

**Klonierung und Charakterisierung von fünf
Adenylatcyclasen aus *Stigmatella aurantiaca*
und *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertation

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2004

vorgelegt von
Arne Hammer

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Februar 2004

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Heide

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde zwischen Mai 1999 und Juli 2003 am pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. J.E. Schultz erstellt.

Prof. Dr. Joachim E. Schultz danke ich für die Überlassung der Themen, die erstklassigen Arbeitsbedingungen in seinem Labor und die vielseitige Unterstützung, die er mir zukommen ließ.

Prof. Dr. Lutz Heide danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. G. Drews und Prof. Dr. M.A. Wahl danke ich für die Übernahme der Nebenfachprüfungen.

Anita Schultz danke ich für die vielen Klonierungsratschläge, die mir so manches mal halfen.

Herzlich danken möchte ich unseren technischen Assistentinnen I. Mayer, G. Kleefeld-Honer und besonders U. Kurz, ohne deren ständige Bemühungen ein Funktionieren des Labors nicht möglich wäre.

Ich danke meinen Kollegen für die gute Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, die mir in allen Lebenslagen zur Seite standen und mir alles ermöglichten.

1	Einleitung	1
1.1	Klasse III Adenylatcyclasen	2
1.2	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	3
1.3	<i>Mycobakterium tuberculosis</i>	5
2	Material	9
2.1	Enzyme, Kits und Chemikalien	9
2.2	Geräte und Materialien	10
2.3	Verwendete Plasmide	13
2.4	Primer (Oligonucleotide)	14
2.4.1	<i>Stigmatella aurantiaca</i> :	14
2.4.2	<i>Mycobakterium tuberculosis</i> :	15
2.5	Puffer und Lösungen	17
2.5.1	... für molekularbiologische Methoden	17
2.5.1.1	Lösungen zum Auftrennen, Reinigen und Lagern von DNA	17
2.5.1.2	Lösungen zur Modifikation und Transfektion von DNA	18
2.5.2	... für proteinchemische Methoden	18
2.5.2.1	für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	18
2.5.2.2	Westernblotting	19
2.5.2.3	Puffer für die Ni ²⁺ -NTA Reinigung	19
2.5.2.4	Puffer für die Kristallisierung:	19
2.5.2.5	Puffer für die Antikörperproduktion und –reinigung	20
2.5.3	Lösungen für den Adenylat- und Guanylat-Assay	20
2.5.4	Medien für <i>E. coli</i>	20
3	Methoden	21
3.1	Gentechnologische Methoden	21
3.1.1	Minipräparation (Miniprep)	21
3.1.2	Auftrennung von DNA über Agarosegele	21
3.1.3	Konzentration von DNA und Reinigung aus Agarosegelen	21
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	21
3.1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
3.1.6	Restriktionsverdau von DNA	22
3.1.7	Glätten (blunten) von überhängenden DNA-Enden	22
3.1.8	5'-DNA Phosphorylierung von PCR Produkten	23
3.1.9	5'-DNA Dephosphorylierung von Vektoren	23
3.1.10	Ligation von DNA	23
3.1.11	Sequenzierung von DNA	24
3.2	Mikrobiologische Methoden	25
3.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> – Zellen	25
3.2.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> – Zellen	25
3.2.3	Herstellung von Dauerkulturen	26
3.2.4	Blau-Weiß-Screen	26
3.3	Proteinchemische Methoden	26
3.3.1	Proteinexpression	26
3.3.2	Zellhomogenat	27
3.3.3	Proteinreinigung	27
3.3.4	Membranpräparation (mit Solubilisierung)	27
3.3.5	BioRad (Bradford) Mikro – Proteinbestimmung	28
3.3.6	MicroBC – Assay	28
3.3.7	Antikörperproduktion gegen Rv3645	28
3.3.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
3.3.9	Western-Blot	30

3.3.10	Kristallisierung.....	31
3.4	Adenylatcyclase Enzymtest (AC-Assay)	32
3.5	computergestützte Untersuchungen.....	33
3.6	Klonierungsarbeiten	34
3.6.1	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	34
3.6.1.1	Holoenzyme	35
3.6.1.2	Verkürzungen.....	36
3.6.1.3	weitere Konstrukte	37
3.6.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	40
3.6.2.1	Holoenzyme	40
3.6.2.2	Holoenzymmutationen	44
3.6.2.3	katalytische Zentren.....	49
3.6.2.4	katalytische Zentren mit HAMP Domäne	50
4	Ergebnisse	51
4.1	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	51
4.1.1	<i>cyaB</i> Holoenzym	51
4.1.2	<i>cyaB</i> Verkürzungen.....	54
4.1.3	<i>cyaB8</i> Charakterisierung.....	55
4.1.3.1	Kinetik	55
4.1.3.2	Temperaturoptimum.....	57
4.1.3.3	pH-Optimum.....	58
4.1.3.4	Cofaktoren	58
4.1.3.5	Proteinabhängigkeit	59
4.1.3.6	Zeitabhängigkeit.....	60
4.1.3.7	Stabilität	60
4.1.3.8	Substratspezifität	61
4.1.4	Andere Konstrukte von <i>cyaB8</i>	62
4.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	65
4.2.1	Holoenzyme	66
4.2.2	Rv3645 Mutationen	73
4.2.3	Verbundene Holoenzyme.....	74
4.2.4	Charakterisierung von Rv1319cat	77
4.2.4.1	Aktivitätsüberblick aller vier katalytischen Zentren.....	77
4.2.4.2	Proteinabhängigkeit	79
4.2.4.3	pH Optimum.....	80
4.2.4.4	Kinetik	80
4.2.4.5	Temperaturoptimum.....	82
4.2.4.6	Zeitabhängigkeit.....	82
4.2.4.7	Stabilität	83
4.2.4.8	Cofaktoren	83
4.2.4.9	Substratspezifität	84
4.2.5	Einfluß der HAMP-Domänen.....	84
4.2.5.1	Wildtyp HAMP-Domäne	86
4.2.5.2	Austausch der HAMP-Domänen	92
4.2.5.3	Mutationen der HAMP Domäne	95
4.2.6	Kristallisierung.....	101
5	Diskussion	102
5.1	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	102
5.1.1	Holoenzyme	102
5.1.2	Verkürzungen.....	103
5.1.3	Charakterisierung von <i>cyaB8</i>	103

