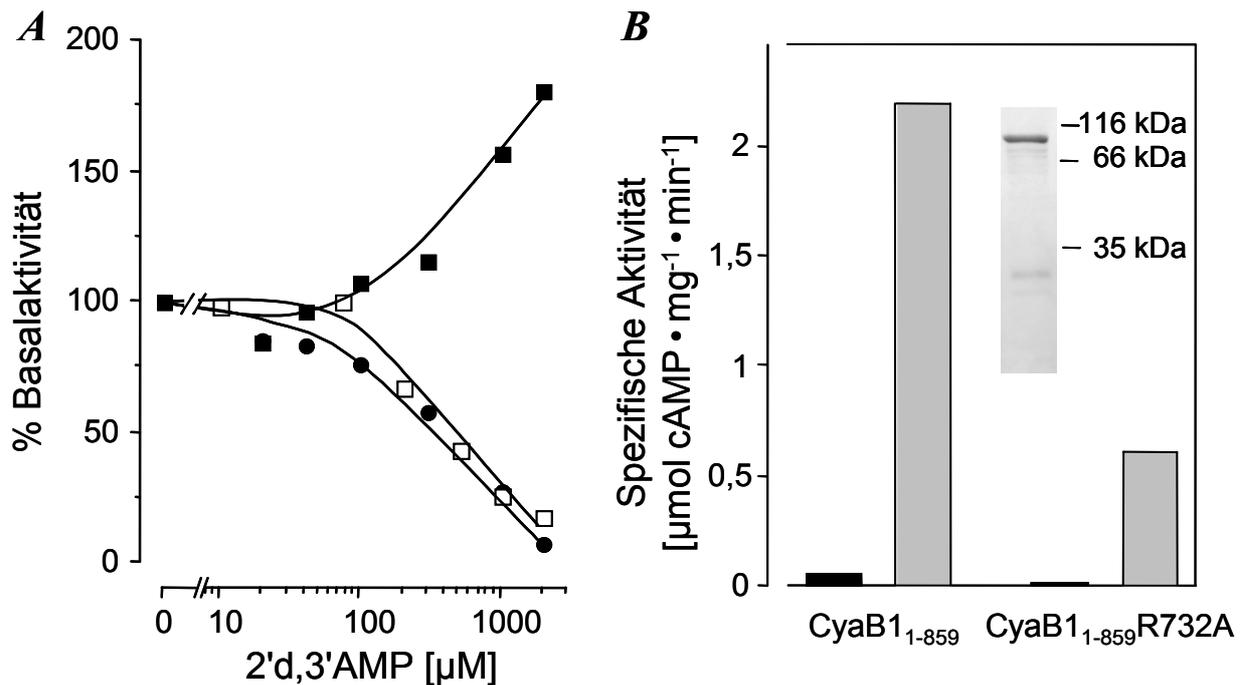


Fig.4-36: A) Hemmung des cAMP aktivierten Holoenzym CyaB1₁₋₈₅₉ durch 2',3'AMP (●). (100 % = 1,7 μmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹; Testbedingungen: 75 μM Mg-ATP, 37 °C, pH 7,5, 4 min). CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ wird bei pH 7,5 (■) aktiviert und 37 °C (100 % = 114 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹; Testbedingungen: 75 μM Mn-ATP, 37 °C, pH 7,5, 4 min) und bei pH 8,5 (□) gehemmt (100 % = 409 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹; Testbedingungen: 75 μM Mn-ATP, 45 °C, pH 8,5, 4 min). **B)** Vergleich der Aktivitäten ohne (schwarzer Balken) und mit 100 μM cAMP (grauer Balken) vom Holoenzym und dessen R732A-Mutante. Das Insert zeigt ein SDS-Page der gereinigten Mutante.

4.4.11 Gelfiltration des Holoenzym

Die Größenbestimmung des Holoenzym wurde per Chromatographie an einer Superdex 200 und Superose 6 HR 10/30 Säule durchgeführt. Der Trennbereich der Superdex 200 Säule (10-400 kDa) reichte nicht aus, da ein Doppelpeak ohne Basislinien-Trennung noch vor dem Ferritinpeak (440 kDa) eluierte. Bei Chromatographie mit Superose 6 (Trennbereich 5-5000 kDa) zeigt die OD₂₅₄-Kurve einen Peak mit einem Maximum bei 400 kDa und einer Schulter. Dies stimmte nicht mit der Aktivitätskurve überein, die zwei Maxima bei 320 kDa (Fraktion 19) und bei 170 kDa (Fraktion 26) hatte (Fig.4-37). Die Abweichung von der theoretischen Größe des CyaB1-Di- bzw. -Tetramers (196 und 392 kDa) wird durch Adsorptionseffekten an das Säulenmaterial und

einer langgestreckten Molekülform, die das Durchwandern des porösen Säulenmaterials verzögern könnte, erklärt. Die GAF-Domänen (und eventuell auch die PAS-Domäne) scheinen eine Funktion als Dimerisierungs- bzw. Tetramerisierungsdomäne zu haben, da CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ als Monomer eluierte (vgl. 4.1.10).

Die Unterschiede der OD₂₅₄-Kurve mit den Aktivitätsmaxima führte zur Vermutung, dass CyaB1 als Tetramer in zwei Konformationen mit unterschiedlicher enzymatischer Aktivität, einem anderen Absorptions-Koeffizient bei 254 nm und einer voneinander abweichenden Molekülform vorliegen könnte. Dabei deuteten die unterschiedlichen OD₂₅₄-Werte auf das Chromophor eines möglichen Liganden, der an das rekombinant exprimierte und gereinigte Protein gebunden ist, hin. Die Fraktionen wurden deshalb spektralphotometrisch untersucht, um diesen Liganden, der aus dem Produktionsbakterium *E. coli* stammen müsste, zu identifizieren.

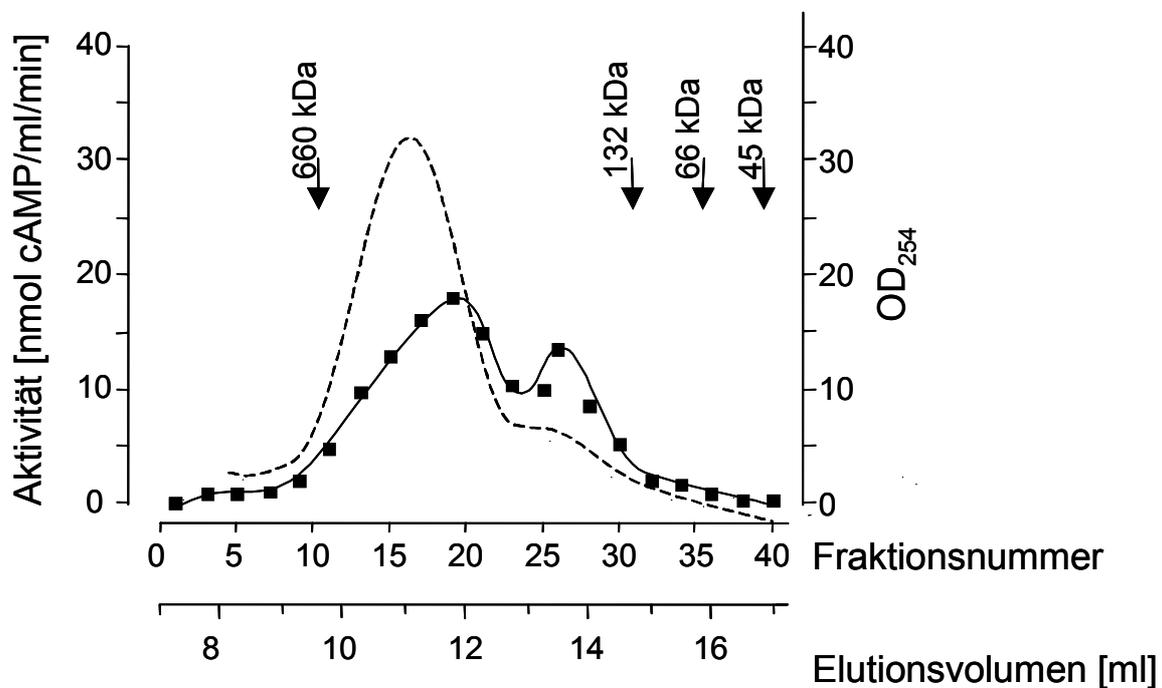


Fig.4-37: Chromatographie an Superose 6 HR 10/30 mit 0,56 µg/µl CyaB1 (Elution mit 0,3 ml/min FPLC-Puffers). Die Pfeile kennzeichnen die Elution der Markerproteine Ovalbumin (45kDa), BSA (66 kDa und 132 kDa als Dimer) und Thyreoglobulin (660 kDa). Cytochrom C (12,5 kDa) eluierte nach 20,6 ml. Ab 7 ml wurden Fraktionen zu 250 µl aufgefangen und auf AC-Aktivität getestet (10µl Probe, 75 µM Mg-ATP, 100 µM cAMP, pH 7,5 und 37 °C). Wegen besserer Übersichtlichkeit ist nur jeder zweite Messpunkt (■) dargestellt. Die Absorption bei 254 nm (-----) ist mitaufgetragen. Zehn Einheiten entsprechen einer OD₂₅₄ von 0,005.

4.4.11.1 Spektralphotometrische Untersuchung der Fraktionen

Die Proteinkonzentrationen der vereinigten Fraktionen 15-21 und 25-30 waren zu klein, als dass sie mit *BioRad* bestimmt werden konnten. Für die photometrische Untersuchung wurde ihr Volumen mit FPLC Puffer auf 2,4 ml ergänzt. Die Proben wurden in einer Quarzküvette (d = 1 cm) mit einem Zweistrahlphotometer gegen FPLC Puffer im Wellenlängenbereich von 220-500

nm vermessen. Das Absorptionsspektrum der Fraktionen 15-21 zeigt zwei Peaks mit Maxima bei 278 nm und 375 nm (Fig.4-38), das der Fraktionen 25-30 nur einen bei 270 nm. Eine Vergleichsmessung mit cAMP zeigt nur ein Maximum bei 272 nm und kann die Unterschiede der Spektren der Fraktionen 15-21 nicht erklären (Fig.4-39). Vergleiche mit FAD und NADH, die als Liganden für die PAS-Domänen in Frage kommen, zeigten allenfalls bei FAD (Maximas bei 275 nm, 380 nm und 460 nm) eine Übereinstimmung. Das letzte 460 nm Maximum fehlt bei den Fraktionen 15-21, was auf FADH hindeuten könnte. Ein Zusatz von 5 M Harnstoff als denaturierendes Agens konnte ebenso wenig eine Änderung im Spektrum des gereinigtem Holoenzym erreichen, wie Zusätze von 20 mM H₂O₂ oder 2 mM NaS₂O₃ als Oxidations- bzw. Reduktionsmittel. Damit bleibt die Existenz und Art eines potentiellen Liganden für CyaB1 ungeklärt.

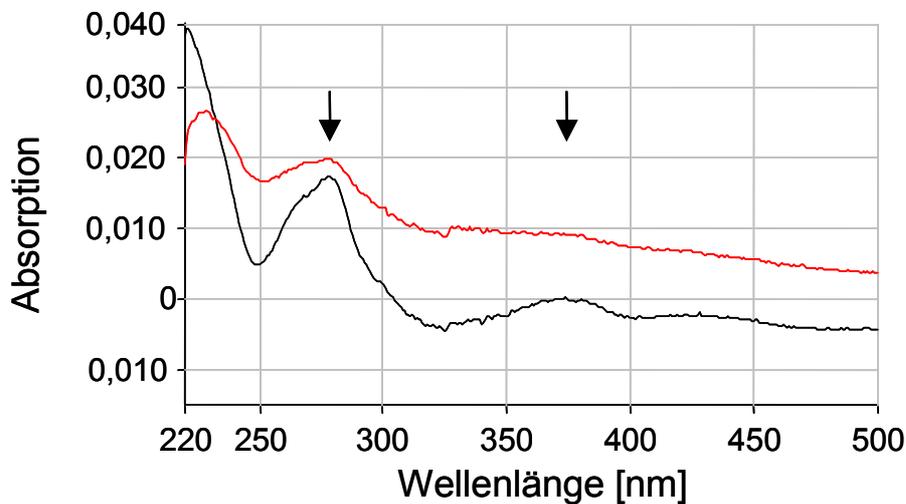


Fig.4-38: Spektrum der vereinigten Fraktionen 15-21 (—) und 25-30 (—). Die Pfeile heben die unterschiedlichen Maxima (278 und 375 nm) hervor.

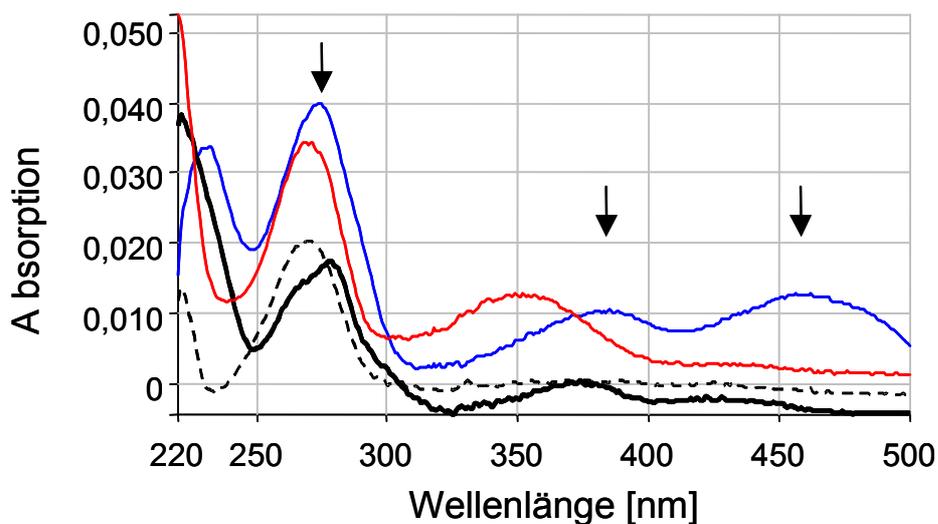


Fig.4-39: Vergleich der Fraktion 15-21 (—) mit Spektren von 1 µM cAMP (---), 2 µM NADH (—) und 1 µM FAD (—) in FPLC-Puffer. Die Pfeile heben die Maxima (275, 380 und 460 nm) bei FAD hervor.

4.4.11.2 Untersuchung der Enzymaktivität der Fraktionen

Es wurde untersucht, ob sich die Fraktionen 15-21 und 25-30 auch enzymatisch unterscheiden. Dazu wurde der Effekt von H_2O_2 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ und UV_{352} -Licht, die einen eventuell vorhandenen Liganden oder Chromophor der PAS-Domäne verändern könnten, untersucht. Die Proteinkonzentrationen waren zu gering um bestimmt zu werden, so dass keine spezifische Aktivität bestimmbar war. Relativ zur Basalaktivität wirkten alle Zusätze leicht hemmend und es ist kein unterschiedlicher Effekt auf die Fraktionen zu erkennen (Fig.4-40). Zusätze von 100-1000 μM FAD und Riboflavin (ebenfalls potenzielle PAS-Domänen-Liganden) hatten keinen Effekt auf das Holoenzym (nicht gezeigt).

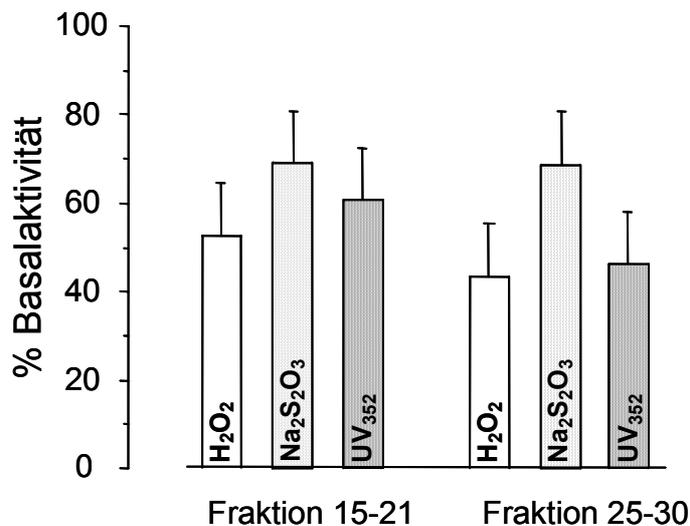


Fig.4-40: Vergleich der Aktivitäten der vereinigten Fraktionen 15-21 und 25-30 mit 20 mM H_2O_2 , 2 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ und UV_{352} -Bestrahlung. Bei Fraktion 15-21 war die Basalaktivität $54 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und bei Fraktion 25-30 $94 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (75 μM ATP, 4 min bei 37 °C in TRIS/HCl pH 7,5). Der Fehlerbalken gibt die durchschnittliche Standardabweichung ($n = 16$) der Testergebnisse an.

4.4.12 Versuche zur Dimerisierung

4.4.12.1 Rekonstitutionsversuche mit *CyaB1*₁₋₅₈₉ und *CyaB1*₅₉₅₋₈₅₉

Nachdem die Chromatographie Hinweise geliefert hatte, das CyaB1 als Dimer oder Tetramer vorliegt, war die Art der Wechselwirkungen zwischen der regulatorischen Domäne (insbesondere den GAF-Domänen) mit dem katalytischen Zentrum eine weitere brennende Frage. Um erste Anhaltspunkte zu erhalten, wurde das C-terminal verkürzte Protein CyaB1₁₋₅₈₉ konstruiert. Dieses enthält ausschließlich den Regulator, der aus GAF-A, GAF-B, PAS und den 120 AS umfassenden *Linker*-Bereich ohne bekannte Domänenstruktur besteht.

CyaB1₁₋₅₈₉ konnte wie das Holoenzym exprimiert und gereinigt werden (ca. 30 μg Protein/200 ml *E. coli*-Kultur; Fig.4-41 A), obwohl auch hier der größte Teil in *inclusion bodies* zu finden war. Interessanterweise führte der Verlust des katalytischen C-Terminus nicht zur völligen

Unlöslichkeit wie bei der Deletion der C-terminalen TPRL-Domäne alleine, was die postulierte Funktionseinheit von katalytischer und TPRL-Domäne untermauert (siehe in 4.3.1).

Wenn die regulatorische Domäne an die katalytische Domäne über Protein-Protein-Wechselwirkungen bindet und dieser Komplex durch cAMP aktivierbar ist, müssten Mischungen von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ mit CyaB1₁₋₅₈₉ eine höhere AC-Aktivität als CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ alleine haben. Es wäre vorstellbar, dass die regulatorischen Domänen ein Dimer bilden und mit zwei katalytischen Domänen zu einem cAMP aktivierbaren, holoenzymähnlichen Tetramer assoziieren.

CyaB1₁₋₅₈₉ hatte keine AC-Aktivität. Eine Mischung aus 0,33 nM CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ mit 7,6 nM bis 1,52 μ M CyaB1₁₋₅₈₉ zeigte mit und ohne Zusatz von 100 μ M cAMP keine Änderung der katalytischen Aktivität (siehe Fig.4-41 B). Dabei spielte es keine Rolle, ob die Mischungen bei optimalen Bedingungen für CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ (Mn-ATP, 45 °C und pH 8,5) oder für das Holoenzym (Mg-ATP, 37 °C und pH 7,5) inkubiert wurden und ob das cAMP vor oder nach Mischen der beiden Proteine zugesetzt wurde. Dies deutete darauf hin, dass es keine Assoziation der regulatorischen und der katalytischen Domänen gibt. Die Wechselwirkungen zwischen beiden erfordert eine kovalente Verknüpfung.

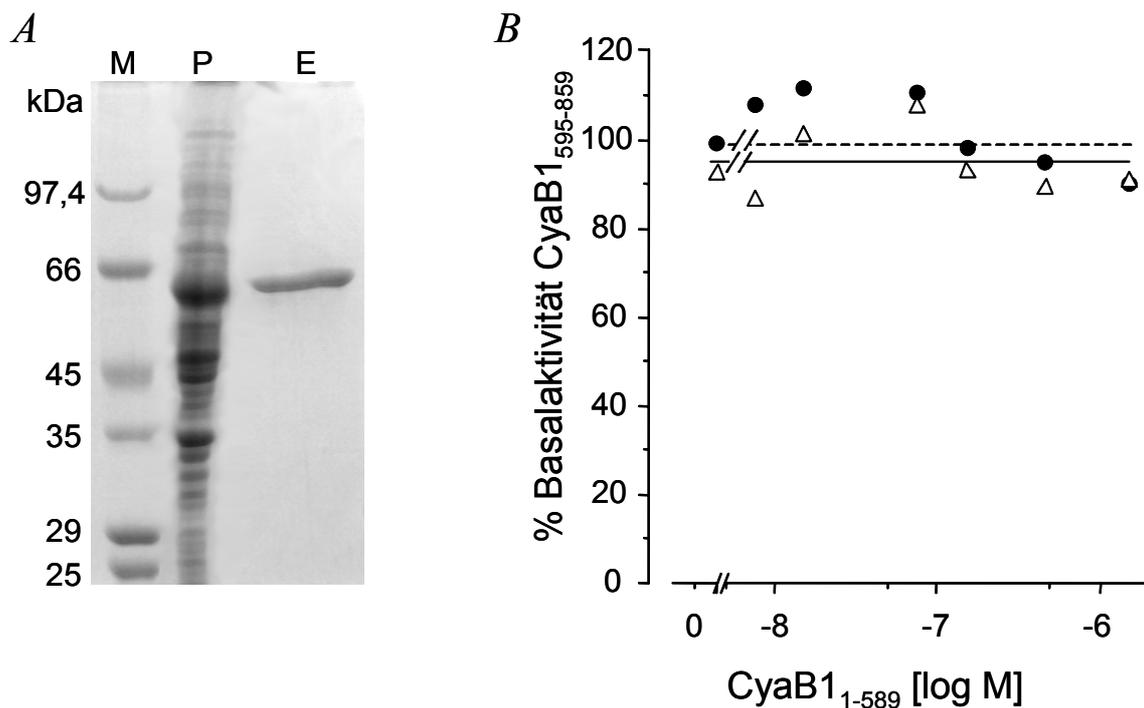


Fig.4-41: **A)** SDS-Page von CyaB1₁₋₅₈₉. Im unlöslichen Pellet (P, Auftragung wie in Fig.4-3) ist auf derselben Höhe wie im Eluat der *NiNTA* Reinigung (E, 2 μ g Protein) ein verstärkte Bande zu erkennen. Links: Markerproteine (M) in kDa. **B)** CyaB1₁₋₅₈₉ beeinflusst mit (\blacktriangle) und ohne (\bullet) 100 μ M cAMP nicht die Aktivität von 330 nM CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ (100 % = 211 nmol cAMP \cdot mg⁻¹ \cdot min⁻¹; Testbedingungen: 75 μ M Mn-ATP, 45 °C, pH 8,5, 4 min).

4.4.12.2 Holoenzym und *CyaB1*₁₋₅₈₉

Mit Mischungen aus *CyaB1*₁₋₅₈₉ und dem Holoenzym wurde ebenfalls versucht, die Dimerisierung der GAF-Domänen bzw. die Funktionalität der alleine exprimierten regulatorischen Untereinheit nachzuweisen. Die Dimerisierung durch die GAF-Domänen könnte zur Bildung katalytisch inaktiver Dimeren aus *CyaB1*₁₋₅₈₉ und dem Holoenzym führen, bei denen eine komplementäre katalytische Domäne fehlt. Eine solche Mischung sollte obendrein einen Defekt in der Selbstaktivierung durch cAMP haben, der in der Zeitabhängigkeit sichtbar wäre. Diese ist aber trotz eines großer Überschusses von 559 nM *CyaB1*₁₋₅₈₉ unverändert (Fig.4-42). Folglich haben sich keine Dimere aus Holoenzym und regulatorischer Domäne gebildet. Entweder weil beide keine Affinität zueinander haben oder weil beide schon als hochassoziierte Dimere vorliegen, so dass keine Mischung untereinander möglich ist.

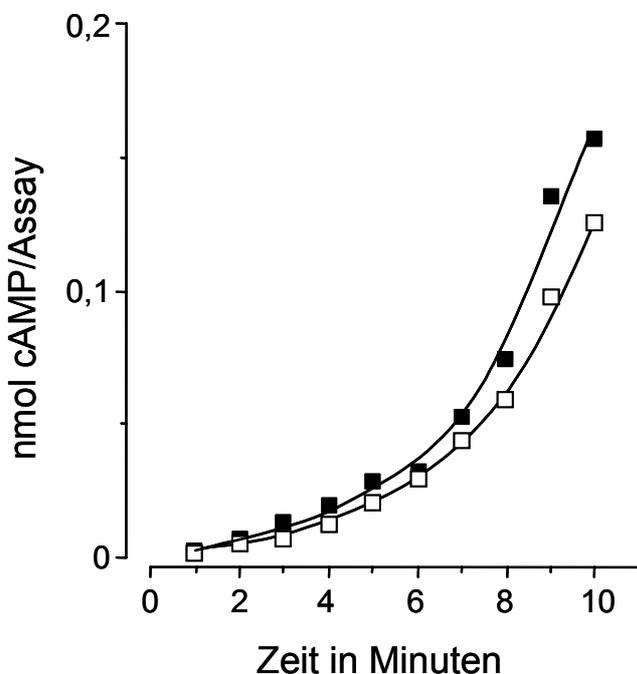


Fig.4-42: Zeitabhängigkeit von 7,6 nM *CyaB1* (Testbedingungen: 75 μ M Mg-ATP, 37 °C, pH7,5 und 4 min) mit (■) und ohne 559 nM *CyaB1*₁₋₅₈₉ (□).

4.4.12.3 Dimerisierung mit Glutaraldehyd

Glutaraldehyd bildet vorzugsweise mit der Aminogruppe von Lysin-Seitenketten ein Azomethin (Schiff'sche Base) und kann auf diese Weise ein dimerisiertes Protein kovalent verknüpfen, wenn die Lysine der jeweiligen Proteinmonomere räumlich nahe beieinander liegen. Es könnten sich dabei natürlich auch Tetra- und andere Multimere bilden. Die Effizienz der Verknüpfungs-Reaktion hängt stark vom Protein-Glutaraldehyd-Verhältnis, der Anzahl der Lysine pro Protein (*CyaB1* enthält 33), der Reaktionszeit, der Temperatur und den Pufferbedingungen ab. Die Versuche wurden in An- und Abwesenheit von 100 μ M cAMP gemacht und auch mit *CyaB1*₁₋₅₈₉ (22 Lysine) und *CyaB1*₅₉₅₋₈₅₉ (11 Lysine), um zwischen der Dimerisierung der GAF-Domänen

und der katalytischen Domäne unterscheiden zu können. Beim Holoenzym haben sich schon nach 10 Minuten Inkubationszeit mit 7 mM Glutaraldehyd neben Dimeren (bei 180 kDa, Pfeile in Fig.4-43) auch Tetra- und Oligomere (ab 400 kDa) gebildet. Eine Dimerbande und Multimerbande aus Aggregaten, die den denaturierenden Bedingungen beim SDS-PAGE widerstehen, zeigte sich auch ohne Glutaraldehyd-Behandlung. Ein Einfluss von cAMP ist weder beim Holoenzym noch bei CyaB1₁₋₅₈₉ oder CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ zu erkennen. Die katalytische Domäne CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ dimerisierte schwächer und der Anteil an Multimeren ist geringer.

Wie schon die Gelfiltrationsversuche zeigen, fördern die GAF-Domänen die Bildung von Dimeren und Oligomeren beim Holoenzym unabhängig vom Liganden cAMP, während die katalytische Domäne kaum eine Tendenz zum Assoziieren zeigt. Allerdings wurden die Dimerisierungsversuche in Phosphatpuffer durchgeführt, der ACn hemmt.

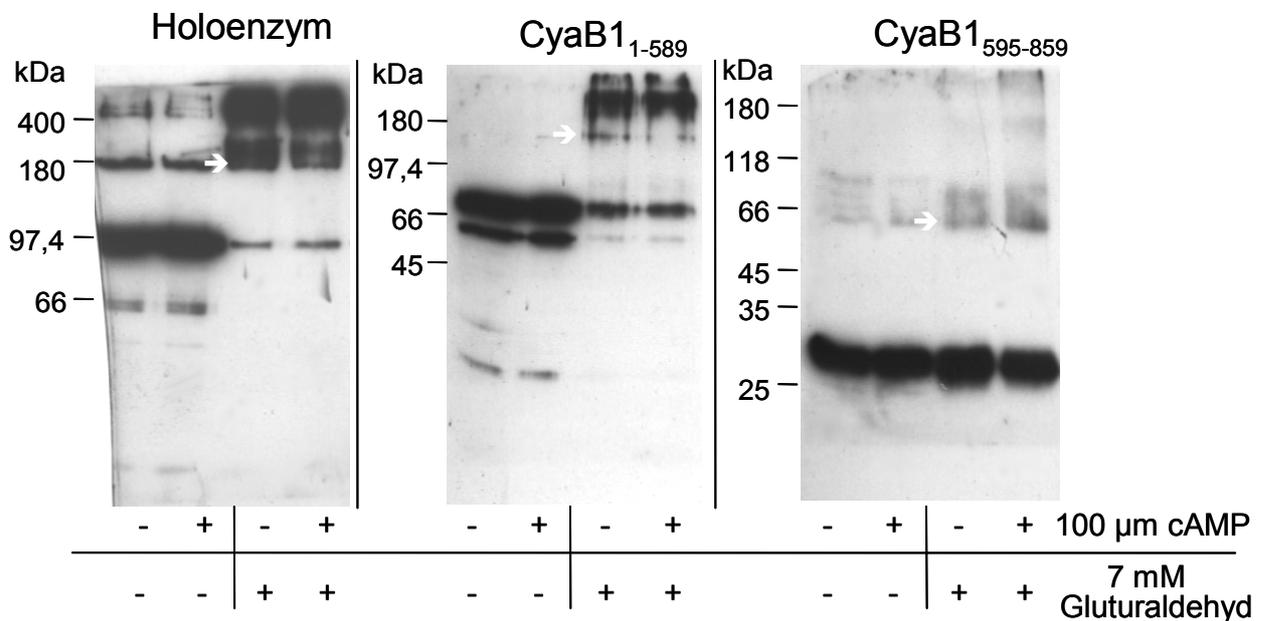


Fig.4-43: *Western Blot* von 367 nM Holoenzym, 345 nM CyaB1₁₋₅₈₉ und 395 nM CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ nach 10 min Inkubation mit 7 mM Glutaraldehyd bei 20 °C in An- und Abwesenheit von cAMP. Der weiße Pfeil gibt die Laufhöhe des jeweiligen Dimers an.

4.5 Mutanten des Holoenzym

4.5.1 CyaB1D190A/-D360A

Da der stimulierende Effekt des Aktivators cAMP wahrscheinlich über eine Interaktion mit einer der GAF-Domänen zustande kam, wurde untersucht, ob die GAF-A- oder GAF-B-Domäne dafür verantwortlich ist. Mutations- und Modellierungsstudien ließen vermuten, dass das Aspartat im NKX_nFX₃DE Motiv eine wichtige Rolle bei der cGMP-Bindung spielt (Ho et al., 2000; McAllister-Lucas et al., 1995; Turko et al., 1996). Die Rolle dieses Motivs bei der cGMP-Bindung wird aber dadurch in Frage gestellt, dass es in beiden GAF-Domänen von CyaB1 konserviert ist (Fig.4-28), cGMP jedoch keinen Effekt auf CyaB1 hat. Es ist jedoch gesichert, dass eine Mutation des Asp die cyclische Nukleotidbindung verhindert (McAllister-Lucas et al., 1995; Turko et al., 1996). Mit diesen Daten als Ausgangspunkt wurden die Mutanten CyaB1D190A und CyaB1D360A hergestellt, bei denen das entsprechende Aspartat (in Fig.4-28 mit ▼ markiert) nach Alanin mutiert wurde. Bei der *E. coli*-Expression beider Proteine wurde das meiste unlöslich in *inclusion bodies* eingelagert. Ein SDS-PAGE der Eluate nach *NiNTA*-Reinigung zeigte kein Protein aber mit *Western Blot* wurde eine schwache Bande eines gereinigten Proteins nachgewiesen (Fig.4-44 A).

Mit den geringen Mengen CyaB1D190A (GAF-A-Mutante) konnte keine Basalaktivität, aber dafür mit 100 µM cAMP stimulierte Aktivität gemessen werden (Fig.4-44 A). CyaB1D360A (GAF-B-Mutante) lieferte zwar messbare Basalaktivität, ließ sich aber durch cAMP-Zugabe nicht weiter stimulieren. Die cAMP Aktivierung über die GAF-B-Domäne wurde noch durch Bindungsstudien untermauert (Ho et al., 2000; McAllister-Lucas et al., 1995). Das cAMP wurde konzentrationsabhängig an CyaB1 gebunden und CyaB1D360A konnte nie mehr als 3 % davon binden (Fig.4-44 B). Das zeigt, dass auch die unmutierte GAF-A-Domäne kein cAMP bindet. Der Verlust der cAMP-Stimulierbarkeit und der cAMP-Bindung der GAF-B-Mutante beweist, dass die GAF-B-Domäne in CyaB1 für die cAMP-Bindung und -Stimulation verantwortlich ist.

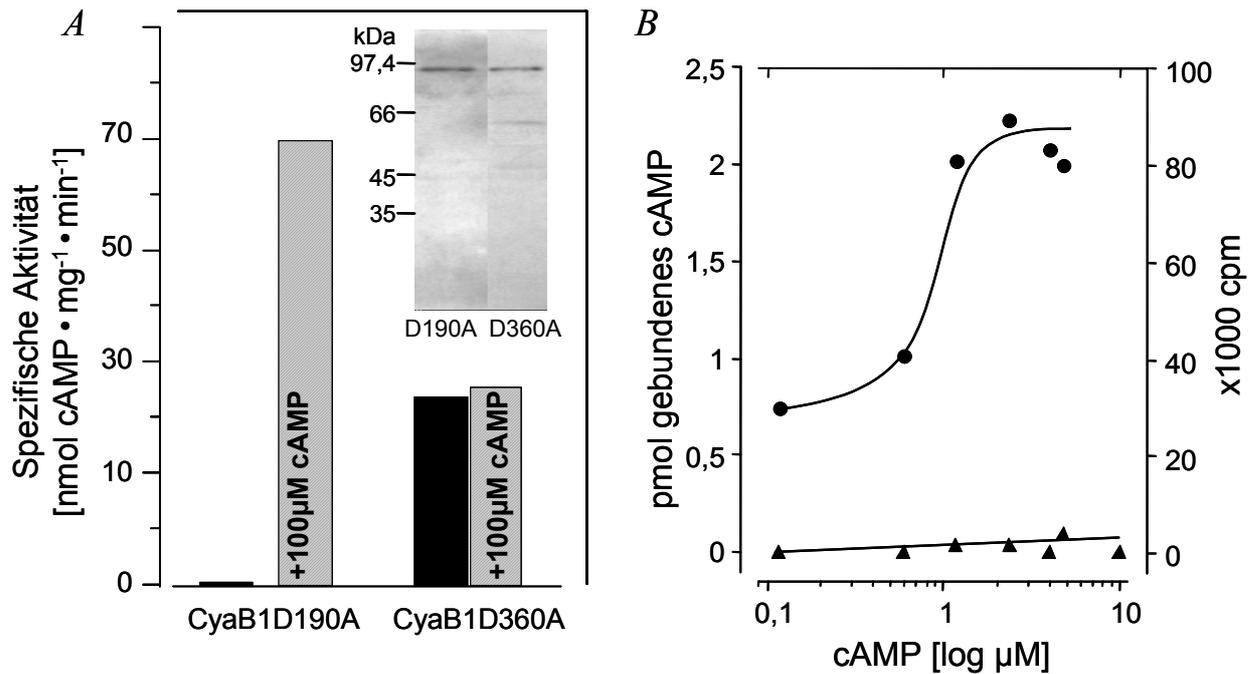


Fig.4-44: Die cAMP-Aktivierung wird über die GAF-B-Domäne vermittelt: **A)** die GAF-A-Mutante CyaB1D190A lässt sich mit cAMP aktivieren, während die GAF-B-Mutante CyaB1D360A unbeeinflusst bleibt. Der Einschub zeigt den *Western Blot* der gereinigten Proteine. Die spezifische Aktivität (75 μM ATP, 4 min, 37 °C, TRIS/HCl pH 7,5) wurde auf 0,25 μg CyaB1D190A und 0,82 μg CyaB1D360A bezogen. Im *Western Blot* wurden je 50 ng aufgetragen (Gesamtprotein mit *BioRad*). **B)** cAMP-Bindung von je 200 nM CyaB1₁₋₈₅₉ (●) und CyaB1D360A (▲) in Gegenwart von 0,5-10 μM cAMP (mit 37 kBq [2,8-³H]-cAMP markiert).

4.5.2 CyaB1A275D

In einer kürzlich publizierten Kristallstruktur der GAF-Domänen der PDE-2³⁹ hat keine der Aminosäuren des NKX_nFX₃DE-Motivs Kontakt mit dem gebundenen cGMP (Martinez et al., 2002). Die Struktur etabliert ein Aspartat (das protonierte N¹ bindet an die Carboxylgruppe und das O⁶ an die Amidbindung des Proteinrückgrats) und ein Threonin, die über Wasserstoffbrückenbindungen für cGMP spezifizieren (D434 und T483 mit ▲ in Fig.4-28 markiert). In der GAF-B Domäne von CyaB1 ist das Threonin konserviert (T323), während ein Alanin (A275) die Position des Aspartats einnimmt.

Die Punktmutante CyaB1A275D, die nach obigen Überlegungen die nötigen AS für cGMP-Bindung besitzt, konnte mit der gleichen Ausbeute wie der Wildtyp exprimiert und gereinigt werden. Die Dosis-Wirkungskurven mit cAMP und cGMP ergaben eine EC₅₀ von 2 μM cAMP und 400 μM cGMP (Fig.4-45). Die spezifische Aktivität mit unphysiologisch hohen cGMP-Konzentrationen war um 40 % gegenüber Wildtyp gesteigert, eine Änderung der Nukleotidspezifität wurde nicht festgestellt. Die cAMP-Dosis-Wirkungskurve mit Mn-ATP (Daten nicht gezeigt) zeigte einen biphasischen Verlauf wie der Wildtyp. Eine weitere Mutante, in der Q105

³⁹ die Struktur wurde uns freundlicherweise schon vor Veröffentlichung von Prof. Dr. J. Beavo, Seattle, WA (USA), zur Verfügung gestellt.

an entsprechender Position in der GAF-A Domäne (▼ in Fig.4-28) gegen Aspartat ausgetauscht wurde, zeigte ebenfalls cAMP-Präferenz und -Aktivierbarkeit wie der Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Das zeigt, dass bei CyaB1 ein cAMP-Bindungsmodus unter Beteiligung anderer AS existieren muss als bei der PDE-2.

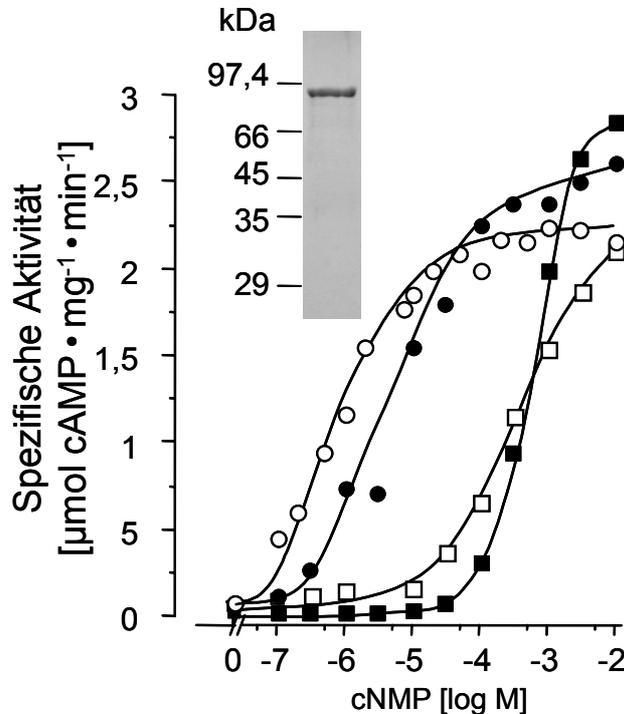


Fig.4-45: Dosis-Wirkungskurve von CyaB1A275D mit cAMP (●) und cGMP (■) im Vergleich mit dem Holoenzym (○ für cAMP und □ für cGMP). Das Insert zeigt ein SDS-PAGE mit 2 μg gereinigtem Protein. Testbedingungen: (75 μM ATP, 4 min, 37 °C, TRIS/HCl pH 7,5).

4.5.3 CyaB1D650A/-N728A

Aus der Kristallstruktur der PDE-2-GAF-Domänen geht hervor, dass nur eine GAF-Domäne für die Ligandenbindung (GAF-B bei der PDE-2) verantwortlich ist, während die andere für die Dimerisierung sorgt (Martinez et al., 2002). Da in CyaB1 GAF-B cAMP bindet, war anzunehmen, dass hier ebenfalls GAF-A der Dimerisierung dient und damit eine kritische Rolle für die Regulation der enzymatischen Aktivität innehat. Eine einfache Assoziationskonstante der Monomere durch eine Proteinabhängigkeit wie in Abschnitt 4.1.7 festzustellen, war unmöglich, da CyaB1 ein produktaktiviertes Enzym ist. Mit den zwei inaktiven Holoenzymmutanten CyaB1D650A und -N728A, die wie CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A und -N728A in Abschnitt 4.2.2.1 ein katalytisch aktives Heterodimer bilden können, wurde versucht eine Assoziationskonstante zu bestimmen. Diese sollte wegen des dimerisierenden Effekts der GAF-Domänen kleiner sein als bei den N-terminal verkürzten Mutanten.

Die Ausbeute an gereinigtem Protein der beiden Mutanten war nur 1/3 im Vergleich zum Wildtyp. Sie zeigten einzeln oder in Mischung ohne cAMP keine messbare Aktivität. Mit 100 μM cAMP mit zeigte CyaB1D650A ebenfalls keine messbare und CyaB1N728A nur etwa 1 % Wildtyp-Aktivität, die durch Mischen der beiden Mutanten verdoppelt werden konnte (Fig.4-46). Dabei spielte es keine Rolle, ob das cAMP vor oder nach dem Mischen zugegeben wurde. Die geringe Aktivitätszunahme (CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A/-N728A verfünffachten unter analogen Bedingungen die spezifische Aktivität) lässt den Schluss zu, dass die Mutanten mehrheitlich als inaktive Dimere vorliegen und ein Austausch des Dimerisierungspartners und damit die Bildung aktiver Heterodimere (analog zu Fig.5-1) behindert wird. Dies bestätigt im Einklang mit der chromatographische Größenbestimmung (4.4.11) und den Dimerisierungsversuchen (4.4.12) die Dimerisierung durch GAF-Domänen. Gleichzeitig erklärt es, warum keine Titrationskurven mit den Mutanten analog zu 4.2.2.1 möglich waren.