5.1.4	andere Konstrukte	104
5.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	105
5.2.1	Holoenzyme	105
5.2.2	Charakterisierung des katalytischen Zentrums von Rv1319c	106
5.2.3	Besonderheit von Rv1319ckat	107
5.2.4	Einfluß der HAMP-Domäne	111
5.2.5	Mechanismen der HAMP Wechselwirkungen?	113
5.2.6	Modellvorschläge für die mycobakteriellen ACn	120
6	Zusammenfassung	121
7	Anhang	122
7.1	Berechnung der Aktivität	122
7.2	Berechnungen der kinetischen Parameter K_M und v_{max}	122
7.2.1	... nach Hanes-Woolfe:	122
7.2.2	... für allosterische Proteine nach Lineweaver-Burk	122
7.3	Berechnung der Standardabweichungen	123
7.4	Katalytische Effizienz	123
7.5	Accession Numbers	124
7.5.1	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	124
7.5.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	124
7.6	Internetadressen	124
8	Literaturverzeichnis	125



Abkürzungsverzeichnis

AA(n)	Aminosäure(n) (engl.: <u>a</u> mino <u>a</u> cid)
AC(n)	<u>A</u> denylat <u>c</u> yclase(n)
AccNum	<u>A</u> ccession <u>N</u> ummer; Zugangs-/ Identitätsnummer mit der eine Gen-/ Proteinsequenz in einer virtuellen Datenbank eindeutig zugeordnet werden kann (Datenbanken u.a.: SWISSPROT ¹ , GENE BANK ²)
amp	<u>A</u> mpicillin
A _x	<u>A</u> bsorbtion bei der Wellenlänge x nm
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
BSA	(<u>b</u> ovines) Rinderserumalbumin
CHAPS	3-[(3- <u>C</u> holamidopropyl) dimethylammonio]-1-propan <u>s</u> ulfonsäure
cyaB	Adenylatcyclase „AC2“ von <i>Stigmatella aurantiaca</i> (<u>A</u> ccNum.: Protein: SWISSPROT: P40138; DNA Sequenz: AJ223795)
EMBL	<u>E</u> uropean <u>M</u> olecular <u>B</u> iology <u>L</u> aboratory (in Heidelberg)
ExPASy	<u>E</u> xpert <u>P</u> rotein <u>A</u> nalysis <u>S</u> ystem
IPTG	<u>I</u> sopropylthiogalactosid
kan	<u>K</u> anamycin
MCS	<u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite
MP	<u>M</u> embranpräparation
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation (USA)
NIH	<u>N</u> ational <u>I</u> nstitutes of <u>H</u> ealth (USA)
NLM	<u>N</u> ational <u>L</u> ibrary of <u>M</u> edicine (USA)
paraAC	<u>A</u> denylatcyclase aus <u>P</u> aramecium
SD	Standardabweichung (<u>S</u> tandard <u>D</u> eviation)
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat (ein Detergenz)
SDS-PAGE	<u>S</u> DS- <u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<u>S</u> tandard <u>E</u> rror of the <u>M</u> ean)
SMART	<u>S</u> imple <u>M</u> odular <u>A</u> rchitecture <u>R</u> esearch <u>T</u> ool, ein vom EMBL bereitgestelltes online Bioinformatik Programm
TM(e)	<u>T</u> ransmembrandurchgang (-gänge)
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indoyl-β-D- <u>G</u> alactopyranosid
wt	<u>W</u> ild <u>t</u> yp (auch als Vorsilbe)



1 Einleitung

Von den Einzellern über komplexe Zellverbände bis zu den hochentwickelten Tieren waren die Bakterienzellen die ersten, die mit ihrer Umwelt und untereinander kommunizierten. Schon die Aufnahme von Nährstoffen und Mineralien und die Abgabe von Stoffwechselendprodukten, zu denen nach der Entwicklung der Photosynthese auch der Sauerstoff gehörte, stellte die erste Kommunikation dar. Die Bakterien entwickelten dafür Rezeptoren, Kanäle und Effektoren, um die Informationen bewerten und darauf reagieren zu können. Evolutionär früh folgte dann eine Kommunikation und Kooperation der Bakterien, dem ein interzellulärer Informationsaustausch zugrunde lag, wie z.B. beim Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca*, das gemeinschaftlich andere Bakterien jagt und so das Überleben aller sichert. *Mycobakterium tuberculosis* dringt hingegen in einen hochentwickelten Wirt ein, umgeht dessen Abwehr, und beeinflusst zum eigenen Überleben den Zellstoffwechsel. Dazu müssen u.a. externe Signale durch die Zellmembran geleitet und in intrazelluläre Signale (second messenger) umgewandelt werden.

Ein solches Enzym dieser Signalkette stellt die Adenylatcyclase (AC) dar. Sie wandelt auf ein Signal hin ATP in den second messenger cyclisches-3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) um. Zur Informationsbewertung enthält sie regulatorische Domänen, die die Enzymaktivität steuern. Dabei ist die AC nicht nur regional, sondern gegebenenfalls auch temporal³ verteilt.

Die Enzyme der AC können in mindestens vier verschiedene Klassen unterteilt werden⁴.

Zur Klasse I werden alle am Primärmetabolismus beteiligten ACn der Enterobacteriaceae gerechnet.

Klasse II enthält die toxischen ACn aus *Bordetella pertussis* und *Bacillus anthracis*, die teilweise direkt in der Wirtszelle aktiv werden.

Klasse III ist die vielseitigste und soll im Anschluß besprochen werden.

In Klasse IV befindet sich bis jetzt als einzige die AC aus *Aeromonas hydrophila*, die mit einem pH-Optimum von 9,5 und Temperaturoptimum von 65 °C hervorsticht⁵.

Als weitere Klassen werden in der Literatur zur Zeit noch die **Klasse V**, bestehend aus der AC aus *Prevotella ruminicola*⁶, und **Klasse VI**, in die die AC der Rhizobiaceae allein eingegliedert werden soll⁷, diskutiert.

1.1 Klasse III Adenylatcyclasen

Adenylatcyclasen der **Klasse III** überspannen die beiden Reiche der Prokaryonten (wie *Stigmatella aurantiaca* und *Mycobakterium tuberculosis*) und der Eukaryonten. Sie ist die vielseitigste aller Klassen, was sich in bemerkenswerten Unterschieden der Enzyme widerspiegelt.

In Säugetieren (Mammalia) findet man meist ACn mit Transmembranbereichen, während in Bakterien die löslichen Formen überwiegen. Geregelt werden die Mammalia-ACn dabei durch G-Proteine, die die empfangenen Signale an die Cyclase weitergeben⁸. Auch lösliche ACn wurden gefunden, die zwar gehäuft in den Testes exprimiert werden, aber in allen Geweben vertreten sind⁸⁻¹⁰.

Aufgebaut ist die membrangebundene Mammalia-AC aus zwei intrazellulären katalytischen Schleifen (C1 und C2), die zusammen die für die Katalyse wichtigen und unter allen ACn konservierten Aminosäuren (AAn) zur Verfügung stellen, und die jeweils an 6 vorangehenden Transmembrandurchgängen (TM) hängen. Damit ergibt sich ein Aufbau von 6TM-C1-6TM-C2, bei dem sich die beiden Schleifen intramolekular zum katalytischen Zentrum zusammenlagern können¹¹⁻¹⁴. Für die Katalyse benötigt die AC als Cofaktor zwei Mg^{2+} oder Mn^{2+} Ionen^{15,16}.

Bakterielle ACn haben hingegen meist nur eine katalytische Schleife, die alle katalytischen AAn enthält und die sich aus sterischen Gründen zu Homodimeren antiparallel zusammenfinden müssen. Die beiden entstehenden katalytischen Zentren können sich gegenseitig beeinflussen.

Die Klasse III wird neuerdings in vier verschiedene Unterklassen (IIIa-d) unterteilt¹⁷. Die nicht zu den Mammalia gehörenden Vertreter dieser Klasse zeigen alle eine Homodimerstruktur. Das Hauptmerkmal der Unterklasse IIIb, zu der die in dieser Arbeit untersuchten ACn zuzuordnen sind, ist ein Aminosäureaustausch in den kanonischen AAn des katalytischen Zentrums. Das substratbindende Aspartat ist hier gegen ein Threonin (Abb. 1-1), manchmal auch ein Serin, ausgetauscht. Das D bzw. T beteiligt sich an der Bindung des Purinrestes.

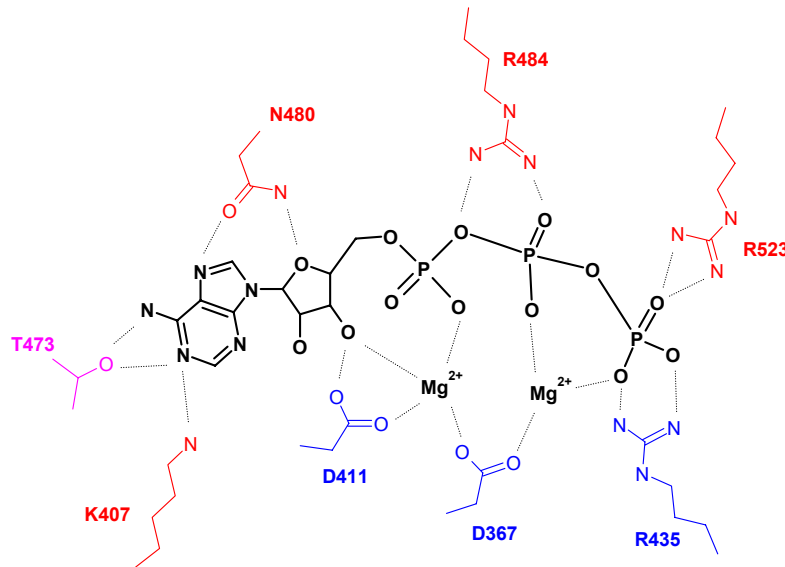


Abb. 1-1. Katalytisches Zentrum, schematisch.

Schematische Darstellung des katalytischen Zentrums von Rv3645 (angegeben nach¹⁴ und¹⁶; Numerierung für Rv3645). Die Farbkodierung zeigt die Zugehörigkeit der Aminosäurereste zu den beiden Monomeren. T473 (violett) wird im Text (s. 4.2.2) besprochen. Dünne Linien repräsentieren intermolekulare Wechselwirkungen.

1.2 *Stigmatella aurantiaca*

Zur Zeit meines Eintreffens im Labor von Prof. Schultz beschäftigte sich Dr. Kristina Hambach mit einer Adenylatcyclase aus *Paramecium*. Die Expression einer aktiven Form dieses Proteins erwies sich jedoch als unmöglich¹⁸.

Um den Grund dafür zu finden, wurden bakterielle Cyclasen mit ähnlichen katalytischen Zentren gesucht, die zum Bau von Chimären geeignet waren. Unter den in Frage kommenden Cyclasen befanden sich u.a. die beiden ACn *cyaA* und *cyaB* von *Stigmatella aurantiaca*¹⁹. Diese Cyclasen besitzen ähnliche katalytische Zentren wie die *Paramecium*-AC (Abb. 1-2), obwohl sie evolutionär zwei verschiedenen Reichen angehören (s.o.). Diese Ähnlichkeit bezog sich auch auf den D/T Austausch, der bei *Paramecium* einen D/S Austausch darstellt.