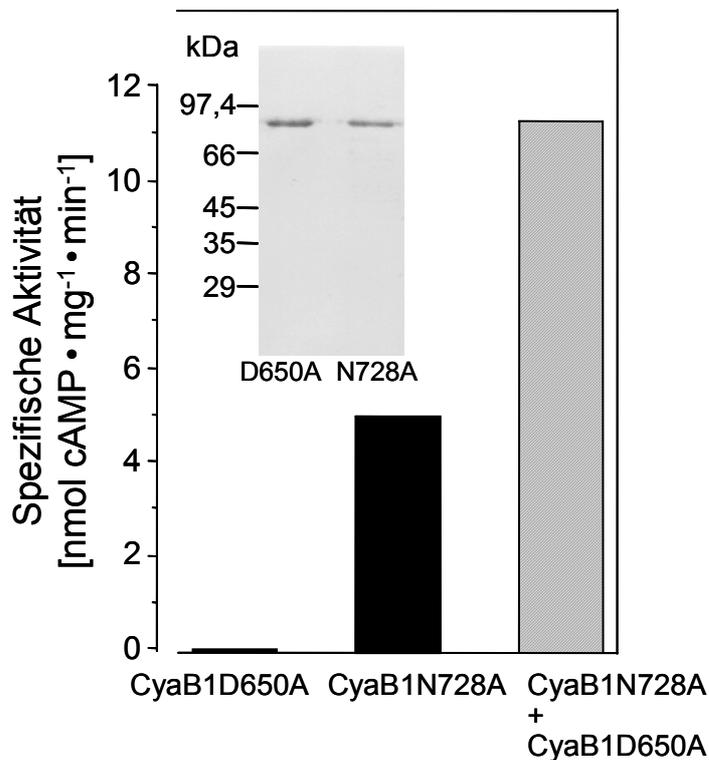


Fig.4-46: Rekonstitution von AC-Aktivität durch Mischen von 56 nM inaktivem CyaB1D650A mit 112 nM CyaB1N728A. Das Insert zeigt ein SDS-PAGE mit gereinigten Proteinen. Die spezifische Aktivität ist auf CyaB1N728A bezogen. Testbedingungen: 75 μM ATP, 4 min, 37 °C, TRIS/HCl pH 7,5 und 100 μM cAMP.

4.5.4 CyaB1 Δ -GAF-A/- Δ -GAF-B

Neben Enzymen, die durch paarweise und tandemartig verknüpfte GAF-Domänen (wie in PDE-2 und CyaB1) reguliert werden, kennt man auch solche mit einer einzelnen GAF-Domäne (z.B. PDE-11 oder eine andere cyanobakterielle AC, CyaD), deren Funktion aber unklar ist. Eine

brennende Frage war, ob die CyaB1-GAF-Domänen ihre Funktionen (GAF-B \rightarrow Ligandenbindung und GAF-A \rightarrow Dimerisierung) nur als Ensemble oder auch einzeln wahrnehmen können.

Das Protein der Deletionsmutanten CyaB1 Δ -GAF-A/- Δ -GAF-B, bei denen entweder die GAF-A-Domäne (E64-L235) oder die GAF-B-Domäne (D236-L386) fehlten, endete hauptsächlich in *inclusion bodies* und nur wenig konnte mit 90 % Verunreinigungen aufgereinigt werden (Fig.4-47 A). Die beiden Mutanten zeigten nur 1-2 % Wildtyp-Aktivität, die sich durch cAMP nicht beeinflussen ließ (Fig.4-47 B). Das Fehlen der kompletten GAF-A-Domäne führt offensichtlich zum Funktionsverlust der GAF-B-Domäne, während die Mutation in CyaB1D190A die Funktion der unmutierten GAF-B-Domäne nicht behinderte (siehe 4.5.1). Dabei ist unklar, ob das subtile Wechselspiel der GAF-Domänen untereinander gestört und/oder der Funktionsverlust durch Fehlfaltung des unvollständigen Proteins zustande kommt.

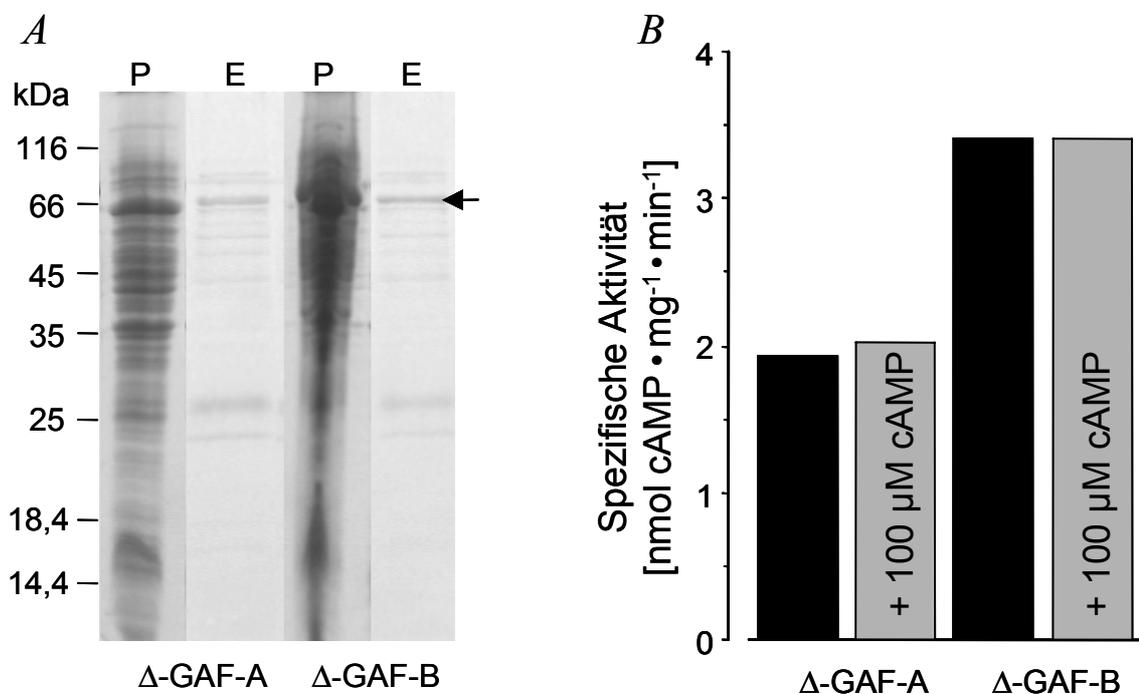


Fig.4-47: A) SDS-PAGE der Pellets (P; aufgetragen wie in Fig.4-3) und NiNTA-Eluate (E; 20 μ l aufgetragen) der Deletionsmutanten CyaB1 Δ -GAF-A (Berechnetes MG: 77 kDa) und CyaB1 Δ -GAF-B (Berechnetes MG: 81 kDa). Der Pfeil zeigt auf die Bande des gereinigten Proteins. **B)** AC-Aktivitäten der GAF-A- und GAF-B-Deletionsmutanten \pm 100 μ M cAMP. Testbedingungen: 75 μ M ATP, 4 min, 37 $^{\circ}$ C, TRIS/HCl pH 7,5.

4.6 Chimären

4.6.1 Chimäre mit Ratten-PDE-2-GAF-Domänen

GAF-Domänen werden in Proteinen aller 3 Klassen von Lebewesen gefunden. Eine direkte Beteiligung an einer Enzymregulation wurde aber bis jetzt nur für FhlA und verschiedene PDEn aus Säugetieren nachgewiesen (Francis et al., 2001; Hopper and Böck, 1995; Turko et al., 1998). Die tandemartige Anordnung der GAF-Domänen ist in PDE-2 genauso wie bei CyaB1, während in PDE-5 und -6 GAF-A als Ligandenbindungs-Domäne angenommen wird (Muradov et al., 2002). Säugetiere und Cyanobakterien sind in der Evolutionsgeschichte ca. 3 Milliarden Jahre entfernt (Ohno, 1997). Deshalb war es besonders interessant zu untersuchen, ob die GAF-Domänen von Säugern und Anabaena funktionell konserviert und austauschbar sind. Dazu wurde das GAF-Domänen Ensemble von CyaB1 gegen das Ensemble der Ratten PDE-2, bei der die cGMP-Aktivierung über die GAF-B Domäne und die Kristallstruktur bekannt ist (Martinez et al., 2002), ausgetauscht.

In der Proteinchimäre CyaB1_{RattenGAF}, ersetzt das Ratten-GAF-Ensemble (E207-N546) das cyanobakterielle (Q49-L385; s. Fig.4-48). Die Chimäre konnte exprimiert und gereinigt werden (Fig.4-49). Ein Einzelaustausch von GAF-A oder GAF-B aus der Ratte gegen die entsprechende GAF-Domäne aus CyaB1 führte nur zu *inclusion bodies*. Die Basalaktivität von CyaB1_{RattenGAF} von 2,4 nmol cAMP/mg/min konnte mit cGMP dosisabhängig 10fach aktiviert werden, während cAMP keinen Effekt zeigte (Fig.4-49). Damit wurde eine cGMP aktivierte AC aus CyaB1 hergestellt und die funktionelle Äquivalenz der GAF-Domänen prinzipiell bewiesen. Der EC₅₀ Wert für cGMP von 3 µM entspricht dem Literaturwert für die cGMP-Aktivierung der PDE-2 (Sonnenburg et al., 1991). Die spezifische Aktivität von CyaB1_{RattenGAF} war nur 1 % der Wildtypaktivität. Vielleicht weil die große evolutionäre Entfernung zwischen Cyanobakterien und Säugern, dazu führt, dass die ausgetauschten Bindungsstellen nicht optimal platziert sind und/oder die Signalweiterleitung zur katalytischen Domäne relaxiert ist.

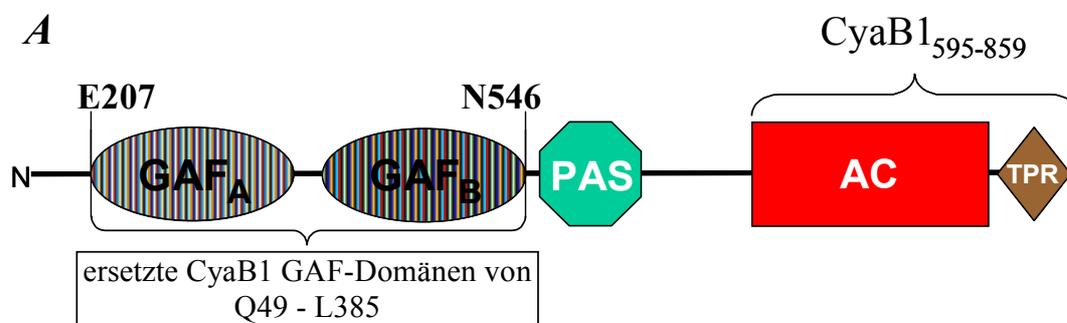


Fig.4-48: Übersicht über CyaB1_{RattenGAF}

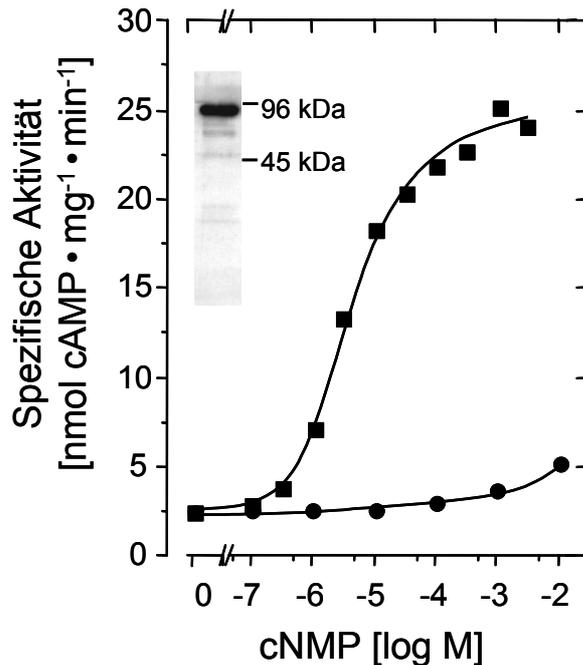


Fig.4-49: Dosis Wirkungskurve von CyaB1_{RattenGAF} (31,2 nM) mit cGMP (■) und cAMP (●). Das Insert zeigt einen Western Blot (100 ng Protein) des gereinigten Protein. Testbedingungen: 75 μ M ATP, 4 min, 37 °C, TRIS/HCl pH 7,5

4.6.2 Chimäre mit dem katalytischen Zentrum einer AC aus *M. tuberculosis*

Die Klasse-IIIa-AC Rv1625c aus *M. tuberculosis* besitzt einen Membran-Anker mit 6 Membrandurchgängen, der u. a. auch als Dimerisierungsdomäne dient [(Guo et al., 2001), Dr. Y. L. Guo, persönliche Mitteilung]. Die katalytische Domäne von Rv1625c zeigt zu der von CyaB1 (Klasse-IIIb) 22 % Identität und 34 % Ähnlichkeit. Es wäre interessant zu sehen, ob GAF Domänen auch eine Klasse-IIIa AC aktivieren können. Deshalb wurde die Chimäre CyaB1_{mycocat} konstruiert (Fig.4-50 A). Die Regulatorregion CyaB1₁₋₅₈₉ wurde über ein GS-Dipeptid an die katalytische Domäne von Rv1625c (mycoAC₂₀₄₋₄₄₃) angesetzt. Das 831 AS lange Protein (berechnetes MG = 92,4 kDa) konnte gereinigt werden und erscheint im SDS-PAGE bei 90 kDa (Fig.4-50 C). Die Eigenschaften der AC sind verschieden von CyaB1 und mycoAC₂₀₄₋₄₄₃. Die spezifische Aktivität mit Mn-ATP war von 1,2 – 50 nM CyaB1_{mycocat} konstant, während sie mit mycoAC₂₀₄₋₄₄₃ im gleichen Konzentrationsbereich um das 5fache zunahm. Das Niveau der Chimäre wurde dabei nicht erreicht (Fig.4-50 B). Im AC-Test wurden 75 μ M ATP und nicht 850 μ M ATP wie von Dr. Y. L. Guo eingesetzt. Diese Konzentration wurde generell für CyaB1 verwendet und ist kleiner als der K_M von mycoAC₂₀₄₋₄₄₃ (150 μ M), so dass die Aktivitäten niedriger waren, als die von Dr. Y. L. Guo gemessenen (Guo et al., 2001). Mit Mg-ATP wurde bei beiden ACn nur geringe Aktivität gemessen. Die Zeitabhängigkeit von CyaB1_{mycocat} ist linear (Fig.4-50 C) und unabhängig von cAMP, d. h. eine Selbstaktivierung findet nicht statt.

Damit verhält sich die Chimäre analog zu dem über die TM-Bereiche dimerisierten Rv1625, nur dass hier die cyanobakteriellen GAF-Domänen als Dimerisierungsdomänen wirken. Die cAMP-Aktivierbarkeit durch die GAF-Domänen ist verloren gegangen, da das Signal offensichtlich nicht auf das mycobakterielle katalytische Zentrum übertragen werden kann.

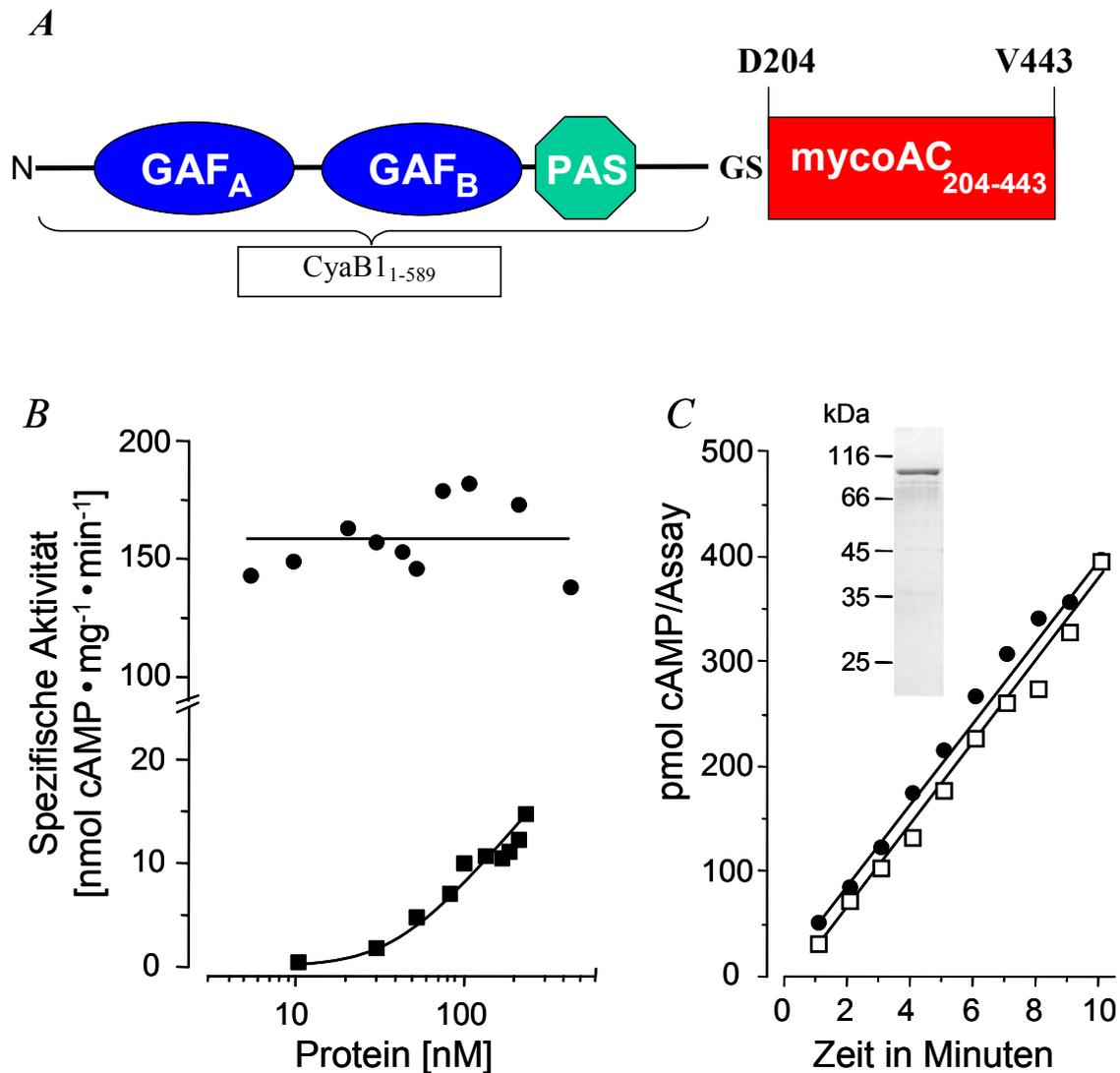


Fig.4-50: A) Übersicht über CyaB1_{mycocat}. **B)** Proteinabhängigkeit der Chimäre CyaB1_{mycocat} (●) und mycoAC₂₀₄₋₄₄₃ (■). Testbedingungen: 75 μM ATP, 4 min, 37 °C, TRIS/HCl pH 7,5. **C)** Zeitabhängigkeit von CyaB1_{mycocat} ohne (●) und mit 100 μM cAMP (□). Testbedingungen: wie oben mit 85 μM Mn-ATP. Das Insert zeigt ein SDS-PAGE des gereinigten Proteins.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung von CyaB1

Die Expression und Reinigung von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ ermöglichte es, grundlegende Fragen zum Aufbau des katalytischen Zentrums der Klasse-III-ACn zu untersuchen. Neben CyaC (Kasahara and Ohmori, 1999; Katayama and Ohmori, 1997) und CyaG (Kasahara et al., 2000; Kasahara et al., 2001) aus *Spirulina platensis* ist CyaB1 bisher die einzige cyanobakterielle AC, die als rekombinantes Protein gereinigt und charakterisiert werden konnte. Kurz nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit publizierte eine japanische Arbeitsgruppe ebenfalls die biochemische Charakterisierung von CyaB1 (Tada et al., 2001). Aufgrund andersartiger Enzym-Assays konnten sie die wesentlichen Eigenschaften von CyaB1 nicht erkennen. Zeitgleich zu CyaB1 wurden in unserem Arbeitskreis 7 weitere Klasse-IIIb-ACn aus *Paramecium*, *Plasmodium*, *Stigmatella aurantiaca* und *M. tuberculosis* von Dr. K. Hambach, J. Weber und A. Hammer untersucht. Sie haben alle ähnliche katalytische Zentren und ein Threonin oder Serin an der Stelle des in Klasse-III-ACn konservierten Aspartats. Bei den Konstrukten der ACn aus *Paramecium* und *Plasmodium*, die wie CyaB1 eine Kombination von katalytischer und TPRL-Domäne enthielten, zeigten sich enorme Expressions- und Reinigungsprobleme. CyaB1, dessen Expression und Reinigung vergleichsweise problemlos war, wurde ursprünglich als Modell benutzt, um die vorigen Probleme zu lösen. Deshalb wurden von PD Dr. J. Linder und Dr. K. Hambach Chimären von CyaB1 mit diesen ACn hergestellt. Dies brachte allerdings nicht den gewünschten Erfolg. Gleichzeitig enthüllte die Charakterisierung von CyaB1 eine Reihe von Eigenschaften, die es weit über den Modellcharakter hinaus interessant machten.