In dieser Arbeit wurde *cyaB* (mit D293T) untersucht. *cyaB* und die im Anschluß besprochenen ACn von *Mycobacterium tuberculosis* (ebenfalls mit D/T Austausch) werden in die Gruppe IIIb (s.o.) eingeordnet. Hier stellte sich die Frage, ob dieser Austausch die Aktivität beeinflusst.

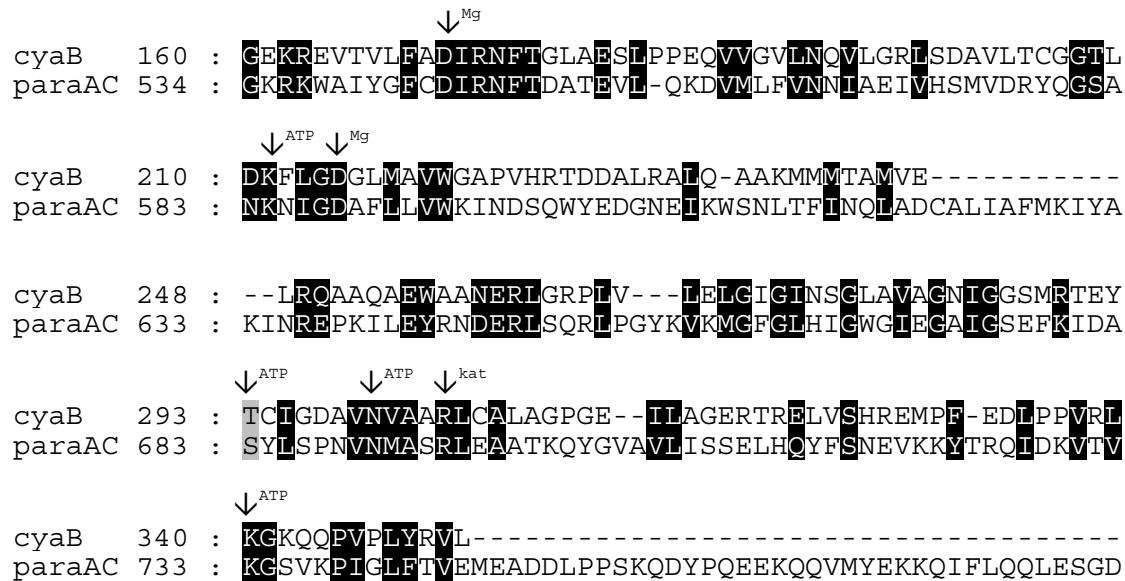


Abb. 1-2. Alignmentausschnitt zwischen cyxB und paraAC.

Ausschnitt aus dem Alignment zwischen cyxB (*Stigmatella aurantiaca*) und der AC aus Paramecium (paraAC). Invers sind die identischen und ähnlichen AAn (nach: Blossum 62). Die für die Substraterkennung und Katalyse wichtigen AAn sind markiert (kat = Katalyse). Der D/T bzw. D/S Austausch ist hellgrau unterlegt (s. Text).

cyxB besteht nach SMART nur aus zwei Domänen, einer Receiver- (AAn 6-120) und der darauffolgenden AC-Domäne (AAn 128-335). Transmembrandurchgänge wurden nicht vorhergesagt. Die Receiverdomäne könnte die enzymatische Aktivität regulieren.

Stigmatella aurantiaca ist ein ubiquitär im Boden lebendes Myxobacterium mit Sozialverhalten. Die einzelnen Zellen bewegen sich durch Gleitbewegungen aktiv im Schwarm, wozu sie einen leichten Feuchtigkeitsfilm auf einer Oberfläche benötigen. Richtungsorientiert gleiten sie auf die Beute (meist Hefen oder andere Bakterien) zu und sezernieren gemeinsam Verdauungsenzyme. Bei Nahrungsmangel bildet die Gemeinschaft bis zu 0,1 mm hohe gestielte Fruchtkörperchen, was ihre Fähigkeit zur Aufgabentrennung eindrucksvoll darstellt. Lassen die Umweltbedingungen das Wachstum wieder zu, schwärmen sie als Gruppe aus, da sie nur gemeinsam genügend Verdauungsenzyme produzieren können, um das Überleben aller zu sichern²⁰⁻²⁴.

1.3 *Mycobacterium tuberculosis*

Die Suche nach weiteren Adenylatcyclasen in Krankheitserregern führte unsere Arbeitsgruppe zum Pathogen *Mycobacterium tuberculosis*, in dessen Genom 15 ACn identifiziert wurden.

Vier von ihnen, Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c und Rv3645, zeigen den gleichen D/T Austausch, wie schon bei *cyaB* beobachtet, so daß sie zur weiteren Verfolgung dieser Mutation in dieser Arbeit ausgewählt wurden.

Die Bezeichnungen dieser ACn richtet sich nach der Lage der Gene im Gesamtgenom des Erregers. Bei Rv1318c handelt es sich also um das 1318te Gen des virulenten (v) Stammes H37Rv, das complementär (c) zum codierenden Strang abgelesen wird.

Als Startpunkt, Rv0001, der vom Sanger Zentrum durchnummerierten und prognostizierten Gene, dient „*dnaA*“, das „chromosomal replication initiator protein“²⁵⁻²⁷.

Die hier betrachteten ACn aus *M. tuberculosis* haben nach SMART Analyse alle denselben strukturellen Aufbau. N-terminal befinden sich nach einem cytosolischen Bereich von ca. 40-50 AAn 6 Transmembrandurchgänge. Daran schließen sich C-terminal die sogenannte HAMP- und dahinter die eigentliche AC-Domäne an (Abb. 1-3).