Alle Klasse-III-ACn benötigen einen Me^{2+} -Cofaktor und die Kristallstrukturen zeigten, dass zwei Me^{2+} -Ionen mit dem ATP und zwei Aspartat-Resten im katalytischen Zentrum interagieren (Bateman et al., 2002; Hurley, 1999; Mitterauer et al., 1998; Tesmer et al., 1999). Obwohl Mg^{2+} in Säugern sicherlich die größere physiologische Bedeutung zukommt, aktiviert Mn^{2+} die Aktivität aller Säuger-ACn um das 6-10fache. Als stärkere Lewis-Säure im Vergleich zu Mg^{2+} kann es die Nucleophilie der Ribose-3'-Hydroxylgruppe des ATP beim nucleophilen Angriff auf die α -Phosphorylgruppe erhöhen und so die Cyclisierung erleichtern (Tesmer et al., 1997).

Auch bei CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ war mit Mn^{2+} die spezifische Aktivität höher als mit Mg^{2+} . Die EC_{50} lag bei 0,1 mM Mn^{2+} und 0,25 mM Mg^{2+} . Wenn Mg-ATP das alleinige Substrat wäre, müsste 0,1 mM Mg^{2+} 75 μM ATP bereits maximal aktivieren. Der benötigte Überschuss von Mg^{2+} zeigt, dass ein zwei Metallkationen-Mechanismus vorliegt. Andere zweiwertige Kationen wie Zn^{2+} , Ni^{2+} hatten keinen aktivierenden Effekt. Kinetische Untersuchungen mit dem Holoenzym ergaben ein differenzierteres Bild. Dort wurden unabhängig von der Gegenwart des Aktivators cAMP für Mg-ATP 3,5 bis 6 fach höhere K_M -Werte als mit Mn-ATP gemessen. Die 3,5 bis 4,7

fach höheren V_{\max} -Werte mit Mg-ATP im Vergleich zu Mn-ATP (Tab. 4-6) zeigen aber die für ACn ungewöhnliche höhere katalytische Effizienz mit Mg^{2+} . Die geringe Stimulation von CyaB1 mit Mn^{2+} zeigt, dass es ein individuelles katalytisches Zentrum besitzt, in dem sich die Rolle des Mg^{2+} komplexer gestaltet, als durch Sequenzvergleiche mit Säuger-ACn voraussagen war. Ein weiteres Charakteristikum von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ ist das pH-Optimum von pH 8-9,5. Ein pH-Optimum im Alkalischen ist für eine Klasse-IV-AC aus *Aeromonas hydrophilia* beschrieben worden (Sismeiro et al., 1998) und für Klasse-III-ACn ungewöhnlich⁴⁰. Die N-terminal verkürzten Konstrukte einer Stigmatella- und Plasmodium-AC (Klasse-IIIb) zeigten ebenfalls ein pH-Optimum bei pH 8,5-9 [A. Hammer und J. Weber, pers. Mitteilung]. Daraus kann aber keine physiologische Bedeutung abgeleitet werden. Interessanterweise hatte CyaB1₅₉₅₋₈₅₉R732A kein pH-Optimum bei pH-Werten >7,5. In dieser Mutante ersetzt ein Alanin das in allen ACn konservierte Arginin, das den pentavalenten Übergangszustand des α -Phosphat bei der Cyclisierungsreaktion stabilisiert (Tesmer et al., 1997). Bei pH 7,5 ist CyaB1₅₉₅₋₈₅₉R732A gleich aktiv wie der Wildtyp (vgl. 4.2.2.4). D. h. bei diesem pH Wert ist die Bildung des Übergangszustands nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt oder R732 wird nicht zur Katalyse benötigt. Eine Möglichkeit wäre, dass bei pH 7,5 der *product release*, also die Abdissoziation von cAMP und PP_i , der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Bei pH 8,5 zeigt der Wildtyp vierfache Aktivität gegenüber pH 7,5. Hier scheint der mit R732 gebildete Übergangszustand der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein, da R732A keine Aktivitätssteigerung bei pH > 7,5 zuließ. Der stark erniedrigte V_{\max} -Wert und unveränderte K_M -Wert der Mutante CyaB1₅₉₅₋₈₅₉R732A unterstützen diese These. Eine pH abhängige Protonierung von R732 ist unwahrscheinlich, da die Guanidiniumgruppe aufgrund ihres pK_B -Wertes von 0,8 sowohl bei pH 7,5 als auch bei pH 8,5 protoniert vorliegen dürfte. Eine pH-abhängige Mikrofaltung der katalytischen Tasche und die daraus resultierende Positionierung des Arginins alleine oder im Zusammenspiel mit den anderen an der Katalyse beteiligten ASn ist daher wahrscheinlicher.

Um genaueren Aufschluss über den Reaktionsmechanismus zu erhalten, wurde der Effekt des *P-site*-Inhibitors 2'd,3'AMP auf CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ untersucht. *P-site*-Inhibitoren werden so genannt, weil sie einen Purinring enthalten, mit dem sie in die katalytische Tasche der ACn binden. Das Produkt cAMP wird kompetitiv verdrängt und es bildet sich ein *dead-end* Komplex (Dessauer and Gilman, 1997; Hurley, 1999). Dabei ist die Hemmung umso stärker, je aktiver die AC ist. Während bis zu 2 mM cAMP (schnell dissoziierendes Produkt) CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ nicht hemmten, zeigten 0,8 mM PP_i (langsam dissoziierend) 95 % Hemmung. Bei Säuger ACn ist die Hemmung durch PP_i und *P-site*-Inhibitoren additiv. Das wurde bei CyaB1 nicht genau untersucht. Der Effekt von 2'd,3'AMP auf CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ war pH-abhängig: bei pH 7,5 wurde nicht gehemmt,

⁴⁰ Eine lösliche AC aus Ratten Hoden (Chen et al., 2000) zeigte konstante Aktivität von pH 7- 8,5 ebenso wie eine ParaAC (Gierlich, 1985).

sondern leicht aktiviert. Bei pH 8,5 hemmt 2',3'-AMP erst in hohen Konzentrationen ($EC_{50} = 300 \mu\text{M}$). Mit 1mM 2',3'-AMP ist die Hemmung 80 %. Die Mutante CyaB1₅₉₅₋₈₅₉R732A verhält sich bei pH 7,5 wie der Wildtyp, wird aber bei pH 8,5 nicht weiter gehemmt, da die Aktivität das Niveau des *P-Site*-inhibierten Wildtyps nicht übersteigt. Insgesamt ist die Hemmung von CyaB1 durch 2',3'-AMP im Vergleich zu Mammalia-ACn gering. Dies lässt Unterschiede im Aufbau des katalytischen Zentrums vermuten.

Das mit cAMP aktivierte Holoenzym zeigte eine uneinheitliche pH-Abhängigkeit, die weniger durch den pH-Wert, als durch unspezifische Puffereffekte hervorgerufen wurde. Das überrascht nicht, da es sich um ein komplexes Multidomänen-Protein handelt, das als Dimer aktiv ist (Fig.5-1). Wahrscheinlich werden sowohl cAMP-Bindung als auch die Faltung und Kommunikation der einzelnen Proteindomänen durch Änderung des pH-Werts und durch Wechselwirkungen mit den Puffersystemen betroffen.

Das Temperaturoptimum von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ war mit 48 °C ungewöhnlich hoch und auch hier kann nicht von einer physiologischen Bedeutung ausgegangen werden. Cyanobakterien werden im Labor bei Temperaturen von 27- 30 °C kultiviert (Yoshimura et al., 2002). Da ein verkürztes Protein unter *in vitro* Bedingungen gemessen wurde, handelt es sich um einen rein kinetischen Wert. Das Temperaturoptimum und die Aktivierungsenergie des cAMP-aktivierten Holoenzym ist niedriger (40 °C und 65kJ/mol gegenüber 97 kJ/mol), da das katalytische Zentrum ohne die regulatorischen Domänen und den Aktivator die Reaktion nicht optimal katalysieren kann.

Ein weiterer wichtiger Punkt war die Frage, ob CyaB1 als Dimer funktioniert. Normalerweise wird das katalytische Zentrum der Klasse-III-ACn von zwei ähnlichen Proteindomänen gebildet, die die ASn der katalytischen Tasche zur Verfügung stellen (Tang und Gilman, 1995; Yan et al., 1996; Yan et al., 1997). Die katalytisch aktiven ASn konnten übereinstimmend mit Mutationsstudien durch die 2,8 Å-Kristallstruktur eines Säuger-AC-katalytischen Zentrums identifiziert werden (Tesmer et al., 1997; Tesmer et al., 1999; Zhang et al., 1997). Bakterielle ACn wie CyaB1 oder Rv1625c haben den kompletten Satz an katalytisch relevanten ASn schon in einem Monomer, das zu einem Homodimer mit zwei aktiven katalytischen Zentren dimerisiert (Guo et al., 2001). Für beide ACn konnte das durch die nichtlineare Proteinabhängigkeit und durch Komplementationsstudien mit Mutanten des katalytischen Zentrums bewiesen werden. Diese Studien lieferten ein Schema des durch Dimerisierung gebildeten katalytischen Zentrums (Fig.5-1 A). Bei den Homodimeren aus CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728A oder CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A (Fig.5-1 B und C) kann zwar ATP gebunden, aber nur wenig umgesetzt werden, da bei CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A das Metall-Cofaktorbindende D650 fehlt und bei CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728A das den Übergangszustand stabilisierende und H₂O bindende N728. Das Heterodimer der Mutanten, kann dagegen ein funktionelles katalytisches Zentrum rekonstituieren (Fig.5-1 D). Dabei imitiert CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728A funktionell die C1- und CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A die C2-Schleife der Mammalia-ACn.

Natürlich bilden sich in der Mischung beider Mutanten neben Heterodimeren auch inaktive Homodimere, die aber bei steigenden Mengen CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A abnehmen, soweit die Dissoziation/Assoziation der Dimere nicht behindert ist. Die Dimerisierung der Mutanten ist im Vergleich zum Wildtyp suboptimal, da die EC₅₀ von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A mit 2 µM etwa 10 mal höher als die K_{diss} von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ (laut Proteinabhängigkeit) mit 0,16 µM ist und die rekonstituierte Aktivität niedriger war.

Weitere Komplementationsversuche von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646A und -T721A mit CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650A, das als Mammalia-AC-C2-Äquivalent aufgefasst werden kann, lieferten rekonstituierte AC-Aktivität. Dies zeigt, dass K646, T721 und N728 auf der funktionell identischen Domäne liegen und die Alanin-Mutanten nach dem Modell ebenfalls Mammalia-AC-C1-Äquivalente sind. Die kinetischen Untersuchungen und der Hill-Koeffizient von 1 (vgl. 4.1.9) zeigen darüberhinaus, dass beide katalytischen Zentren unabhängig voneinander arbeiten und das Substrat keinen allosterischen Effekt hat.

CyaB1₅₉₅₋₈₅₉ ist wie andere bakterielle Klasse-III-ACn nicht durch Forskolin stimulierbar, da beide katalytischen Zentren ATP binden (Guo et al., 2001). Bei Säuger ACn bindet Forskolin in eine Tasche, die dem katalytischen Zentrum an der Berührungsfläche der C1 und C2 Schleife gegenüberliegt. Allerdings ist im katalytischen Zentrum das T512 (ACV-C1) durch N1025 (AC-II-C2) und S942 (AC-II-C2), das H-Brücken zum O¹ und O⁴ des Forskolins bildet, durch D440 (ACV-C1) ersetzt (Tesmer et al., 1997). N1025 und D440 (N728 und D650 bei CyaB1) würden mit der Bindung eines Forskolinmoleküls, das die beiden Proteindomänen vor allem über hydrophobe Wechselwirkungen mit aliphatischen und aromatischen ASn regelrecht zusammenklebt, in sterischen Konflikt geraten. Die Mammalia-AC vom Typ IX hat eine durch Austausch von S nach A und L nach T zerstörte Bindetasche, kann aber nach entsprechenden Mutationen wieder durch Forskolin aktiviert werden (Yan et al., 1998). Durch Herstellung und Mischung der Mutanten CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650S und CyaB1₅₉₅₋₈₅₉N728T könnte ein Mammalia-AC ähnliches Heterodimer entstehen, das eine katalytisch aktive Tasche und eine durch die Mutation nach Serin und Threonin inaktivierte, aber Forskolin bindende Tasche trägt. Die N728T Mutante zeigte analog zu Mutationsstudien mit ACII (Yan et al., 1997) deutlich mehr Aktivität als die N728A Mutante, da der polare Threonin-Rest wahrscheinlich eine reduzierte katalytische Funktion wahrnehmen kann. Ihr K_M-Wert war mit 7 µM für Mn-ATP ähnlich wie Wildtyp und V_{max} war mit 19 nmol cAMP • mg⁻¹ • min⁻¹ (s. 4.2.5) stark reduziert. CyaB1₅₉₅₋₈₅₉D650S war wie die Alaninmutante inaktiv, was kinetische Untersuchungen unmöglich machte. Die Mischung der beiden Mutanten zeigte analog zu den Dimerisierungsexperimenten in Abschnitt 4.2.2.1 Rekonstitution von AC-Aktivität, aber keine Forskolinstimulierbarkeit.

Zwei Punktmutationen bei CyaB1 reichen im Unterschied zur AC IX nicht aus, um die Forskolinbindetasche einer Säuger-AC strukturell und funktionell zu imitieren, was ebenfalls Unterschiede in der Faltung der katalytischen Tasche impliziert.

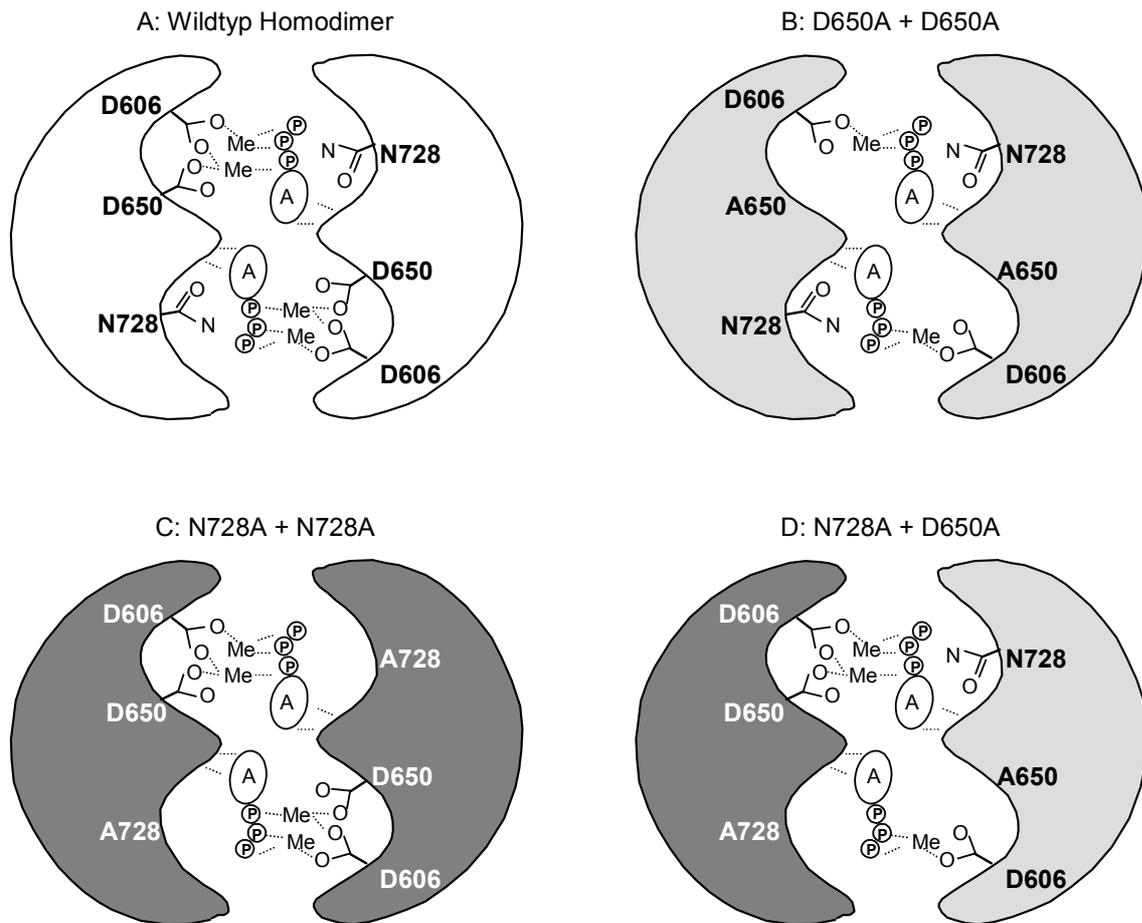


Fig.5-1: **A)** Schema des Wildtyp-Homodimers von CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉, dass zwei katalytische Zentren bilden kann. Die Me-Cofaktorbindenden D606 und D650 sowie das den Übergangszustand stabilisierende N728 sind hervorgehoben. Die Bindung des Adeninrings an K646 und T721 ist durch gepunktete Linien dargestellt. **B)** und **C)** Die inaktiven Heterodimere der Mutanten CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉D650A und CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉N728A. **D)** Das Heterodimer aus CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉N728A und CyaB₁₅₉₅₋₈₅₉D650A das ein aktives katalytisches Zentrum rekonstituieren kann. A = Adenosin; P = Phosphate; Me = zweiwertiges Metallkation. Darstellung nach Guo et. al., 2001.

5.2 CyaB1 hat eine neuartige Faltung des katalytischen Zentrums

Die katalytische Domäne von CyaB1 zeigt mit den katalytischen Zentren der Mammalia-ACn viele Übereinstimmungen bei den Positionen der katalytisch aktiven AS (Tesmer et al., 1997) (s. Fig.5-2). In ACn binden K938 als H-Brückendonator und D1018 als H-Brückenakzeptor (Ratten ACII-C2) über die N¹- und N⁶-Atome des Adeninrings. In CyaB1 befindet sich anstelle des hochkonservierten Aspartats ein Threonin (T721), das auch als H-Brückendonator fungieren kann (vgl. Fig.5-2 B). Deshalb wird CyaB1 bei computergestützten Sequenzvergleichen fälschlich als GC erkannt. In GCn befinden sich an den entsprechenden Positionen ein Glutamat, das als H-Brückenakzeptor das N¹-Atom des Guaninrings von GTP bindet, und ein Cystein oder Serin, die als H-Brückendonator an das O⁶-Atom des Guaninrings binden (Sunahara et al., 1998; Tang and Gilman, 1995; Tesmer et al., 1997).

CyaB1 ist aber eine spezifische AC und T721 ersetzt das Aspartat funktionell. Eine Positionsverschiebung der Substratbindenden AS nach D719 wurde durch Mutationsstudien ausgeschlossen. Die AC-Aktivität von CyaB1₅₉₅₋₈₅₉T721A war um 97 % reduziert, während die von D719A nur um 75 % reduziert war. Das deutet im Einklang mit den vorher besprochenen Ergebnissen darauf hin, dass CyaB1 eine spezielle Feinstruktur der Purinbindungstasche besitzt, in der T721 wahrscheinlich als Wasserstoffbrückenakzeptor fungiert. CyaB1 hat als Klasse-IIIb-ACn eine von anderen Klasse-III-ACn abweichende AS-Sequenz mit Einschub einer AS (H715 bei CyaB1) in einem ansonsten konservierten Block (Balken und Pfeil in Fig.4-2). Außerdem ist in CyaB1 anstelle des γ -phosphatbindenden R484 (ACV-C1) ein G698 vorhanden ist, das diese Funktion nicht übernehmen kann (Fig.5-2). CyaB1₅₉₅₋₈₅₉T721A ist eine V_{max}-Mutante, während der K_M-Wert unverändert blieb. Das legt nahe, dass T721 weniger für die Bindung, sondern eher für die korrekte Orientierung des Substrats beim Übergangszustand der Cyclisierungsreaktion sorgt.

Die Mutanten CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646A und CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646E zeigten, dass der Verlust des Lysins zu einer Erhöhung des K_M-Werts und Erniedrigung des V_{max}-Werts führt, was K646 als substratspezifisierende AS identifiziert. Das Temperaturoptimum ist bei CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646A auf 41 °C gegenüber 48 °C beim Wildtyp abgesenkt. Entweder weil ATP aufgrund der fehlenden H-Brücke zwischen K646 und dem N¹-Atom des Adeninrings bei höheren Temperaturen weniger fest gebunden werden kann oder weil der Ladungsverlust des K zu einer Destabilisierung des Enzyms führt.

Eine GC aus Paramecium mit großer Ähnlichkeit zur Struktur der Mammalia-AC hat ein Serin, das als H-Brückendonator dient, an der Position, die dem T721 entspricht. Hier wird die Substratspezifität für GTP über ein Glutamat, das sich an der Position des K646 befindet, erreicht (Linder et al., 2000). Nach diesem Vorbild wäre es für CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646E möglich, dass

T721 als H-Brückendonor mit dem O⁶ eines Guaninrings in Kontakt tritt, während E646 die Purinspezifität über Bindung an dessen N¹- und N⁶-Atome gewährleistet.