Die HAMP-Domäne hat ihren Namen nach den Anfangsbuchstaben der Proteinfamilien, in denen sie als Strukturbestandteil identifiziert wurde. Bei diesen handelt es sich um: Histidinkinasen, Adenylatcyclasen, Methyl-akzeptierende chemotaktische Proteine und Phosphatasen. Sie tritt als einzelne Domäne oder gehäuft mit bis zu fünf Repeats auf. Dabei ist sie meistens C-terminal von Transmembrandurchgängen anzutreffen. Sie besteht aus zwei amphipathischen α -Helices, die durch einen Linker verbunden sind²⁸.

Das SMART-Programm sagte für die betrachteten Enzyme nur 5 Transmembrandurchgänge und die HAMP-Domäne vorher. Grund war der unmittelbare Übergang ohne erkennbaren Linker, der die Bestimmung einer eindeutigen Grenze zwischen TM6 und der HAMP verhinderte. So wurde die 6. TM

nur als wahrscheinlich aufgrund Überlappung angegeben. Es war aber schon vorher bekannt, daß diese Cyclasen 6 Transmembrandurchgänge und einen fließenden Übergang in die HAMP-Domäne enthalten²⁹.

Eine diskutierte Funktion der HAMP-Domäne hängt unmittelbar mit diesem ungewöhnlichen Übergang zusammen. Danach soll es sich um eine Regulatordomäne handeln, die durch Anlagerung eines Effektors an die extrazelluläre Schleife eine durch den letzten Transmembrandurchgang vermittelte Konformationsänderung erfährt. Die zweite amphipathische Helix nähert sich dadurch der ersten und bewirkt eine sterische Änderung der ihr nachfolgenden katalytischen Zentren³⁰.

Eine zweite Theorie schreibt den einzeln auftretenden HAMP-Domänen die Dimerisierung zweier Proteine zu. Hierbei kann auch eine Hemmung der eigenen enzymatischen Funktion im singulären Zustand vorausgehen, durch die eine spontane Signalerzeugung ohne Effektor verhindert wird²⁹.

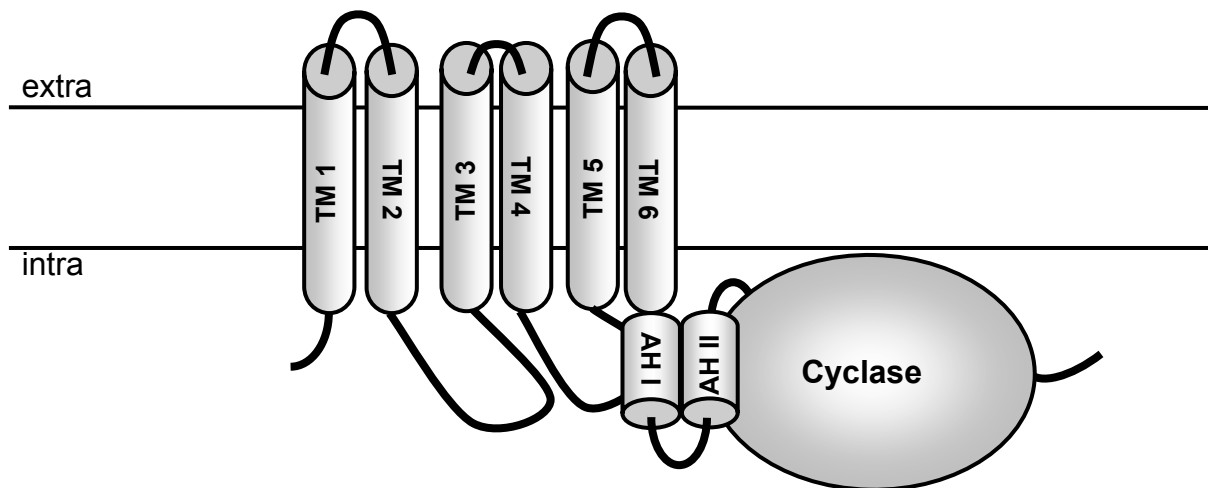


Abb. 1-3. Strukturübersicht der bearbeiteten mycobakteriellen ACn.

Gemeinsame Struktur der ACn Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c und Rv3645. Die HAMP-Domäne schließt sich übergangslos an den 6. Transmembrandurchgang an. Sie besteht aus den verbundenen amphipathischen Helices AH I + AH II.

Mycobacterium tuberculosis, der Erreger der Tuberkulose, ist ein hochinfektiöser Krankheitserreger. Er lebt parasitisch in den Phagosomen der Makrophagen, in die er durch Anlagerung an Phagocytoserezeptoren eindringt. Zu seinem Schutz hindert er die Vakuolen, in denen er überdauert, durch einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus daran, sauer und hydolytisch zu werden, wodurch auch eine Immunantwort des Körpers vereitelt wird. Ebenso sind die ATPasen dort reduziert³¹.

Mycobacterium tuberculosis läßt sich in einen archaischen und mehrere moderne Stämme unterteilen. Letztere enthalten die endemischen Stämme der Beijing-, Haarlem- und Afrika-Tuberculose. Nach neuen Untersuchungen trennte sich die Entwicklungslinie von *M. bovis* früh von *M. tuberculosis*. Dafür spricht das kleinere Genom von *M. bovis* und daß die gemeinsamen Vorfahren humanpathogen waren. *M. tuberculosis* infiziert nur Menschen, während *M. bovis* nur verschiedene tierische Wirte befällt. Die frühen endemischen Formen von *M. tuberculosis* waren afrikanischer oder indischer Abstammung, während die modernen Mutanten sich epidemisch über die ganze Erde verbreiteten³².

Morphologisch sind Tuberculosebakterien 0,4 x 3-4 µm schlanke lange säurefeste unbewegliche grampositive Stäbchen, die keine Sporen bilden. Allerdings sind die nach Gram gefärbten Bakterien aufgrund der lipidreichen Zellwand nur schwer oder gar nicht zu erkennen. Als säurefest werden sie bezeichnet, da sie sich auch mit HCl-Alkohol nur schlecht entfärben lassen, sobald sie mit drastischen Methoden (bei der Ziehl-Neelsen-Färbung erscheinen sie rot) erfolgreich gefärbt wurden. In der Kultur wachsen Kolonien von *M. tuberculosis* innerhalb von 3 bis 8 Wochen als trockene, gelblich gefärbte, blumenkohlartige Kulturen. Ihre Generationszeit beträgt 12-18 Stunden. Sie sind obligate Aerobier und 5-10 % CO₂ in der Atmosphäre fördern das Wachstum. Im Aufbau der Zellwand bedingen die Glycolipide und Wachse seine hohe Resistenz gegen Noxen und die damit verbundene Virulenz. Zugleich verhindern sie aber auch das schnelle Eindringen von Nährstoffen, was das langsame Wachstum bedingen mag. Der Mensch besitzt gegen die durch die Luft übertragenen Bazillen eine natürliche genetisch determinierte Resistenz, ist aber nach erfolgreicher Infektion nur durch langwierige Medikation heilbar³³. In letzter Zeit treten gehäuft nosokomiale multiresistente Stämme auf. Außerdem verbreitet sich die Krankheit durch die weltweite Mobilität schnell.

Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, das charakteristische Verhalten der Cyclasen mit D nach T Austausch im katalytischen Zentrum zu untersuchen. Dazu wurden sowohl *cyaB* aus *S. aurantiaca*, als auch die vier Cyclasen Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c und Rv3645 aus *M. tuberculosis* herangezogen.

Die mycobakteriellen ACn enthielten eine HAMP-Domäne. Da die Austauschbarkeit der D/T Mutation zeitgleich auch durch Dr. Kanacher an einer cyanobakteriellen AC untersucht wurde³⁴, konzentrierte sich die Aufmerksamkeit dieser Arbeit gegen Ende auf die HAMP-Domäne. Deren Studium sollte zu einem besseren Verständnis ihrer Interaktion sowohl mit dem katalytischen Zentrum als auch mit den Transmembrandurchgängen im Hinblick auf ihre propagierte Regulatorfunktion dienen.

2 Material

2.1 Enzyme, Kits und Chemikalien

AGS, Heidelberg: Restriktionsendonucleasen mit 10x Reaktionspuffer

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: ECL Plus Western Blot Detection System, Hyperfilm ECL, Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP, Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit

AppliChem, Darmstadt: Acrylamid 4K-Lösung 30 %

Appligene Oncor, Heidelberg: Taq-DNA-Polymerase mit 10x Reaktionspuffer

BIO-RAD, München: BIO-RAD PROTEIN ASSAY-Reagenz, Coomassie Brilliant-Blue G-250

BioGenes, Berlin: Herstellung und Reinigung des Antikörpers gegen Rv3645HAMPkat

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-Kaninchen-IgG-Fc-Antikörper und sekundärer Ziege-anti-Maus-IgG-Fc-Antikörper, beide konjugiert mit Meerrettichperoxidase

Difco Laboratories, Detroid (USA): Agar

Fluka, Buchs (Schweiz): Natriumdodecylsulfat (SDS), Formamid

Hampton Research, Laguna Niguel (USA): „Crystal Screen“ Puffer (Kristallisationspuffer)

ICN, Eschwege: Radionucleotide: [α - 32 P]-ATP, [α - 32 P]-GTP, [2,8- 3 H]-cAMP, [8- 3 H]-cGMP, Ethidiumbromid Tabletten

Macherey-Nagel, Düren: Nucleotrap Kit

Melitta Haushaltsprodukte, Minden: Toppits-Frischhaltefolie

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

Messer-Griesheim: flüssiger Stickstoff

MWG-Biotech, Ebersberg: Oligonucleotide (PCR-Primer und fluoreszenzmarkierte Sequenzierprimer mit 5'-IRD 800-Markierung)

New England Biolabs, Schwalbach/Taunus: Restriktionsendonucleasen mit 10x Reaktionspuffern, T4-Polynucleotidkinase mit 10x Reaktionspuffer, BSA für Molekularbiologie (10mg/ml)

Novagen, Darmstadt: E. coli BL21(DE3)[pREP4]

peqlab, Biotechnologie, GMBH Erlangen: Proteinstandards, peqGOLD-Agarose

Promega, Madison (USA): Wizard Plus Plasmid Purification Kit (Minipreps und Maxipreps), Pfu-DNA-Polymerase mit 10x Reaktionspuffer

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

Roche Diagnostics, Mannheim: Restriktionsendonucleasen mit 10x Reaktionspuffern, Alkalische Phosphatase, Klenow-Polymerase, Rapid DNA Ligation Kit, dNTPs, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, ATP, cAMP

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

SIGMA, Deisenhofen: APS, Glycerol 99%+, Tris, EDTA, X-Gal, IPTG, Dowex 50WX4-400, Ponceau S, Tween 20, TEMED, LB-Agar Fertigpulver, Harnstoff, Guanidiniumchlorid, Dithiothreitol, Kanamycin, Bromphenolblau, Xylencyanol, α -Monothioglycerol, DMSO

Stratagene, Heidelberg: Plasmid pBluescript II SK-, E. coli XL1Blue MRF-Bakterienzellen

Uptima, von interchim, Montiuçon Cedex (Frankreich): MicroBC Assay: protein quantitation kit

2.2 Geräte und Materialien

American National Can (USA): Parafilm

Beckman, München: Ultrazentrifuge Optima L-60, Rotor Ti50.2

Becton Dickinson (USA): Falcon Blue Max konische Polypropylenröhrchen [15 ml (Jr.), 50 ml], 10 ml Luer-Lock Spritzen (steril)

Bender & Hobein AG, Ulm: Vortex Genie2

Biometra, Göttingen: TRIO-Thermoblock Thermocycler [für große (0,5 ml) und kleine (0,2 ml) PCR-Cups], mit beheizbaren Deckeln