Die Umwandlung von GCn nach ACn ist mehrfach durchgeführt worden, während die Umwandlung von ACn nach GCn nicht oder nur bedingt gelungen ist, wie folgende Beispiele zeigen:

- Die Triplemutante α R592Q/ β E473/ β C541D einer löslichen α 1 β 1 Ratten-GC setzte statt GTP nun ATP um (Beuve, 1999).
- Die Doppelmutation E925K/C995D einer membrangebundenen GC aus der Retina wandelte die GC in eine AC um (Tucker et al., 1998).
- Die Doppelmutante E1681K and S1748D in einer der löslichen katalytischen Domänen einer GC aus Paramecium zeigte AC-Aktivität (Linder et al., 2000).
- Dimere aus mutierten löslichen Mammalia-AC katalytischen Domänen von ACV-C1 Q503R mit AC II C2 K938E/D1018C zeigten zwar GC-Aktivität, allerdings waren die V_{\max} -Werte mit GTP geringer als die mit ATP (Sunahara et al., 1998).
- Bei CyaG aus *Spirulina platensis* (gehört zur Klasse-IIIa) konnte durch Umwandlung von K533, I603 und D605 nach D, R und C eine sehr geringe GC-Aktivität, bei gleichzeitigen Verlust der AC-Aktivität, entdeckt werden (Kasahara et al., 2001).

Bei CyaB1₅₉₅₋₈₅₉K646E konnte aber keine GC-Aktivität festgestellt werden, was die Theorie der eigenständigen Faltung der substratbindenden Tasche von CyaB1 unterstützt.

Die Klasse-IIIb-ACn aus *Plasmodium* und *S. aurantiaca*, die ebenfalls an der Position des substratbindenden Aspartats ein Threonin oder Serin tragen, wurden bei computergestützten Vergleichen von Proteindomänen als bakterielle GC identifiziert. Es handelt sich aber auch um spezifische ACn (J. Weber und A. Hammer, persönliche Mitteilung). Das zeigt die Grenzen computergestützter Vorhersagen von Enzymeigenschaften auf, die Experimente letztlich nicht ersetzen können.

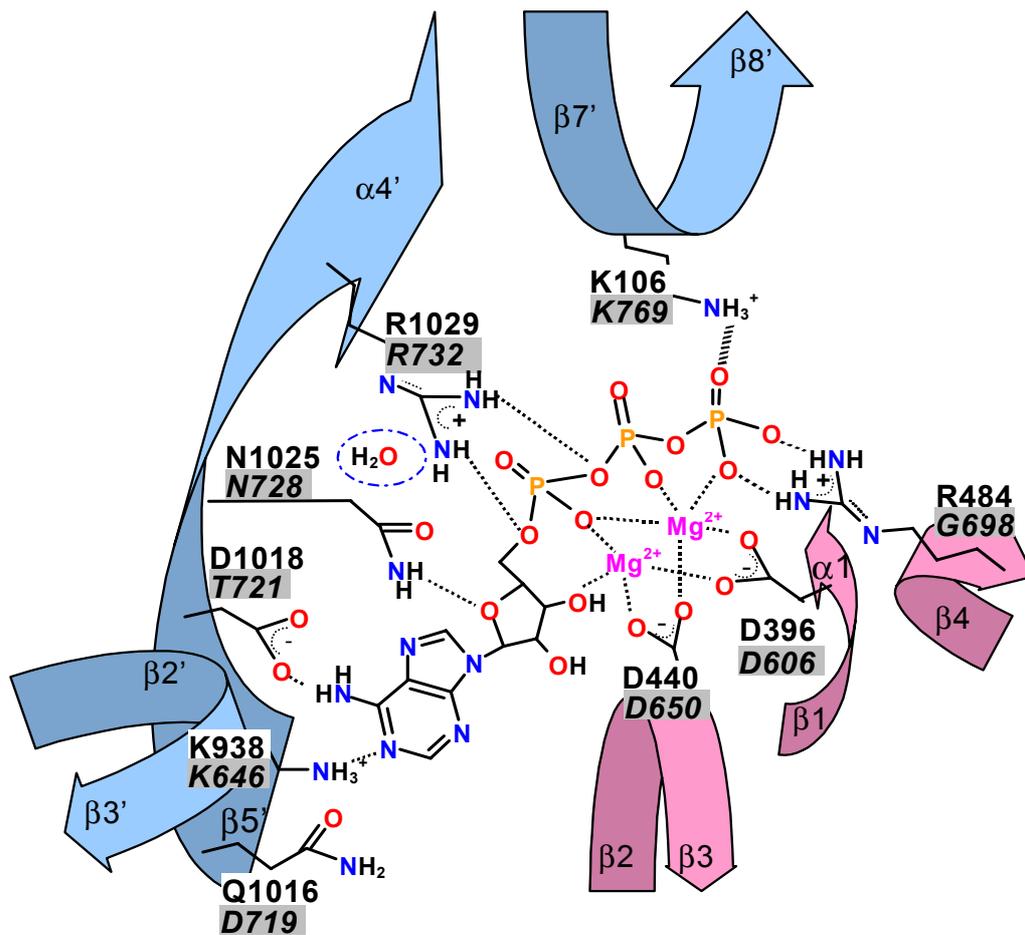


Fig.5-2: Schematische Darstellung der ATP-Bindung in der katalytischen Tasche von Klasse-III-ACn (Hurley, 1999; Tesmer et al., 1997; Tesmer et al., 1999). Die Nummerierung und Bezeichnung der Sekundärstrukturelemente und der ASn bezieht sich auf C1a der ACV vom Hund (rosa) und C2 der ACII von der Ratte (blau). Die korrespondierenden AS von Cyab1 sind kursiv und grau hinterlegt. Das Schema ist einer Darstellung von Dr. K. Hambach nachempfunden.

5.3 Das Holoenzym wird über seine GAF-Domänen durch cAMP aktiviert

Eines der herausragenden Ergebnisse dieser Arbeit ist die Funktionsaufklärung der N-terminalen GAF-Domänen als cAMP-gesteuerte Regulatoren der enzymatischen Aktivität.

Überraschenderweise fanden Tada et. al. keine Aktivierung durch cAMP bei CyaB1 (Tada et al. 2001). Die von den japanischen Kollegen gemessenen spezifischen Aktivitäten von CyaB1 einschließlich V_{\max} waren um bis zu tausendfach niedriger als hier berichtet. Da Tada et al. noch eine, wenn auch geringe Aktivität gemessen haben, kann man davon ausgehen, dass die katalytische AC-Domäne noch einigermaßen intakt war. Der Verlust der cAMP-Stimulierbarkeit könnte dadurch verursacht sein, dass u. U. an die fehlgefalteten GAF-Domänen kein cyclisches Nukleotid gebunden wurde oder aber dass die intramolekulare Signalweitergabe gestört war. Hier kommt vor allem dem 201 AS umfassenden Bereich zwischen GAF-Domänen und katalytischem Zentrum eine entscheidende, allerdings mechanistisch noch zu klärende Rolle zu. In dem von den japanischen Kollegen verwendeten Konstrukt könnte die Funktion der GAF-Domänen bzw. die Weitergabe ihres Signals auch durch das N-terminale *Maltose binding Protein*, das als *tag* für die Affinitätsreinigung genutzt wurde, empfindlich gestört worden sein. Immerhin ist der Affinitätsanker 40 kDa groß und damit möglicherweise strukturell nicht unbedeutend. Schließlich kann die cAMP-Aktivierbarkeit bei der Aufreinigung oder Lagerung des Proteins verloren gegangen sein, worüber in der Publikation von Tada et al. nicht näher berichtet wird. Ähnliches wurde kürzlich für die GAF-Domänen der PDE-5 beschrieben, die ihre cGMP-Aktivierbarkeit bei Lagerung von mehr als zwei Wochen verloren haben (Rybalkin et al. 2003). Dieser an sich banale Grund hat für fast ein Jahrzehnt zu teilweise wilden Spekulationen über die Regulation der PDE-5 geführt.

Schließlich mag der Misserfolg von Tada et al. zumindest teilweise in der verwendeten Messmethode für cAMP liegen, die erheblich unempfindlicher als die hier verwendete ist. Die japanischen Kollegen reinigten das entstandene cAMP per HPLC und quantifizierten es durch UV-VIS. Dabei geben Tada et al. nicht an, wieviel Protein sie im Test eingesetzt haben oder wie groß ihre Ausbeute bei der cAMP-Reinigung über HPLC gewesen ist. Obendrein kann diese Messmethode nicht zwischen zugesetztem und neugebildetem cAMP unterscheiden, was für die Ermittlung von cNMP-Dosiswirkungskurven (s. Fig.4-33) unbedingt notwendig ist. Die von mir verwendete Methode nach Salomon et al. (1979) erfasst hochspezifisch das von CyaB1 neugebildete [^{32}P]-cAMP und war damit hervorragend geeignet cAMP neben cGMP als weiteres cyclisches Nukleotid und als neuen Liganden der ubiquitär vorkommenden GAF-Domänen zu etablieren.

GAF-Domänen findet man in Proteinen der verschiedensten Lebensformen, wie in bisher proteinchemisch uncharakterisierten Signaltransduktionsenzymen aus Archebakterien, im Formiat-aktivierten Transkriptionsfaktor aus *E. coli* oder in Säuger-PDEn (Aravind and Ponting, 1997; Hopper and Böck, 1995). Bei letzteren wurde für die GAF-Domänen die Regulation der enzymatischen Aktivität via cGMP-Bindung bewiesen (McAllister-Lucas et al., 1993; Soderling and Beavo, 2000; Sonnenburg et al., 1991). Damit zeichnete sich eine Funktion als Rezeptor für eine Reihe von kleinen Molekülen ab, von denen außer cGMP bis jetzt nur Formiat und Ammonium bekannt waren (Anantharaman et al., 2001; Aravind and Ponting, 1997) Diese Arbeit etabliert cAMP als neuen Liganden für GAF-Domänen, deren spezifische Sequenzmerkmale bis jetzt für cGMP-Bindung verantwortlich gemacht wurden (Ho et al., 2000). Bei CyaB1 wurden die V_{\max} -Werte durch den Aktivator cAMP vervielfacht und der Anstieg des Quotienten aus V_{\max}/K_M war vom Me-Cofaktor-unabhängig. Das deutet auf einen direkten Effekt der cAMP-Bindung an die GAF-B-Domäne auf das katalytische Zentrum hin. Wie diese Kopplung genau funktioniert, ist eine drängende Frage, die noch geklärt werden muss. In diesem Zusammenhang könnte es interessant sein, dass bei der Klasse-II-AC aus *B. anthracis* die Bindung des Aktivators Calmodulin ans katalytische Zentrum nur die substratbindenden AS in ihrer Position verschiebt, was zu einer 1000fachen Aktivierung führt (Drum et al., 2002). Die zu anderen Klasse-III-ACn unterschiedliche Substratbindetasche von CyaB1 (s. o.) könnte auf eine spezielle Rolle bei der allosterischen Regulation durch nicht katalytische Proteindomänen hinweisen. Außerdem waren CyaB1₁₋₈₅₉R732A und CyaB1₁₋₈₅₉N728A, denen die klassischen Übergangszustand-stabilisierenden AS fehlen, noch cAMP aktivierbar. Es könnte bei der Aktivierung über die GAF-Domänen zu einem Effekt auf die substratfixierenden AS kommen, was aber durch weitere Mutationsstudien und strukturelle Untersuchungen gefestigt werden muss. Bisher führten Versuche mit Mutanten (in den GAF-Domänen der PDE-5) und computergestützte Modellierungstudien (mit YKG9) zu der Vermutung, dass die spezifische cGMP-Bindung in die GAF-Domänen der PDEn vor allem durch ein hochkonserviertes NKX_nFX₃DE-Motiv erzeugt wird (Granovsky et al., 1998; Ho et al., 2000; McAllister-Lucas et al., 1995; Turko et al., 1996). Bei CyaB1 ist dieses Motiv in beiden GAF-Domänen präsent und ein Austausch des konservierten Aspartat (D360) gegen Alanin in der GAF-B-Domäne führte zu einem Verlust der cAMP-Bindung und -Aktivierbarkeit. Dieses Motiv kann nicht für die Nukleotid-Diskriminierung verantwortlich sein, da es in GAF-Domänen vorkommt, die cAMP-, cGMP- oder kein cyclisches Nukleotid binden (z.B. CyaB1 GAF-A). Trotzdem hat das Motiv enorme Bedeutung für die Funktionsfähigkeit der GAF-Domäne, da die Mutation D360A die cAMP-Bindung und Aktivierung eliminierte. Die Ergebnisse lassen noch offen, ob der Verlust der cAMP Bindung durch eine unzugänglich gefaltete Bindungstasche, oder eine Änderung in der k_{on} - und k_{off} -Rate resultierte.

In einer kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur der PDE-2-GAF-Domänen steht keine AS des NKX_nFX₃DE-Motivs in direktem Kontakt mit dem gebundenen cGMP (Martinez et al., 2002). In dieser Struktur beruht die cGMP-Spezifität vor allem auf H-Brückenbindungen zu einem Aspartat und einem Threonin (D434 und T483 in der Ratten GAF-B Domäne, Pfeile in Fig.4-28), deren Beteiligung an der cGMP-Bindung bis jetzt unerkannt war. Dabei kontaktiert D434 über die Carboxylgruppe der Seitenkette das protonierte N¹-Atom und über das Amid-Rückrat das O⁶-Atom des Guanosinrings. In der cyanobakteriellen GAF-Domäne ist das Threonin konserviert (T323) während ein Alanin (A275) die Position des Aspartats einnimmt (Fig.4-28). Bei CyaB1A275D konnte aber die Nukleotid-Spezifität der GAF-B-Domäne nicht von cAMP nach cGMP geändert werden. Das war nicht völlig unerwartet, da das konservierte Threonin der GAF-B-Domäne von PDE-2 eine H-Brücke zur N²-Aminogruppe des cGMP bildet und cAMP eben keine N²-Aminosubstitution besitzt. Deshalb müssen in den GAF-B-Domänen der Ratten PDE-2 und CyaB1 unterschiedliche Bindungsmodi für die cyclischen Nukleotide existieren.

Dies ist ein weiterer Punkt, bei dem die experimentellen Daten dieser Arbeit nicht mit Röntgenkristallstrukturen übereinstimmen. Obwohl die Strukturen des Mammalia-AC-katalytischen Zentrums (Tesmer et al., 2000; Tesmer et al., 1997; Zhang et al., 1997) und der PDE-2 GAF-Domänen (Martinez et al., 2002) wahrscheinlich einen guten Überblick über die jeweilige Domänenstruktur geben, beschreiben sie doch nur einen eingefrorenen Zustand. Die Bedingungen, bei denen Proteinmoleküle kristallisiert werden, sind komplett unterschiedlich zu den Verhältnissen, bei denen die Katalyse oder Bindung stattfindet. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Tatsache, dass diese groben und rigiden Strukturen nicht unverändert auf die flexiblen Feinstrukturen der Andockstellen kleiner Moleküle (wie eine Substrat- oder Ligandenbindungsstelle) übertragen werden können. Diese nehmen in Proteinen wahrscheinlich ähnlich wie ein Fingerabdruck eine individuelle Konformation ein.

CyaB1 bevorzugt im Gegensatz zu den meisten anderen ACn ausdrücklich Mg²⁺ gegenüber Mn²⁺ als Metall-Cofaktor für die Cyclisierungsreaktion. Allerdings deutet das gleiche Verhältnis von V_{\max}/K_M bei Gegenwart von Mn²⁺ oder Mg²⁺ auf gleiche katalytische Effizienz für beide Cofaktoren hin. Ein interessanter Unterschied ist aber der zweiphasige Verlauf der cAMP-Dosis-Wirkungskurve mit Mn-ATP. Das suggeriert eine Bindung von cAMP an zwei verschiedene Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität (z.B. GAF-A und GAF-B), während bei Gegenwart von Mg²⁺ nur eine hochaffine cAMP-Bindungsstelle besetzt wird. Es wäre deshalb vorstellbar, dass ein divalentes Metallkation nicht nur für die katalytischen Reaktion, sondern auch für die cAMP-Bindung benötigt wird und dass Mg²⁺ bzw. Mn²⁺ diese Rolle unterschiedlich gut erfüllen.

Anabaena sp. PCC 7120 hat mindestens 6 Gene für funktionelle ACn (Kasahara et al., 2001; Katayama and Ohmori, 1997). Davon scheint CyaC die bedeutendste Rolle zur Erhaltung des intrazellulären cAMP Spiegels zu spielen, da hier die Transkriptionsrate am höchsten ist und ein *Knock out* das intrazelluläre cAMP am meisten reduziert (Katayama and Ohmori, 1997). Eine spannende Frage bleibt: was sind die möglichen physiologischen Funktionen für eine sich selbst-aktivierende AC wie CyaB1? *Anabaena* hat viele verschiedene Möglichkeiten zu differenzieren und sich damit vielfältigsten Umweltbedingungen anzupassen, so dass genügend Aufgaben für alle Isoformen denkbar wären. Als gramnegatives und filamentöses Bakterium assimiliert *Anabaena* photosynthetisch CO₂. Bei genügend Licht und ohne fixierten Stickstoff differenziert etwa jede zehnte Zelle in einen Heterocysten, der eine geeignete Umgebung für die neugebildeten extrem oxidationsempfindlichen Enzyme zur Stickstoffassimilation hat (Adams, 2000; Wolk, 1996). Ausserdem werden Proheterocysten gebildet, die sich im Unterschied zu Heterocysten wieder in die vegetative Form zurückdifferenzieren können. Schließlich können Akineten als sporenhähnliche Zellen zum Überdauern von Trockenperioden und Hormogonia als kurze mobile Filamente zur Verbreitung gebildet werden. Diese vielfältigen Differenzierungsmöglichkeiten zur Anpassung an die jeweiligen Umweltbedingungen benötigen eine Reihe von intra- und interzellulären Signaltransduktionsprozessen auf verschiedenen Ebenen. Hier wäre eine selbstaktivierende AC, die mit ihrem Verhalten eine einmal getroffene Entscheidung zur Entwicklung stabilisiert, vorstellbar. Sie könnte wie ein empfindlicher Schalter oder Transistor agieren, der Signale aufgrund geänderter Umweltbedingungen auffängt und interpretiert, um anschließend nachhaltige Wachstums- und Stoffwechselprogramme zu initiieren und/oder aufrecht zu erhalten. Natürlich wäre es spannend zu sehen, wie dieser Schalter wieder ausgeschaltet werden kann. Mit Hilfe von *Knock out* Versuchen, die in Kooperation mit Prof. Dr. Karl Forchhammer und Dr. Martin Cann ausgeführt werden, wird gerade versucht, die physiologische Funktion von CyaB1 herauszufinden.

5.4 Herstellung einer cGMP aktivierten CyaB1-AC

GAF-Domänen haben als *small-molecule-binding domain* (SMBD) keine eigene enzymatische Aktivität (Anantharaman et al., 2001; Aravind and Ponting, 1997). Ihre weite Verbreitung in allen Lebensformen und Arten von Proteinen legt den Gedanken nahe, dass sie früh in der Evolution optimiert wurden und nach dem Baukastenprinzip in verschiedenen regulatorischen Kontexten eingesetzt werden.

So viel konnte bisher aus bioinformatischen Studien hergeleitet werden. Jetzt kann diese Arbeit einen schlagenden Beweis für die Richtigkeit dieser Theorie liefern. Durch Austausch der cyanobakteriellen Tandem-GAF-Domänen gegen die von der Ratten PDE-2 konnte eine cGMP aktivierte AC geschaffen werden. Interessanterweise war die EC_{50} für cGMP mit $3 \mu\text{M}$ identisch mit der von der PDE-2 und cAMP hatte keinen Effekt mehr (Sonnenburg et al., 1991). Aber wie wird das Signal der Bindung des Liganden an die GAF-Domänen zur katalytischen Domäne weitergegeben? Offensichtlich funktionieren die GAF-Domänen nur als genau aufeinander abgestimmtes Ensemble, da ein Austausch einzelner Ratten GAF-Domänen oder das Entfernen der GAF-A- bzw. -B-Domäne zu massiven Expressionsproblemen und/oder komplettem Funktionsverlust führte.

Besonders faszinierend ist, dass die Ratten PDE-2 GAF-Domänen in einem cyanobakteriellen Proteinhintergrund funktionieren. Dieser enthält eine PAS-Domäne und eine ausgedehnte *Linker*-Region mit unbekannter Funktion, die das GAF-Ensemble von der katalytischen Domäne trennen (Fig.4-1). Wahrscheinlich ist die Aktivierung über die GAF-Domänen, die durch eine Bewegung strukturell rigider Proteindomänen in räumlich konservierter Weise zustande kommt, weitgehend unabhängig vom Kontext (Martinez et al., 2002). Das Prinzip eines solchen einfachen und erfolgreichen regulatorischen Schalters wurde über ca. 3 Milliarden Jahre konserviert und verbreitete sich in alle Lebensformen, wo es in Verbindung mit verschiedenen Effektor-Domänen noch heute funktioniert.

5.5 Herstellung einer Anabaena-Mycobakterium-AC-Chimäre

Die Kristallstruktur von Martinez et al. identifiziert die GAF-B-Domäne der PDE-2a als Ligandenbindungsdomäne, während die GAF-A-Domäne der Dimerisierung dient. Obwohl sie analog zur GAF-B-Ligandenbindungstasche einen Hohlraum ausbildet, konnte bis jetzt kein Ligand dafür gefunden werden. Die Chimäre aus dem cyanobakteriellen Regulator und dem mycobakteriellen katalytischen Zentrum CyaB1_{mycocat} zeigte eine lineare Proteinabhängigkeit und höhere spezifische Aktivität als Rv1625_{c204-443} unter gleichen Testbedingungen. Das unterstützt die Theorie der Dimerisierung über die GAF-Domänen, die das Protein schon in niedrigen

Konzentrationen als katalytisch aktives Dimer vorliegen lassen. Die cAMP-Aktivierbarkeit und damit die regulatorische Funktion der GAF-B Domäne ging aber verloren. Das sublime Zusammenspiel zwischen GAF-Domäne und katalytischem Zentrum hängt also nicht von der evolutionären Distanz ab, die von Cyanobakterien zu Mycobakterien viel kleiner ist als zu der Ratte, sondern von den strukturellen Voraussetzungen. Die erfolgreiche Herstellung von katalytisch aktiven Chimären aus CyaB1 mit anderen Proteinen lässt hoffen, dass mit weiteren neukombinierten Proteinen tiefergehende Einblicke in den evolutionären Baukasten der Natur gelingen und weitere neue Funktionen oder Liganden für GAF-Domänen gefunden werden.

5.6 Offene Fragen und Ausblick

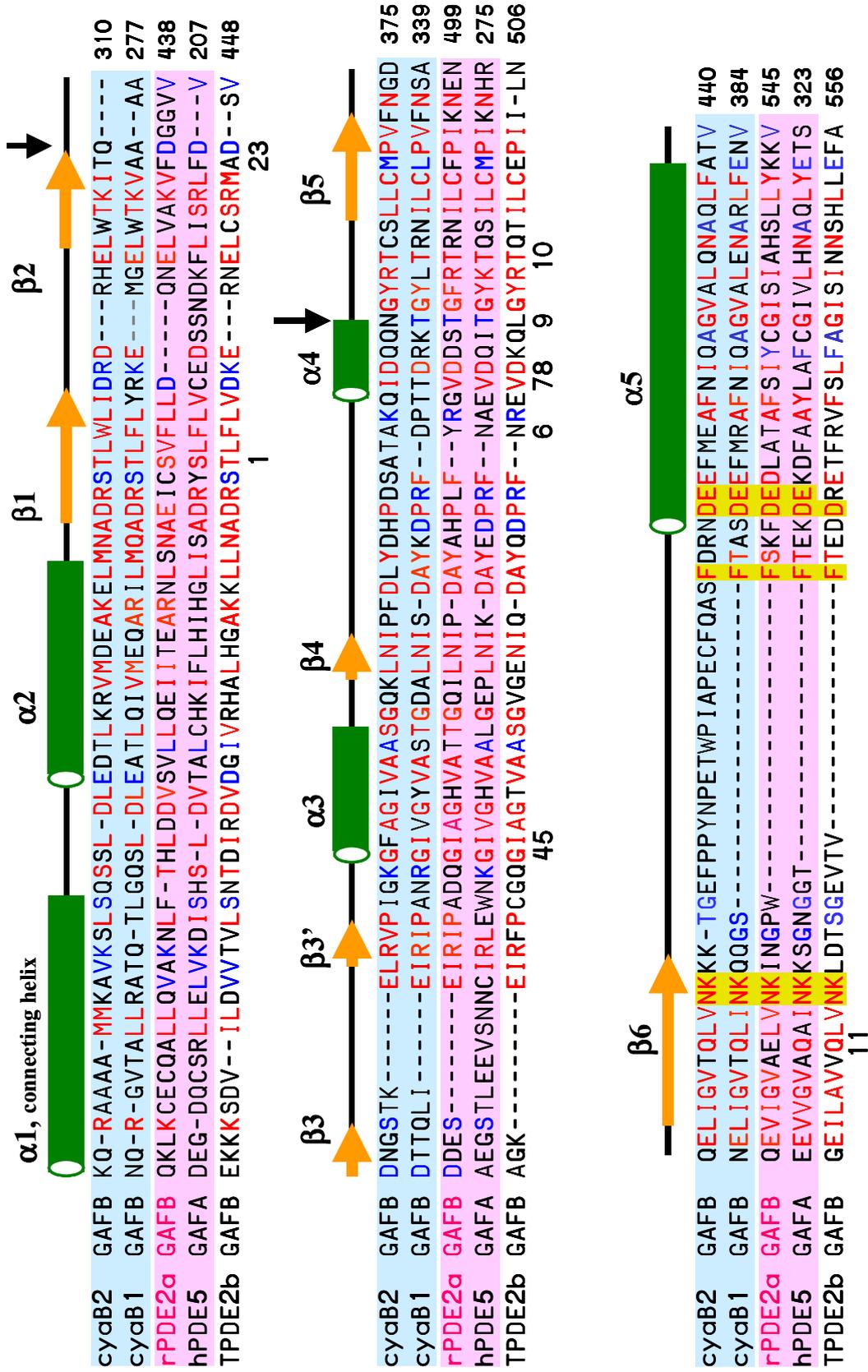
Die Rolle der PAS-Domänen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden (Ergebnisse einer *blast search* im Anhang). Die Trennung zweier unterschiedlicher Enzymfraktionen per FPLC und deren anschließende spektroskopische Untersuchung lieferten erste Hinweise auf einen möglichen Liganden für die PAS-Domäne. Aber weder Identität noch sein tatsächlicher Bindungsort konnte geklärt werden. Da die PAS-Domäne mit 70 AS relativ kurz ist, wäre es möglich, dass sie nicht als Ligandenbindungs- sondern als weitere Dimerisierungsdomäne dient. Ihre Funktion könnte auch mit dem anschließenden ca. 120 AS langen *Linker*-Bereich verknüpft sein, dessen Funktion unklar ist und der eine PAC-Domäne enthalten könnte (PD Dr. J. Linder, pers. Mitteilung). Gleichwohl deutet das Vorhandensein eines prolinreichen und flexiblen Bereichs sowie einer sehr schwach konservierten Struktur kurz vor der katalytischen Domäne auf die Möglichkeit der intramolekularen Rückbindung oder die Bildung intermolekularer Superstrukturen mit sich selbst oder anderen Proteinen hin (Dr. Aravind, NIH, Bethesda (USA), pers. Mitteilung). Erste Ergebnisse mit einem Konstrukt aus PAS-, katalytischer- und TPRL-Domäne zeigen eine hochaffine Dimerisierung der PAS-Domäne (PD Dr. J. Linder, pers. Mitteilung).

Auch die einzelne TPR-ähnliche Domäne von AS 795-828 (*Smart search*: E-value mit der Pfam-Domain = 1,6) lässt die meisten Fragen offen. Normalerweise kommen TPR Motive, die bis auf wenige charakteristische AS schwach konserviert sind, in mehreren Wiederholungen (3-16) pro Protein vor und bilden je eine A und B α -Helix aus, an die sich wiederum die α -Helices der anderen TPR-Domänen anlagern können (Lamb et al., 1995). Es sind sowohl intra- als auch intermolekulare TPR-Wechselwirkungen beschrieben worden, die auf eine Rolle bei der Bildung von Dimeren und Tetrameren schließen lassen. Aber auch *TPR-non-TPR*-Interaktionen sind möglich, was bei intramolekularen Proteinrückfaltungen, Kontakten mit anderen Proteinen und während der Proteinsynthese eine Rolle spielen kann. Die experimentellen Daten dieser Arbeit zeigen, dass eine Entfernung der TPRL-Domäne beim Holoenzym oder bei der katalytischen Domäne fatal für die Expression war.

Die Aufklärung der cAMP-spezififizierenden ASn in den GAF-Domänen von CyaB1 bleibt ein brennendes Problem. Das Isoenzym CyaB2, dessen GAF-Domänen ebenfalls das NKX_nFX₃DE-Motiv besitzen und 52 % Ähnlichkeit bzw. 44 % Identität zu denen von CyaB1 aufweisen (Fig. 5-3), ist ebenfalls spezifisch cAMP aktivierbar, wie gerade beginnende Versuche von PD Dr. J. Linder zeigen.

Beide GAF-Domänen weisen eine frappierende Ähnlichkeit zu den cGMP-bindenden GAF-Domänen von Ratten-PDE-2 und humaner PDE-5 auf. Die GAF-B-Domäne der PDE-2c aus *Trypanosoma brucei* zeigt große Übereinstimmungen zu den cAMP-bindenden (48 % Ähnlichkeit und 37 % Identität mit CyaB1-GAF-B) und zu den cGMP-bindenden GAF-Domänen (51 % Ähnlichkeit und 40 % Identität mit GAF-B der Ratten-PDE2). Sie hat im konservierten NKX_nFX₃DE-Motiv ein R anstelle des E (s. Fig. 5-3) und ihr Ligand ist noch unbekannt. Es wurden neue Chimären mit CyaB1 konstruiert, deren Verhalten gegenüber potentiellen Aktivatoren getestet werden soll. Dazu und zur Herstellung von Chimären mit anderen Proteinen ist eine genauere Kenntnis der GAF-Domänen als universeller Baustein zur Bindung kleiner Moleküle und ihres Zusammenspiels mit den anderen Proteindomänen von CyaB1 notwendig. Mit der Kopplung von GAF-Domänen als hochaffinen Molekülrezeptor mit dem katalytischen Zentrum der AC, dessen enzymatische Aktivität als Messgröße mit gut etablierten, robusten und hochempfindlichen Testmethoden bestimmt werden kann, könnten neuartige qualitative und quantitative Assays für neue und bekannte GAF-Liganden etabliert werden.

Fig. 5-3 (nächste Seite): Alignment der GAF-Domänen (cyaB1/cyaB2 = CyaB1/CyaB2 aus *Anabaena sp. PCC7120*, rPDE2a = Ratten-PDE-2a, hPDE5 = humane PDE-5, TPDE2b = PDE-2b aus *T. brucei*), die bekanntermaßen ein cyclisches Nukleotid (für cAMP hellblau und für cGMP rosa hinterlegt) binden, mit der GAF-B-Domäne der PDE-2b aus *Trypanosoma brucei*, deren Ligand unbekannt ist. In der Oberzeile sind die Sekundärstrukturelemente nach der Kristallstruktur von Martinez et al. angegeben. Die Pfeile kennzeichnen die für die Purinspezifität der PDE-2a verantwortlichen AS und die Zahlen markieren die AS, die das gebundene cGMP kontaktieren (Martinez et al., 2002). Rote Färbung gibt 80 % und blaue 60 % Ähnlichkeit an. Das konservierte NKX_nFX₃DE-Motiv ist gelb hinterlegt. Die Fig. wurde freundlicherweise von Prof. Dr. J. E. Schultz zur Verfügung gestellt.



6 Zusammenfassung

Das Gen *CyaB1* aus dem Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7120 codiert für ein Protein, das aus zwei N-terminalen GAF-Domänen (GAF-A und GAF-B), einer PAS-Domäne, einer Klasse-IIIb-AC katalytischen Domäne und einer TPR-ähnlichen Domäne besteht. Die katalytische Domäne wurde charakterisiert und mit Rekonstitutionsversuchen von Punktmutanten, die einzeln inaktiv sind, wurde die Bildung katalytisch aktiver Homodimere nachgewiesen. Weitere Punktmutationen der katalytisch aktiven AS zeigten, dass die Faltung der katalytischen Domäne von *CyaB1* unterschiedlich zu den Mammalia-ACn ist. Die spezifische Aktivität des Holoenzym stieg exponentiell mit der Inkubationszeit an, da das Reaktionsprodukt cAMP dosisabhängig und nukleotidspezifisch als Aktivator der enzymatischen Aktivität (halbmaximale Aktivierung bei 1 μM) fungiert und damit als neuer GAF-Domänen Ligand identifiziert werden konnte. Punktmutationen in der GAF-A oder GAF-B Domäne enthüllten, dass für die Aktivierung eine Bindung von cAMP an die GAF-B Domäne erforderlich ist. Das cyanobakterielle GAF-Domänen Ensemble konnte gegen das GAF-A/-B-Ensemble der cGMP stimulierten Ratten-PDE-2 ausgetauscht werden und verwandelte *CyaB1* in eine cGMP stimulierte Adenylatcyclase. Weitergehende Versuch mit einzeln ausgetauschten oder deletierten GAF-Domänen sowie Chimären mit der mycobakteriellen AC Rv1625c zeigen, dass Tandem GAF-Domänen nur als fein aufeinander abgestimmtes Ensemble funktionieren, in dem eine der GAF-Domänen vor allem der Dimerisierung dient. Die Versuche mit den Proteinchimären zeigen die funktionelle Konservierung des bewährten Prinzips der Aktivierung durch GAF-Domänen, das vor über 3 Milliarden Jahren entwickelt wurde und sich in alle Phyla ausbreitete. In Cyanobakterien könnte *CyaB1* als cAMP gesteuerter Schalter zur Stabilisierung einmal getroffener Entwicklungsentscheidungen dienen.

7 Anhang

7.1 Ergebnisse der BLASTP Datenbanksuche

Gezeigt sind die Ergebnisse einer blast search [BLASTP 2.2.4 (Aug-26-2002); Altschul et al., 1997; Schaffer et al., 2001] vom 22.10.2002. Zu jeder Domäne sind wenn möglich die ersten 10 Einträge aus Proteindatenbanken, die die höchste Ähnlichkeit zu der jeweiligen Domäne aufweisen und mindestens 3 Einzelalignments angeben. Die Einträge sind nach steigenden *E values* geordnet. Das ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass die errechnete Ähnlichkeit ein Zufallstreffer ist und sollte deshalb möglichst klein sein. Die Proteindatenbanken waren: *All non-redundant GenBank CDS translations* + PDB + SwissProt + PIR + PRF.

7.1.1 GAF A

7.1.1.1 Hits 1-10

Sequences producing significant alignments	Score (bits)	<i>E Value</i>	Spezies
gi 23125697 gb ZP_00107619.1 (NZ_AABC01000134) hypothetical protein	286	4e-77	Nostoc punctiforme
gi 23039680 gb ZP_00071232.1 (NZ_AAAU01000003) hypothetical protein	286	4e-77	Trichodesmium erythraeum IMS101
gi 23129028 gb ZP_00110862.1 (NZ_AABC01000190) hypothetical protein	125	2e-28	Nostoc punctiforme
gi 1754640 dbj BAA13999.1 (D89624) adenylate cyclase	110	7e-24	Anabaena sp.
gi 17229396 ref NP_485944.1 (NC_003272) adenylate cyclase	110	7e-24	Nostoc sp. PCC 7120
gi 23127008 gb ZP_00108886.1 (NZ_AABC01000163) hypothetical protein	108	2e-23	Nostoc punctiforme
gi 8218102 emb CAB92797.1 (AL117345) dJ416F21.1 (phosphodiesterase 10A)	88	4e-17	Homo sapiens
gi 6683035 dbj BAA88997.1 (AB027156) PDE10A3	88	4e-17	Rattus norvegicus
gi 13489075 ref NP_071572.1 (NM_022236) phosphodiesterase 10A. testis-specific	88	4e-17	Rattus norvegicus
gi 10716139 dbj BAB16383.1 (AB041779) phosphodiesterase 10A1	88	4e-17	Homo sapiens

7.1.1.2 Einzelalignments der Hits 1-3

```
>gi|23125697|gb|ZP_00107619.1|(NZ_AABC01000134)[Nostoc punctiforme]
Length = 858 Score = 286 bits (733),
Expect = 4e-77 Identities = 141/158 (89%), Positives = 149/158 (94%)
```

```
Query: 1 QFLRAIELINNEALENMLEKVLEAITLKIGQILQAEHTAIFLVDYDKCQLWSKVPQDNGQ 60
          QFLRAIELINNEALE MLEKVLEAITLKIGQILQAEHTAIFLVD+DK QLWSKVPQDN Q
Sbjct: 50 QFLRAIELINNEALETMLEKVLEAITLKIGQILQAEHTAIFLVDHDKQLWSKVPQDNSQ 109
```

Query: 61 KFLEIRIPITVGI PGH VASTGQYLN ISETATHPLF SPELERQMGYKINNILCMPVSSKD 120
 KFLEIR P+TVGI PGH VASTGQYLN ISET THPLF SPELE+QMGYKI+NILCMPV SSK+
 Sbjct: 110 KFLEIRTPMTVGI PGH VASTGQYLN ISETYTHPLF SPELEKQMGYKIHNILCMPVTSSKN 169

Query: 121 QIVAVVQLANKTGNIPFNRNDEESFRDFAASIGIILET 158
 Q VAVVQLANKTGN+PFN +DEE FRDFAASIGIILE+
 Sbjct: 170 QTVAVVQLANKTGNVFPNHDDEERFRDFAASIGIILES 207

>gi|23039680|gb|ZP_00071232.1| (NZ_AAAU01000003) hypothetical protein
 [Trichodesmium erythraeum IMS101] Length = 864 Score = 161 bits (407),
 Expect = 3e-39 Identities = 81/160 (50%), Positives = 117/160 (72%), Gaps =
 2/160 (1%)

Query: 1 QFLRAIELINNEALENMLEKVLEAITLKIGQILQAEHTAIFLVDYDKCQLWSKVPQDNGQ 60
 Q+L+AI+LINNE +E + E++L A TLKIGQ+L+A+ T IFLV+ +K QLW K ++
 Sbjct: 48 QYLQAIIDLINNEGIETVFEQLLNAFTLKIGQVLKADQTTIFLVNQEKQLWYKKILESTG 107

Query: 61 KFLEIRIPITVGI PGH VASTGQYLN ISETATHPLF SPELERQMGYKINNILCMPVSSKD 120
 K E +PI VGI GHVA+TG+ LNI++ +HPLF+ E+++ GY+ ILC+P+ S+ +
 Sbjct: 108 KSQEYHLPINVGILGHVATTGEALNIADAKSHPLFNDEEVDQPQGYETRTILCIPFSTIN 167

Query: 121 --QIVAVVQLANKTGNIPFNRNDEESFRDFAASIGIILET 158
 Q VAVV+L NK ++PF+ DE+ FR FA S+GIILE+
 Sbjct: 168 FLQPVAVVRLLNKVSDVPFDEEDEKLFERSFADSMGIILES 207

>gi|23129028|gb|ZP_00110862.1| (NZ_AABC01000190) hypothetical protein [Nostoc
 punctiforme] Length = 465 Score = 125 bits (314),
 Expect = 2e-28 Identities = 63/157 (40%), Positives = 99/157 (62%)

Query: 1 QFLRAIELINNEALENMLEKVLEAITLKIGQILQAEHTAIFLVDYDKCQLWSKVPQDNGQ 60
 +F + LI+NEA LE+++EAITLKI +LQAE + IF+VD LWS++ Q N +
 Sbjct: 292 EFQSFLSLIDNEATGKCLEEIIIEAITLKITHLLQAERSTIFIVDDTSGNLWSEIIQSNRK 351

Query: 61 KFLEIRIPITVGI PGH VASTGQYLN ISETATHPLF SPELERQMGYKINNILCMPVSSKD 120
 K L++ I G+ HVA+T + LNI +SP ++ Q GY+ NILC+P+++S+
 Sbjct: 352 KILKVGITAHFGVAHVAAATRECLNIPIALQDYRYSPAIDEQTGYQTRNILCLPILNSQS 411

Query: 121 QIVAVVQLANKTGNIPFNRNDEESFRDFAASIGIILE 157
 +++A+ Q+ NK GN F+R DE+ +F+ I I +
 Sbjct: 412 KVLAISQVLNKIGNNCFDRKDEQLLGEFSQQISAIFD 448

7.1.2 GAF B

7.1.2.1 Hits 1-10

Sequences producing significant alignments	Score (bits)	<i>E Value</i>	Spezies
gi 23125697 gb ZP_00107619.1 (NZ_AABC01000134) hypothetical protein	270	3e-72	Nostoc punctiforme
gi 23039680 gb ZP_00071232.1 (NZ_AAAU01000003) hypothetical protein	220	3e-57	Trichodesmium erythraeum IMS101
gi 23043682 gb ZP_00074939.1 (NZ_AAAU01000099) hypothetical protein	136	5e-32	Trichodesmium erythraeum IMS101
gi 23127008 gb ZP_00108886.1 (NZ_AABC01000163) hypothetical protein	132	8e-32	Nostoc punctiforme
gi 1754640 dbj BAA13999.1 (D89624) adenylate cyclase [Anab	132	2e-30	Anabaena sp.
gi 17229396 ref NP_485944.1 (NC_003272) adenylate cyclase .	112	2e-30	Nostoc sp. PCC 7120
gi 23510317 ref NP_700471.1 (NM_153422) cGMP-binding/cGMP-specific phosphodiesterase	111	1e-24	Mus musculus
gi 15812214 ref NP_237223.1 (NM_033431) phosphodiesterase 5A isoform 4; cGMP-binding	111	3e-24	Homo sapiens
gi 4505667 ref NP_001074.1 (NM_001083) phosphodiesterase 5A isoform 1; cGMP-binding	111	3e-24	Homo sapiens
gi 15812216 ref NP_246273.1 (NM_033437) phosphodiesterase 5A isoform 3; cGMP-binding	111	4e-24	Homo sapiens

7.1.2.2 Einzelalignments der Hits 1-3

>gi|23125697|gb|ZP_00107619.1|(NZ_AABC01000134) hypothetical protein [Nostoc punctiforme] Length = 858 Score = 270 bits (691), Expect = 3e-72 Identities = 138/151 (91%), Positives = 143/151 (94%), Gaps = 1/151 (0%)