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

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

Bühler, Edmund Laborgerätebau, Tübingen: Schüttler KL2

Eppendorf, Hamburg: Tischzentrifugen: Zentrifuge 3200, Centrifuge 5410, Centrifuge 5414, Kühlzentrifuge Centrifuge 5402; Thermoschüttler 5436, BioPhotometer, Pipette Varipette 4810 (0,2-10 µl), Pipette Reference (0,1-2,5 ml), Multipette

Feather (Japan): Skalpellklingen Surgical Blades No.23 for No.4 Handle, Griff für chirurgische Klinge Surgical Blade Handle No.4

GATC, Konstanz: DNAstar™ Lasergene Software

Gesellschaft für Labortechnik GFL, Burgwedel: Wasserbad Typ GFL1083

Gilson (Frankreich): Laborpipetten pipetman (bis jeweils 20, 200, 1000 und 5000 µl)

Greiner Labortechnik: Cellstar Gewebekulturschalen 35 mm, Kulturröhrchen 10 ml

Hampton Research, Laguna Niguel (USA): 24 Well Platten, gefettet (für „Hanging-Drop“ Methode), Rechteckige Deckgläschen, silanisiert (beides für die Kristallisierung)

Heidolph: MR2002 Laborrührer

Heraeus Sepatech, Osterode: Megafuge 1.0R (BS4402/A), Varifuge 3.0

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt: EM pipetus Pipettierhilfe

Hoefer Scientific Instruments, San Francisco (USA): Gelgießapparatur Dual Gel Caster Mighty Small SE245, Gellaufkammer Mighty Small SE250/SE260

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

Infors HAT, Basel: Induktionsgetriebene Schüttler TR-1

Kodak, New Haven (USA): Röntgenfilm BioMax MR

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

KSG Sterilisatoren GmbH, Olching: Hochdruckdampfsterilisator 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

LKB Wallach/Bromma (Schweden): Liquid Scintillator Counter Rackbeta 120, Power Supply 2197

Macherey-Nagel, Düren: Blotmembran porablot PVDF (2 µm Porenweite)

Memmert, Schwabach: Kühlbrutschrank BK80

Metrohm, Herisau (Schweiz): pH Meter 512

Mettler-Toledo GmbH, Gießen: InLab 423 pH-Elektrode

Millipore, Eschborn: Reinwasseranlage Milli-Q UF Plus, Proteinkonzentratoren Centriplus YM-100

MWG, Ebersberg: Li-COR dna sequencer model 4000, BaselmagelR Version 4.0 Software

Pall Life Sciences, Ann Arbor (USA): Proteinkonzentratoren Nanosep 10K Blue

Promega, Madison (USA): Vac-Man (Vakuumschlüsse für Plasmidpräparation); Wizard Minicolumns (auch zur Proteinreinigung mit Ni²⁺-NTA-Agarose verwendet)

Roche Diagnostics, Mannheim: Reflotron Applicator, Quick Spin Columns Sephadex G 50, fine

Roland Vetter, Ammerbruch: Reaktionsgefäße nach Eppendorf mit 0,2, 0,5 und 1,5 ml Volumen, sterile Plastikpipetten mit 10 und 25 ml Volumen

Sartorius, Göttingen: Tischwaage BP 2100 S, Analysenwaage handy, Sterilfilter 0,2 µm

Schleicher & Schuell, Dassel: Whatmanpaper 3MM

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

Werkstatt Pharmazie, Tübingen: Flachbettgelelektrophoresekammern

Wolf, Geislingen: Tischautoklav Sanoclav

WTB binder, Ulm: Wärmeschränke

Zeiss, Oberkochen: Spektralphotometer PM2 DL

2.3 Verwendete Plasmide

pBluescript SK-:

Dieser Vektor eignet sich aufgrund seiner großen Kopienzahl sehr gut für Klonierungsaufgaben. Die Länge und die große Anzahl an singulären Restriktionsstellen der Multiple Cloning Site (MCS) ermöglichte eine große Anzahl von Klonierungsoptionen (Abb. 2-1). Er wurde vor allem in E. coli XL-1 Blue Zellen propagiert.