Query: 1 LEATLQIVMEQARILMQADRSTLFLYRKEMGELWTKVAAAAADTTQLIEIRIPANRGIVGY 60
LEATLQIVMEQARILMQADRSTLFLYRKEM ELWTKV AAAD T L+EI IPANRGI GY
Sbjct: 237 LEATLQIVMEQARILMQADRSTLFLYRKEMSELWTKV-AAADGTNLLLEICIPANRGIAGY 295

Query: 61 VASTGDALNISDAYKDPRFDPPTDRKTGYLTRNLCPLIFNSANELIGVTQLINKQQGSF 120
VASTG ALNISDAYKDPRFDP+TDRKTGY+TRNLCPL+FNSANELIGVTQLINKQQ SF
Sbjct: 296 VASTGQALNISDAYKDPRFDPSTDRKTGYVTRNLCPLPVFNSANELIGVTQLINKQQNSF 355

Query: 121 TASDEEFMRAFNIQAGVALENARLFENVLLE 151
TASDEEFMRAFNIQAG+ALENARLFENVLLE
Sbjct: 356 TASDEEFMRAFNIQAGIALENARLFENVLLE 386

>gi|23039680|gb|ZP_00071232.1|(NZ_AAAU01000003) hypothetical protein [Trichodesmium erythraeum IMS101] Length = 864 Score = 220 bits (561), Expect = 3e-57 Identities = 108/151 (71%), Positives = 128/151 (84%), Gaps = 1/151 (0%)

Query: 1 LEATLQIVMEQARILMQADRSTLFLYRKEMGELWTKVAAAAADTTQLIEIRIPANRGIVGY 60
LE TL+ VM+QAR LMQADRSTLFL KE ELWTKV A D T+++EIRIPA+RGI GY
Sbjct: 237 LETTLRAVMDQARNLMQADRSTLFLLSKETNELWTKV-ATVDQTRMVEIRIPAHRGIAGY 295

Query: 61 VASTGDALNISDAYKDPRFDPTTDRKTYLTRNLCPLIFNSANELIGVTQLINKQQGSF 120
 VASTG LNI DAY DPRFDP+TD+KTGY TRN+LC+P++N+ ELIGVTQLINK QGSF
 Sbjct: 296 VASTGQTLNIPDAYLDPRFDPSTDKKTYQTRNVLCMPVYNAGKELIGVTQLINKNQGSF 355

Query: 121 TASDEEFMRAFNIQAGVALENARLFENVLLE 151
 T SDE+F+ AFN QAG+AL+N++LFENVL+E
 Sbjct: 356 TTSDEQFLAFNAQAGIALQNSQLFENVLVE 386

>gi|23043682|gb|ZP_00074939.1| (NZ_AAAU01000099) hypothetical protein
 [Trichodesmium erythraeum IMS101] Length = 911 Score = 137 bits (344),
 Expect = 5e-32 Identities = 85/174 (48%), Positives = 105/174 (59%), Gaps =
 26/174 (14%)

Query: 1 LEATLQIVMEQARILMQADRSTLFLYRKEMGELWTKVAAAADTTQLIEIRIPANRGIVGY 60
 LE TL VM QAR LM ADRST++L + +LWTK+ T EIRI N+G VG
 Sbjct: 308 LEDTLDKVMYQARELMNADRSTIWLIDNDKNQLWTKILIDGKRT---EIRIDKNQGFVGM 364

Query: 61 VASTGDALNIS-DAYKDPR--FDPTTDRKTYLTRNLCPLIFNSANELIGVTQLINKQ- 116
 VA++G+ L I D YKD R TD KTY T ++LC+P+FN NELIGVTQL+NK+
 Sbjct: 365 VATSGETLLIPFDVYKDSRSVTAKETDEKTYRTCSLLCMPVFNNDNELIGVTQLVNKKK 424

Query: 117 -----QGSFTASDEEFMRAFNIQAGVALENARLFENVLLE 151
 + SF D EFM+AFNIQAGVAL+NA+LF+ V E
 Sbjct: 425 QGEYPAYNPANWPNAPEQWKASFNRDDLEFMKAFNIQAGVALQNAKLFDTVKQE 478

7.1.2.3 Weitere ausgewählte Einzelalignments

>gi|23127008|gb|ZP_00108886.1| (NZ_AABC01000163) hypothetical protein [Nostoc
 punctiforme] Length = 861 Score = 136 bits (343),
 Expect = 8e-32 Identities = 79/171 (46%), Positives = 107/171 (62%), Gaps =
 25/171 (14%)

Query: 1 LEATLQIVMEQARILMQADRSTLFLYRKEMGELWTKVAAAADTTQLIEIRIPANRGIVGY 60
 LE TL+ VM++A+ LM ADRSTL+L + ELWTK+ +T+ E+R+P +G G
 Sbjct: 273 LEDTLKRVMEAKELMNADRSTLWLIDHRHELWTKITQDDGSTK--ELRVPVGGKGFAGI 330

Query: 61 VASTGDALNIS-DAYKDPRFDPTT--DRKTYLTRNLCPLIFNSANELIGVTQLINKQ- 116
 VA++G LNI+ D Y DP D D++ GY T ++LC+P+FN+ +LIGVTQL+NK+
 Sbjct: 331 VAASGKLNIAFDLYYDPDSDTAKQLDQQNGYRTCSLLCMPVFNADQQQLIGVTQLVNKKK 390

Query: 117 -----QGSFTASDEEFMRAFNIQAGVALENARLFENV 148
 Q SF +DEEFM AFNIQAGVAL+NA+LF V
 Sbjct: 391 TGDFPAYNPADWPKAPDCFQASFRNDEEFMEAFNIQAGVALQNAQLFATV 441

>gi|12003123|gb|AAG43461.1|AF192755_1 (AF192755) cyclic nucleotide phospho-
 diesterase [Trypanosoma brucei] Length = 930
 Score = 109 bits (272), Expect = 1e-23
 Identities = 62/151 (41%), Positives = 91/151 (60%), Gaps = 9/151 (5%)

Query: 1 LEATLQIVMEQARILMQADRSTLFLYRKEMGELWTKVAAAADTTQLIEIRIPANRGIVGY 60
 ++ ++ + A+ L+ ADRSTLFL KE EL +++ AD+ EIR P +GI G
 Sbjct: 408 VDGIVRHALHGAKKLLNADRSTLFLVDKERNELCSSRM---ADSVAGKEIRFPCGQGIAGT 464

Query: 61 VASTGDALNISDAYKDPRFDPTTDRKTYLTRNLCPLIFNSANELIGVTQLINKQQGS- 119
 VA++G NI DAY+DPRF+ D++ GY T+ ILC PI + E++ V QL+NK S
 Sbjct: 465 VAASGVGENIQDAYQDPRFNREVDKQLGYRTQTILCEPIILNG-EILAVVQLVNKLDTS 523

Query: 120 ----FTASDEEFMRAFNIQAGVALENARLFE 146
 FT D E R F++ AG+++ N+ L E
 Sbjct: 524 EVTVFTEDDRETFRVFSLFAGISINNSHLLLE 554

>gi|21300084|gb|EAA12229.1| (AAAB01008964) ebiP6713 [Anopheles gambiae str. PEST] Length = 491 Score = 108 bits (269),
 Expect = 3e-23 Identities = 63/145 (43%), Positives = 87/145 (59%), Gaps = 4/145 (2%)

Query: 5 LQIVMEQARILMQADRSTLFLYRKEMGELWTKVAAAADTTQLIEIRIPANRGIVGYVAST 64
 L+ VM +A+ L A+R +LFL K GEL +KV + ++ EIRI + +GI GYVA T
 Sbjct: 5 LRGVMTEAKELAAAERC SLFLLDKHTGELVSKVFDGNEASK--EIRIESGKGIAGYVAQT 62

Query: 65 GDALNISDAYKDPFRDPTTDRKTYLTRNLCPLIFNSANELIGVTQLINKQQG-SFTAS 123
 G LNI +AY+ P F D TG+ TRNILC PI + +IGV QL NK G F
 Sbjct: 63 GKLLNIRNAYQHPLFYKGVDESTGFKTRNLCFPICDEEG-VIGVAQLCNKLNLFHFDKC 121

Query: 124 DEEFMRAFNIQAGVALENARLFENV 148
 DEE AF++ G+++ +A + + V
 Sbjct: 122 DEEVATAFSVYCGISIMHALVHKQV 146

7.1.3 PAS

7.1.3.1 Hits 1-10

Sequences producing significant alignments	Score (bits)	<i>E Value</i>	Spezies
gi 23125697 gb ZP_00107619.1 (NZ_AAABC01000134) hypothetical protein	147	2e-31	Nostoc punctiforme
gi 23039680 gb ZP_00071232.1 (NZ_AAAU01000003) hypothetical protein	134	2e-21	Trichodesmium erythraeum IMS101
gi 23043682 gb ZP_00074939.1 (NZ_AAAU01000099) hypothetical protein	102	0,11	Trichodesmium erythraeum IMS101
gi 23126467 gb ZP_00108361.1 (NZ_AAABC01000152) hypothetical protein	36	0,12	Nostoc punctiforme
gi 1754640 dbj BAA13999.1 (D89624) adenylate cyclase	36	0,15	Anabaena sp.
gi 17229396 ref NP_485944.1 (NC_003272) adenylate cyclase	36	0,15	Nostoc sp. PCC 7120
gi 23127008 gb ZP_00108886.1 (NZ_AAABC01000163) hypothetical protein	36	0,20	Nostoc punctiforme
gi 20808059 ref NP_623230.1 (NC_003869) Sensory transduction histidine kinases	35	0,21	Thermoanaerobacter tengcongensis
gi 21222412 ref NP_628191.1 (NC_003888) putative bifunctional protein (histidine kinase and regulator	35	0,22	Streptomyces coelicolor A3 (2)
gi 6687470 emb CAB64973.1 (AJ012050) VicK protein	35	0,22	Enterococcus faecalis

7.1.3.2 Einzelalignments der Hits 1-3

>gi|23125697|gb|ZP_00107619.1|(NZ_AABC01000134) hypothetical protein [Nostoc punctiforme] Length = 858 Score = 134 bits (338),
Expect = 2e-31 Identities = 65/72 (90%), Positives = 69/72 (95%)

Query: 1 ILQSLSDAVISTDMAGRIVTINDAALELLGCP+ D N KS+KLLWEQNLIGR+VWE+VPI 60
ILQSLSDAVISTDMAGRIVTINDAALELLGCP+ D N KS+KLLWEQNLIGR+VWE+VPI
Sbjct: 393 ILQSLSDAVISTDMAGRIVTINDAALELLGCPVKDTNTKSHKLLWEQNLIGRLVWEVVPI 452

Query: 61 ENLQMRLEDSLK 72
ENLQMRLEDSLK
Sbjct: 453 ENLQMRLEDSLK 464

>gi|23039680|gb|ZP_00071232.1|(NZ_AAAU01000003) hypothetical protein
[Trichodesmium erythraeum IMS101] Length = 864 Score = 102 bits (253),
Expect = 2e-21 Identities = 47/72 (65%), Positives = 61/72 (84%), Gaps = 1/72
(1%)

Query: 1 ILQSLSDAVISTDMAGRIVTINDAALELLGCP+ DANHKS+KLLWEQNLIGR+VWE+VPI 59
IL+SLSD VISTDM GRIVTIN+AALE+LGCP+ + ++N+ +WE+ LIGR +WE++P
Sbjct: 393 ILRSLSDVISTDMQGRIVTINEAALEMLGCPINQEVKGQTNRKVWEEKLIGRYLWEVPI 452

Query: 60 IENLQMRLEDSL 71
IENL+ RLEDSL
Sbjct: 453 IENLRFRLLEDSL 464

>gi|23043682|gb|ZP_00074939.1|(NZ_AAAU01000099) hypothetical protein
[Trichodesmium erythraeum IMS101] Length = 911 Score = 36.2 bits (82), Expect
= 0.11 Identities = 17/35 (48%), Positives = 25/35 (70%)

Query: 1 ILQSLSDAVISTDMAGRIVTINDAALELLGCP+ 35
IL+SLS+ VISTD G+++ N++A +LLG D
Sbjct: 485 ILRSLNGVISTDKKQVIATNESARDLLGISYTD 519

7.1.4 AC-katalytisches Zentrum

7.1.4.1 Hits 1-10

Sequences producing significant alignments	Score (bits)	<i>E Value</i>	Spezies
gi 23125697 gb ZP_00107619.1 (NZ_AABC01000134) hypothetical protein	294	4e-79	Nostoc punctiforme
gi 23039680 gb ZP_00071232.1 (NZ_AA AU01000003) hypothetical protein	243	8e-64	Trichodesmium erythraeum IMS101
gi 23043682 gb ZP_00074939.1 (NZ_AA AU01000099) hypothetical protein	221	5e-57	Trichodesmium erythraeum IMS101
gi 23126467 gb ZP_00108361.1 (NZ_AABC01000152) hypothetical protein	221	5e-57	Nostoc punctiforme
gi 1754640 dbj BAA13999.1 (D89624) adenylate cyclase	216	8e-56	Anabaena sp.
gi 17229396 ref NP_485944.1 (NC_003272) adenylate cyclase	186	9e-47	Nostoc sp. PCC 7120
gi 23127008 gb ZP_00108886.1 (NZ_AABC01000163) hypothetical protein	161	5e-39	Nostoc punctiforme
gi 23043682 gb ZP_00074939.1 (NZ_AA AU01000099) hypothetical protein	135	2e-31	Trichodesmium erythraeum IMS101
gi 24197207 gb AAN50484.1 AE011489_6(AE011489) adenylate cyclase	135	3e-31	Leptospira interrogans serovar lai str. 56601
gi 23013499 gb ZP_00053387.1 (NZ_AA AP01003744) hypothetical protein	130	7e-30	Magnetospirillum magnetotacticum

7.1.4.2 Einzelalignments der Hits 1-3

>gi|23125697|gb|ZP_00107619.1|(NZ_AABC01000134) hypothetical protein [Nostoc punctiforme] Length = 858 Score = 294 bits (753),
Expect = 4e-79 Identities = 145/185 (78%), Positives = 152/185 (81%)

Query: 1 GERKEVTVLFS DIRGYTTLTENLGAAEVVSLLNQYFETMVEAVFN YEGTLDKFIGDALMA 60
GERK+VT+LFS DIRGYTTLTEN+GAAEV+SLLNQYFETMVEAVFN YEGTLDKFIGDALMA
Sbjct: 594 GERKDVITLFS DIRGYTTLTENIGAAEVL SLLNQYFETMVEAVFN YEGTLDKFIGDALMA 653

Query: 61 VFGAPLPLTENHAWQAVQSALDMRQRLKEFXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 120
VFGAPLPLTENHAW+AVQSALDMRQRL+EF
Sbjct: 654 VFGAPLPLTENHAWRAVQSALDMRQRLEEFNQRRRIQAQPQIHIGIGISSGEVVS GNIGS 713

Query: 121 HKRMDYTVIGDGVNLSSRLETVTKEYGCDIILSEFTYQLCSDRIWVRQLDKIRVKGKHQA 180
KRMDYTVIGD VNLSSRLE VTKEYGCDIILSEFTYQ+CSDRIWVRQLDKIRVKGKHQA
Sbjct: 714 RKRMDYTVIGDSVNLSSRLEAVTKEYGCDIILSEFTYQMCS DRIWVRQLDKIRVKGKHQA 773

Query: 181 VNIYE 185
VNIYE
Sbjct: 774 VNIYE 778

>gi|23039680|gb|ZP_00071232.1|(NZ_AAAU01000003) hypothetical protein
 [Trichodesmium erythraeum IMS101] Length = 864 Score = 243 bits (620),
 Expect = 8e-64 Identities = 127/185 (68%), Positives = 143/185 (76%), Gaps =
 3/185 (1%)

Query: 1 GERKEVTVLFS DIRGYTTLTENLGAAEVVSLLNQYFETMVEAVFNIEGTLTKFIGDALMA 60
 GERKEVT+LFS DIRGYTT+TENL A+EVV LLNQYFETMVEAVFN++GTLTKFIGDALMA
 Sbjct: 603 GERKEVTILFS DIRGYTTITENLEASEVVKLLNQYFETMVEAVFNHQGTLDKFIGDALMA 662

Query: 61 VFGAPLPLTENHAWQAVQSALDMRQRLKEFXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 120
 VFGAPL + E+HA AV++ALDMR RL+EF
 Sbjct: 663 VFGAPLSI-EDHALMAVKTALDMRYRLREF--NLSRPHETQFKIGVGISSGGVVSGNIGS 719

Query: 121 HKRMDYTVIGDGVNLSRLETVTKEYGCDIILSEFTYQLCSDRIWVRQLDKIRVKGKHQA 180
 KRMDYTVIGDGVNLSRLE +TK+YGC DIILSEFTYQLCSD I VR+LDK+RVKKG +A
 Sbjct: 720 QKRMDYTVIGDGVNLSRLEAITKQYGC DIILSEFTYQLCSDYILVRELDKVRVKGKQKA 779

Query: 181 VNIYE 185
 V+IYE
 Sbjct: 780 VSIYE 784

>gi|1754640|dbj|BAA13999.1|(D89624) adenylate cyclase [Anabaena sp.]
 Length = 860 Score = 221 bits (562),
 Expect = 5e-57 Identities = 107/185 (57%), Positives = 138/185 (73%), Gaps =
 1/185 (0%)

Query: 1 GERKEVTVLFS DIRGYTTLTENLGAAEVVSLLNQYFETMVEAVFNIEGTLTKFIGDALMA 60
 G+RKEV++LFS DIRGYTTLTENL A EVVS+LN+YFE+MVEAVF ++GTLTK+IGDA+MA
 Sbjct: 595 GDRKEVSILFS DIRGYTTLTENLEAEVVSMLNEYFESMVEAVFKHKGTLDKYIGDAIMA 654

Query: 61 VFGAPLPLTENHAWQAVQSALDMRQRLKEFXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 120
 VFG+PLPL E HAW AV++++MR RL+EF
 Sbjct: 655 VFGSPLPL-EEHAWMAVKTSIEMRHRLQEFNQKRYAANKPRINIGIGINS DTVISGNIGS 713

Query: 121 HKRMDYTVIGDGVNLSRLETVTKEYGCDIILSEFTYQLCSDRIWVRQLDKIRVKGKHQA 180
 KRM++T IG DGVNLSRLE+V+K+YGC DIILS+ T++ C + IW R+LD IRVKG+++
 Sbjct: 714 SKRMEFTAIGDGVNLSRLESVSKQYGC DIILSDNTFKPCQENIWARELDFIRVKGRNEP 773

Query: 181 VNIYE 185
 V+IYE
 Sbjct: 774 VSIYE 778

7.1.5 TPRL

7.1.5.1 Hits 1-2

Sequences producing significant alignments	Score (bits)	<i>E Value</i>	Spezies
gi 23125697 gb ZP_00107619.1 (NZ_AABC01000134) hypothetical protein	57	6e-08	Nostoc punctiforme
gi 23039680 gb ZP_00071232.1 (NZ_AAAU01000003) hypothetical protein	31	4,0	Trichodesmium erythraeum IMS101

7.1.5.2 Einzelalignments der Hits 1-2

>gi|23125697|gb|ZP_00107619.1|hypothetical protein [Nostoc punctiforme]
 Length = 858 Score = 57.0 bits (136),

Expect = 6e-08 Identities = 23/34 (67%), Positives = 29/34 (85%)

Query: 1 QEFLFHYHNGRTAYLVRDFTQAIACFNSAKHIRP 34
QEFL+HYH GR AYL R+F+ AIACF +AK+I+P
Sbjct: 792 QEFLYHYHTGRAAYLSRNFSLAIAACFKAAKYIQP 825

>gi|23039680|gb|ZP_00071232.1|hypothetical protein [Trichodesmium erythraeum
IMS101] Length = 864 Score = 31.2 bits (69),
Expect = 4.0 Identities = 14/34 (41%), Positives = 21/34 (61%)

Query: 1 QEFLFHYHNGRTAYLVRDFTQAIACFNSAKHIRP 34
++FL Y R AY+ + F+QA+ F A+ IRP
Sbjct: 798 EKFLELYIKARQAYMKKKFSQALMYFELAQKIRP 831

8 Literatur

- Adams, D.G. (2000) Heterocyst formation in cyanobacteria. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 618-624.
- Alexandre, S., Paindavoine, P., Tebabi, P., Pays, A., Halleux, S., Steinert, M. and Pays, E. (1990) Differential expression of a family of putative adenylate/guanylate cyclase genes in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **43**, 279-288.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- Anantharaman, V., Koonin, E.V. and Aravind, L. (2001) Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *J Mol Biol*, **307**, 1271-1292.
- Aravind, L. and Ponting, C.P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci*, **22**, 458-459.
- Baca, M., Borgstahl, G.E., Boissinot, M., Burke, P.M., Williams, D.R., Slater, K.A. and Getzoff, E.D. (1994) Complete chemical structure of photoactive yellow protein: novel thioester-linked 4-hydroxycinnamyl chromophore and photocycle chemistry. *Biochemistry*, **33**, 14369-14377.
- Ballard, S.A., Gingell, C.J., Tang, K., Turner, L.A., Price, M.E. and Naylor, A.M. (1998) Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J Urol*, **159**, 2164-2171.
- Barnes, P.J. (1995) Molecular mechanisms of antiasthma therapy. *Ann Med*, **27**, 531-535.
- Barnette, M.S. (1999) Phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Prog Drug Res*, **53**, 193-229.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.L., Marshall, M. and Sonnhammer, E.L. (2002) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, **30**, 276-280.
- Beuve, A. (1999) Conversion of a guanylyl cyclase to an adenylyl cyclase. *Methods*, **19**, 545-550.
- Bielekova, B., Lincoln, A., McFarland, H. and Martin, R. (2000) Therapeutic potential of phosphodiesterase-4 and -3 inhibitors in Th1- mediated autoimmune diseases. *J Immunol*, **164**, 1117-1124.
- Boekhoff, I., Michel, W.C., Breer, H. and Ache, B.W. (1994) Single odors differentially stimulate dual second messenger pathways in lobster olfactory receptor cells. *J Neurosci*, **14**, 3304-3309.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Casperson, G.F., Walker, N. and Bourne, H.R. (1985) Isolation of the gene encoding adenylate cyclase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 5060-5063.
- Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R. and Buck, J. (2000) Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*, **289**, 625-628.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 2110-2114.
- Cotta, M.A., Whitehead, T.R. and Wheeler, M.B. (1998) Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, *Prevotella ruminicola* D31d. *FEMS Microbiol Lett*, **164**, 257-260.

- Coudart-Cavalli, M.P., Sismeiro, O. and Danchin, A. (1997) Bifunctional structure of two adenylyl cyclases from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Biochimie*, **79**, 757-767.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. and Bos, J.L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, **396**, 474-477.
- Dessauer, C.W. and Gilman, A.G. (1996) Purification and characterization of a soluble form of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, **271**, 16967-16974.
- Dessauer, C.W. and Gilman, A.G. (1997) The catalytic mechanism of mammalian adenylyl cyclase. Equilibrium binding and kinetic analysis of P-site inhibition. *J Biol Chem*, **272**, 27787-27795.
- Drum, C.L., Yan, S.Z., Bard, J., Shen, Y.Q., Lu, D., Soelaiman, S., Grabarek, Z., Bohm, A. and Tang, W.J. (2002) Structural basis for the activation of anthrax adenylyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature*, **415**, 396-402.
- Ducruix, A.a.G., R. (1999) *Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins*. Oxford University Press, Oxford.
- Dugan, L.L., Kim, J.S., Zhang, Y., Bart, R.D., Sun, Y., Holtzman, D.M. and Gutmann, D.H. (1999) Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. *J Biol Chem*, **274**, 25842-25848.
- Escuyer, V., Duflot, E., Sezer, O., Danchin, A. and Mock, M. (1988) Structural homology between virulence-associated bacterial adenylate cyclases. *Gene*, **71**, 293-298.
- Fawcett, L., Baxendale, R., Stacey, P., McGrouther, C., Harrow, I., Soderling, S., Hetman, J., Beavo, J.A. and Phillips, S.C. (2000) Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3702-3707.
- Fischer, H.M. (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev*, **58**, 352-386.
- Fischer, H.M. (1996) Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes. *Trends Microbiol*, **4**, 317-320.
- Foster, D.C., Wedel, B.J., Robinson, S.W. and Garbers, D.L. (1999) Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **135**, 1-39.
- Francis, S.H., Turko, I.V. and Corbin, J.D. (2001) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **65**, 1-52.
- Gal, A., Orth, U., Baehr, W., Schwinger, E. and Rosenberg, T. (1994) Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta- subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nat Genet*, **7**, 64-68.
- Gierlich, D.G. (1985) Charakterisierung einer Adenylatcyclase aus *Paramecium tetraurelia*. *Institut für Pharmazeutische Chemie*. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Gilles-Gonzalez, M.A., Ditta, G.S. and Helinski, D.R. (1991) A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature*, **350**, 170-172.
- Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A. and Danchin, A. (1988) The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **2**, 19-30.
- Goldstein, I.M., Ostwald, P. and Roth, S. (1996) Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res*, **36**, 2979-2994.
- Good, N.E. and Izawa, S. (1972) Hydrogen ion buffers. *Methods Enzymol*, **24**, 53-68.
- Granovsky, A.E., Natochin, M., McEntaffer, R.L., Haik, T.L., Francis, S.H., Corbin, J.D. and Artemyev, N.O. (1998) Probing domain functions of chimeric PDE6alpha/PDE5 cGMP-phosphodiesterase. *J Biol Chem*, **273**, 24485-24490.

- Guo, Y.L., Seebacher, T., Kurz, U., Linder, J.U. and Schultz, J.E. (2001) Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases. *Embo J*, **20**, 3667-3675.
- Hambach, K. (2002) Klonierung einer Adenylatcyclase aus *Paramecium tetraurelia*. *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. Eberhard-Karls -Universität, Tübingen, p. 211.
- Hanoune, J., Pouille, Y., Tzavara, E., Shen, T., Lipskaya, L., Miyamoto, N., Suzuki, Y. and Defer, N. (1997) Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Mol Cell Endocrinol*, **128**, 179-194.
- Hempel, A., Noll, T., Muhs, A. and Piper, H.M. (1996) Functional antagonism between cAMP and cGMP on permeability of coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol*, **270**, H1264-1271.
- Hill, S., Austin, S., Eydmann, T., Jones, T. and Dixon, R. (1996) *Azotobacter vinelandii* NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2143-2148.
- Ho, Y.S., Burden, L.M. and Hurley, J.H. (2000) Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *Embo J*, **19**, 5288-5299.
- Hood, E.E., Armour, S., Ownby, J.D., Handa, A.K. and Bressan, R.A. (1979) Effect of nitrogen starvation on the level of adenosine 3',5'- monophosphate in *Anabaena variabilis*. *Biochim Biophys Acta*, **588**, 193-200.
- Hopper, S., Babst, M., Schlenso, V., Fischer, H.M., Hennecke, H. and Böck, A. (1994) Regulated expression in vitro of genes coding for formate hydrogenlyase components of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **269**, 19597-19604.
- Hopper, S. and Böck, A. (1995) Effector-mediated stimulation of ATPase activity by the sigma 54-dependent transcriptional activator FHLA from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **177**, 2798-2803.
- Huang, Z.J., Edery, I. and Rosbash, M. (1993) PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature*, **364**, 259-262.
- Hurley, J.H. (1999) Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, **274**, 7599-7602.
- Johnson, R.A. and Shoshani, I. (1990) Kinetics of "P"-site-mediated inhibition of adenylyl cyclase and the requirements for substrate. *J Biol Chem*, **265**, 11595-11600.
- Johnson, R.A. and Shoshani, I. (1994) Preparation and use of "P"-site-targeted affinity ligands for adenylyl cyclases. *Methods Enzymol*, **238**, 56-71.
- Kasahara, M. and Ohmori, M. (1999) Activation of a cyanobacterial adenylate cyclase, CyaC, by autophosphorylation and a subsequent phosphotransfer reaction. *J Biol Chem*, **274**, 15167-15172.
- Kasahara, M., Unno, T., Yashiro, K. and Ohmori, M. (2000) A novel cyanobacterial adenylyl cyclase, CyaG: a possible ancestor of mammalian guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.*, **27**, 27.
- Kasahara, M., Unno, T., Yashiro, K. and Ohmori, M. (2001) CyaG, a novel cyanobacterial adenylyl cyclase and a possible ancestor of mammalian guanylyl cyclases. *J Biol Chem*, **276**, 10564-10569.
- Katayama, M. and Ohmori, M. (1997) Isolation and characterization of multiple adenylate cyclase genes from the cyanobacterium *Anabaena sp. strain PCC 7120*. *J Bacteriol*, **179**, 3588-3593.
- Kiely, P.D., Gillespie, K.M. and Oliveira, D.B. (1995) Oxpentifylline inhibits tumor necrosis factor-alpha mRNA transcription and protects against arthritis in mercuric chloride-treated brown Norway rats. *Eur J Immunol*, **25**, 2899-2906.
- Korsa, I. and Böck, A. (1997) Characterization of fhlA mutations resulting in ligand-independent transcriptional activation and ATP hydrolysis. *J Bacteriol*, **179**, 41-45.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lalley, P.M., Pierrefiche, O., Bischoff, A.M. and Richter, D.W. (1997) cAMP-dependent protein kinase modulates expiratory neurons in vivo. *J Neurophysiol*, **77**, 1119-1131.
- Lamb, J.R., Tugendreich, S. and Hieter, P. (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci*, **20**, 257-259.
- Lambert, G.R. and Smith, G.D. (1981) Hydrogen uptake by the nitrogen-starved cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Arch Biochem Biophys*, **211**, 360-367.
- Langtry, H.D. and Markham, A. (1999) Sildenafil: a review of its use in erectile dysfunction. *Drugs*, **57**, 967-989.
- Letunic, I., Goodstadt, L., Dickens, N.J., Doerks, T., Schultz, J., Mott, R., Ciccarelli, F., Copley, R.R., Ponting, C.P. and Bork, P. (2002) Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Res*, **30**, 242-244.
- Levin, L.R., Han, P.L., Hwang, P.M., Feinstein, P.G., Davis, R.L. and Reed, R.R. (1992) The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell*, **68**, 479-489.
- Linder, J.U., Engel, P., Reimer, A., Krüger, T., Plattner, H., Schultz, A. and Schultz, J.E. (1999) Guanylyl cyclases with the topology of mammalian adenylyl cyclases and an N-terminal P-type ATPase-like domain in *Paramecium*, *Tetrahymena* and *Plasmodium*. *EMBO J.*, **18**, 4222-4232.
- Linder, J.U., Hoffmann, T., Kurz, U. and Schultz, J.E. (2000) A guanylyl cyclase from *Paramecium* with 22 transmembrane spans. Expression of the catalytic domains and formation of chimeras with the catalytic domains of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem*, **275**, 11235-11240.
- Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D. and Kaupp, U.B. (1990) Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett*, **270**, 24-29.
- Marko, D., Romanakis, K., Zankl, H., Furstenberger, G., Steinbauer, B. and Eisenbrand, G. (1998) Induction of apoptosis by an inhibitor of cAMP-specific PDE in malignant murine carcinoma cells overexpressing PDE activity in comparison to their nonmalignant counterparts. *Cell Biochem Biophys*, **28**, 75-101.
- Martinez, S.E., Wu, A.Y., Glavas, N.A., Tang, X.B., Turley, S., Hol, W.G. and Beavo, J.A. (2002) The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13260-13265.
- McAllister-Lucas, L.M., Haik, T.L., Colbran, J.L., Sonnenburg, W.K., Seger, D., Turko, I.V., Beavo, J.A., Francis, S.H. and Corbin, J.D. (1995) An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem*, **270**, 30671-30679.
- McAllister-Lucas, L.M., Sonnenburg, W.K., Kadlecsek, A., Seger, D., Trong, H.L., Colbran, J.L., Thomas, M.K., Walsh, K.A., Francis, S.H., Corbin, J.D. and et al. (1993) The structure of a bovine lung cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. *J Biol Chem*, **268**, 22863-22873.
- McCue, L.A., McDonough, K.A. and Lawrence, C.E. (2000) Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.*, **10**, 204-219.
- Mitterauer, T., Hohenegger, M., Tang, W.J., Nanoff, C. and Freissmuth, M. (1998) The C2 catalytic domain of adenylyl cyclase contains the second metal ion (Mn²⁺) binding site. *Biochemistry*, **37**, 16183-16191.
- Muradov, K.G., Granovsky, A.E., Schey, K.L. and Artemyev, N.O. (2002) Direct interaction of the inhibitory gamma-subunit of Rod cGMP phosphodiesterase (PDE6) with the PDE6 GAFa domains. *Biochemistry*, **41**, 3884-3890.

- Naula, C., Schaub, R., Leech, V., Melville, S. and Seebeck, T. (2001) Spontaneous dimerization and leucine-zipper induced activation of the recombinant catalytic domain of a new adenylyl cyclase of *Trypanosoma brucei*, GRESAG4.4B. *Mol Biochem Parasitol*, **112**, 19-28.
- Ohmori, M. (1989) cAMP in *Anabaena cylindrica*: rapid changes in cellular levels in response to extracellular environments. *Plant Cell Physiol.*, **30**, 911-914.
- Ohmori M., K.O., K. Hasunuma. (1988) Rapid change in cyclic 3'5'-AMP concentration triggered by light-off or light-on signal in *anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.*, **150**, 203-204.
- Ohno, S. (1997) The reason for as well as the consequence of the Cambrian explosion in animal evolution. *J Mol Evol*, **44**, S23-27.
- Pellequer, J.L., Wager-Smith, K.A., Kay, S.A. and Getzoff, E.D. (1998) Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5884-5890.
- Peterkofsky, A., Reizer, A., Reizer, J., Gollop, N., Zhu, P.P. and Amin, N. (1993) Bacterial adenylyl cyclases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **44**, 31-65.
- Peterkofsky, A., Seok, Y.J., Amin, N., Thapar, R., Lee, S.Y., Klevit, R.E., Waygood, E.B., Anderson, J.W., Gruschus, J., Huq, H. and et al. (1995) The *Escherichia coli* adenylyl cyclase complex: requirement of PTS proteins for stimulation by nucleotides. *Biochemistry*, **34**, 8950-8959.
- Pfeuffer, T. and Thomas, R. (1974) Proceedings: Stimulation of adenylate cyclase from avian erythrocyte membranes by GTP analogs. Separation and partial purification of a GTP-binding protein. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **355**, 1237-1238.
- Pongratz, I., Antonsson, C., Whitelaw, M.L. and Poellinger, L. (1998) Role of the PAS domain in regulation of dimerization and DNA binding specificity of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol*, **18**, 4079-4088.
- Pugh, E.N., Jr., Duda, T., Sitaramayya, A. and Sharma, R.K. (1997) Photoreceptor guanylate cyclases: a review. *Biosci Rep*, **17**, 429-473.
- Rall, T.S., Sutherland, E. W. and Berthet, J. (1957) The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase IV. *J. Biol. Chem.*, **224**, 463-475.
- Roy, A., Haziza, C. and Danchin, A. (1983) Regulation of adenylate cyclase synthesis in *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the control region. *Embo J*, **2**, 791-797.
- Rybalkin, S.D., Rybalkina, I.G., Shimizu-Albergine, M., Tang, X.B. and Beavo, J.A. (2003) PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *Embo J*, **22**, 469-78.
- Salomon, Y., Londos, C. and Rodbell, M. (1974) A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.*, **58**, 541-548.
- Sambrook J., F.E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaffer, A.A., Aravind, L., Madden, T.L., Sharivin, S., Spouge, J.L., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. and Altschul, S.F. (2001) Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2994-3005.
- Schulkes, C. and Schaap, P. (1995) cAMP-dependent protein kinase activity is essential for preaggregative gene expression in *Dictyostelium*. *FEBS Lett*, **368**, 381-384.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. and Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5857-5864.
- Segel, I.H. (1975) *Enzyme kinetics*. Wiley-Interscience Publication.
- Sismeiro, O., Trotot, P., Biville, F., Vivares, C. and Danchin, A. (1998) *Aeromonas hydrophila* adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and

- sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria. *J Bacteriol*, **180**, 3339-3344.
- Smit, M.J. and Iyengar, R. (1998) Mammalian adenylyl cyclases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **32**, 1-21.
- Soderling, S.H., Bayuga, S.J. and Beavo, J.A. (1999) Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7071-7076.
- Soderling, S.H. and Beavo, J.A. (2000) Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 174-179.
- Sonnenburg, W.K., Mullaney, P.J. and Beavo, J.A. (1991) Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. Identification and distribution of isozyme variants. *J Biol Chem*, **266**, 17655-17661.
- Sunahara, R.K., Beuve, A., Tesmer, J.J., Sprang, S.R., Garbers, D.L. and Gilman, A.G. (1998) Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J Biol Chem*, **273**, 16332-16338.
- Sunahara, R.K., Dessauer, C.W. and Gilman, A.G. (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 461-480.
- Tada, T., Sekimoto, H., Ohmori, M. (2001) Biochemical Characterization of an Adenylate Cyclase, CyaB1 in the Cyanobacterium *Anabaena sp. Strain PCC7120*. *Journal of Plant Research*, **114**, 387-394.
- Takai, K., Kurashina, Y., Suzuki-Hori, C., Okamoto, H. and Hayaishi, O. (1974) Adenylate cyclase from *Brevibacterium liquefaciens*. I. Purification, crystallization, and some properties. *J Biol Chem*, **249**, 1965-1972.
- Tang, W.J. and Gilman, A.G. (1995) Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs α and forskolin. *Science*, **268**, 1769-1772.
- Tang, W.J., Stanzel, M. and Gilman, A.G. (1995) Truncation and alanine-scanning mutants of type I adenylyl cyclase. *Biochemistry*, **34**, 14563-14572.
- Taylor, B.L. and Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 479-506.
- Tellez-Sosa, J., Soberon, N., Vega-Segura, A., Torres-Marquez, M.E. and Cevallos, M.A. (2002) The *Rhizobium etli cyaC* product: characterization of a novel adenylate cyclase class. *J Bacteriol*, **184**, 3560-3568.
- Tesmer, J.J., Dessauer, C.W., Sunahara, R.K., Murray, L.D., Johnson, R.A., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (2000) Molecular basis for P-site inhibition of adenylyl cyclase. *Biochemistry*, **39**, 14464-14471.
- Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gs α -GTP γ S. *Science*, **278**, 1907-1916.
- Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Johnson, R.A., Gosselin, G., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1999) Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science*, **285**, 756-760.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tucker, C.L., Hurley, J.H., Miller, T.R. and Hurley, J.B. (1998) Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5993-5997.
- Turko, I.V., Francis, S.H. and Corbin, J.D. (1998) Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. *Biochem J*, **329 (Pt 3)**, 505-510.
- Turko, I.V., Haik, T.L., McAllister-Lucas, L.M., Burns, F., Francis, S.H. and Corbin, J.D. (1996) Identification of key amino acids in a conserved cGMP-binding site of cGMP-binding

- phosphodiesterases. A putative NKXnD motif for cGMP binding. *J Biol Chem*, **271**, 22240-22244.
- Whisnant, R.E., Gilman, A.G. and Dessauer, C.W. (1996) Interaction of the two cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 6621-6625.
- Wolk, C.P. (1996) Heterocyst formation. *Annu Rev Genet*, **30**, 59-78.
- Yan, S.Z., Hahn, D., Huang, Z.H. and Tang, W.J. (1996) Two cytoplasmic domains of mammalian adenylyl cyclase form a Gs α - and forskolin-activated enzyme in vitro. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10941-10945.
- Yan, S.Z., Huang, Z.H., Andrews, R.K. and Tang, W.J. (1998) Conversion of forskolin-insensitive to forskolin-sensitive (mouse-type IX) adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol*, **53**, 182-187.
- Yan, S.Z., Huang, Z.H., Shaw, R.S. and Tang, W.J. (1997) The conserved asparagine and arginine are essential for catalysis of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12342-12349.
- Yoshimura, H., Yanagisawa, S., Kanehisa, M. and Ohmori, M. (2002) Screening for the target gene of cyanobacterial cAMP receptor protein SYCRP1. *Mol Microbiol*, **43**, 843-853.
- Zhang, G., Liu, Y., Ruoho, A.E. and Hurley, J.H. (1997) Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature*, **386**, 247-253.
- Zoraghi, R. and Seebeck, T. (2002) The cAMP-specific phosphodiesterase TbpDE2C is an essential enzyme in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4343-4348.

Meine akademischen Lehrer neben Herrn Prof. Dr. J. E. Schultz waren die Damen und Herren:

Dilg, P.	Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie, Marburg
Culmsee, C.	Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Fahr, A.	Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie, Marburg
Feuser, B.	Fachbereich Physik, Marburg
Gillman, Th.	Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie, Marburg
Häberlein, H.	Institut für Pharmazeutische Biologie, Marburg
Hahnefeld, W.	Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie, Marburg
Imming, P.	Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie, Marburg
Kissel, T.	Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie, Marburg
Klumpp, S.	Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie, Marburg
Kriegelstein, J.	Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Kuschinsky, K.	Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Matern, U.	Institut für Pharmazeutische Biologie, Marburg
Matusch, R.	Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie, Marburg
Radsack, K	Medizinisches Zentrum für Hygiene und Mikrobiologie, Marburg
Seitz, G.	Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie, Marburg

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tobias Kanacher
Geburtstag: 05.04.1973
Geburtsort: Winterberg (NRW)

Ausbildung

1979-1983 Grundschule Medebach
1983-1987 Progymnasium Medebach
1987-1992 Städt. Gymnasium Winterberg
16. Juni 1992 Abitur
September 1992 Zivildienst in der Familienferienstätte der Caritas e.V. Bottrop in
bis Dezember 1993 Küstelberg
April 1994 Pharmaziestudium an der Philips-Universität Marburg
bis Februar 1997
21. März 1996 I. Staatsexamen Pharmazie
7. April 1998 II. Staatsexamen Pharmazie
ab Mai 1998 Pharmaziepraktikum in der Fortuna Apotheke, Köln
ab November 1998 Pharmaziepraktikum bei der Bayer AG, Leverkusen
18. Mai 1999 III. Staatsexamen Pharmazie
20. Mai 1999 Approbation als Apotheker
ab 1. August 1999 Wissenschaftlicher Angestellter mit Gelegenheit zur Promotion an der
Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen. Der
experimentelle Teil dieser Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2000 bis
Juli 2002 unter der Anleitung von Prof. Dr. J. E. Schultz durchgeführt.