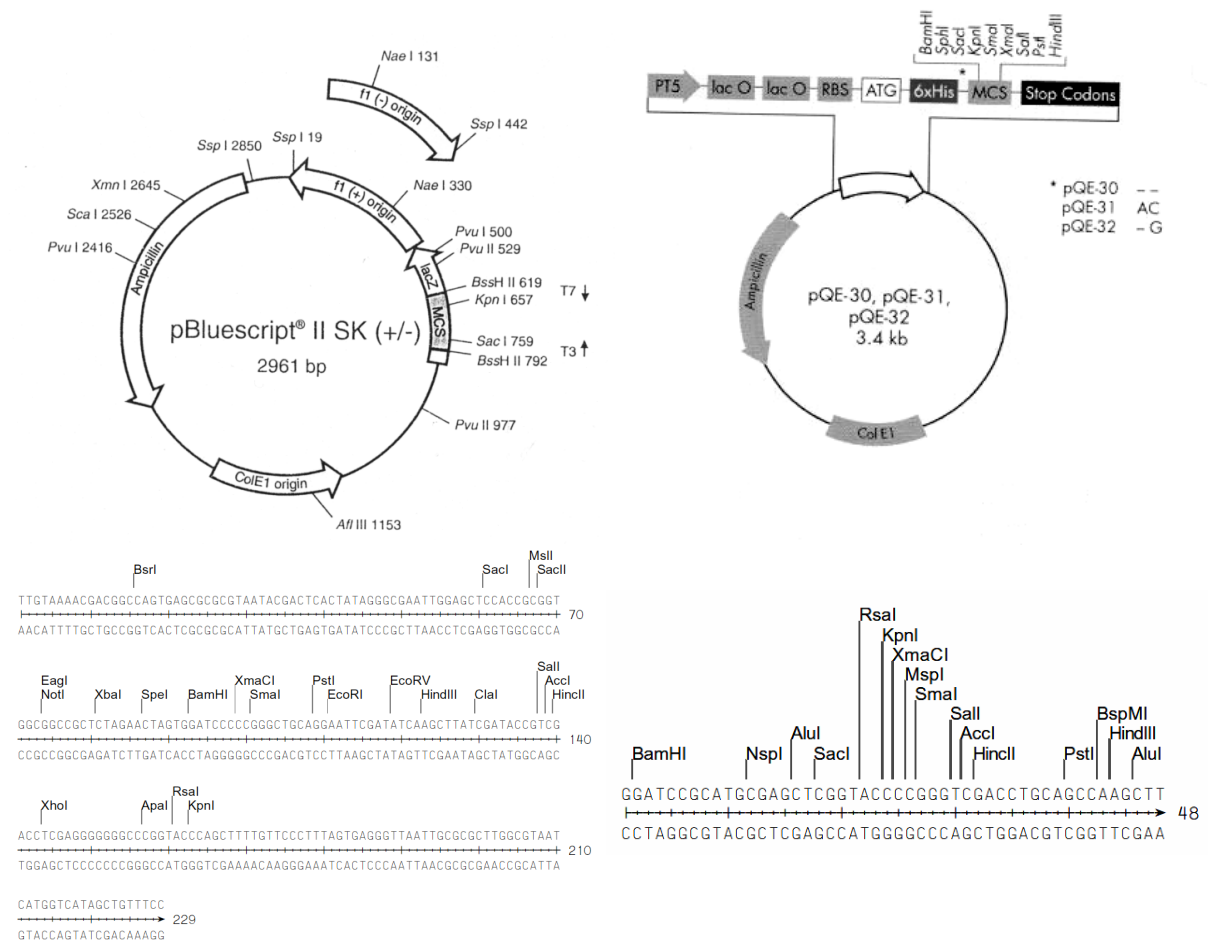


Abb. 2-1. Übersicht der Plasmide pBluescript SK- (links) und pQE30 (-32) (rechts), darunter die jeweilige MCS mit einigen singulären Schnittstellen.

pBluescript SK,-“ und „+“ unterscheiden sich in der Orientierung des f1 Origin und der MCS. pQE 31 und 32 enthalten am Beginn der MCS (Multiple Cloning Site) zwei bzw. eine zusätzliche Base, um Klonierungen für alle drei Leserahmen zu ermöglichen.

Die Abb. von pBluescript SK- wurde dem Stratagene Katalog entnommen, die von pQE30 dem Handbuch: The QIAexpressionist™ von QIAGEN in der Ausgabe vom Juli 1998.

pQE30:

Zusammen mit dem pREP4-Plasmid des E. coli BL21(DE3)[pREP4] Stammes eignete sich dieser Vektor besonders gut zur Expression. Der Phage-T5-promoter und die synthetische Ribosomenbindungsstelle ermöglichen eine hohe Ableserate. pREP4 unterdrückt die Expression durch Repressorbildung gegen den Promotor solange, bis die Expression durch IPTG gestartet wurde. Allerdings war eine Hintergrundexpression nicht ganz auszuschließen (Abb. 2-1).

2.4 Primer (Oligonucleotide)

Die Primernamen ergeben sich aus den Gennamen, der Schnittstelle bzw. den N-terminalen Aminosäuren (AAn) für die Primer der katalytischen Zentren und den Kürzeln „s“ für „sense-“ bzw. „as“ für „antisense-“ Orientierung. Mutationen bzw. (Schnittstellen-) Anhänge sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet, Schnittstellen unterstrichen.

2.4.1 Stigmatella aurantiaca:

Tab. 2-1. Primer für *Stigmatella aurantiaca*:

Name	Sequenz	Schnittstelle
<u>Holoenzym</u>		
CyaB-Start-s	AAA <u>GAT ATC</u> AAt gct cca ggg cca cca cc	EcoRV
CyaB-Stop-as	AAA <u>GAT ATC</u> tca caa cac gcg gta gag	EcoRV
CyaB-Start-V-s	<u>GGT ACC</u> atg gta aag ctt gac tcg	KpnI
CyaB-Start-M2-s	<u>GGT ACC</u> atg agt tcc tcc agc ccc c	KpnI
CyaB-Stop-as	<u>GTC GAC</u> tca caa cac gcg gta gag	Sall
<u>Verkürzungen</u>		
CyaB-FAR-s	gc <u>GGA TCC</u> ttc gcg cgc tac acg tcc	BamHI
CyaB-DTV-s	ag <u>GGA TCC</u> gac acg gtg gtg ctc acc	BamHI
CyaB-GEK-s	tg <u>GGA TCC</u> ggc gag aag cgc gag gtg	BamHI
CyaB-VTV-s	ag <u>GGA TCC</u> gtg acg gtg ctc ttc gcg	BamHI
CyaB-as	gcc tca caa cac gcg gta gag	

Name	Sequenz	Schnittstelle
<u>weitere Konstrukte</u>		
Stig-ParaE-TPR-as	CTG <u>TTT CGA AGG</u> CGG CAG GTC GTC GGC CTC CAT CTC cac gcg gta gag cgg	Sful
Stig-ParaM-TPR-as	CTC <u>TTT CGA AGG</u> CGG CAG GTC GTC GGC CTC CAT caa cac gcg gta gag cgg	Sful
Stig-Ana-TPR-as	ATC <u>TAG AGG</u> AGT ACT GCG ATC GCT caa cac gcg gta gag cgg	Xbal
CyaB-8-ΔP-s	ttc <u>acC ggI</u> ttg gcc gag agc ctc ccc gag cag gtg gtg ggt	PinAI
CyaB-8-ΔP-as	caa <u>Acc Ggt</u> gaa gtt gcg gat gtc cgc	PinAI

2.4.2 *Mycobacterium tuberculosis*:

Tab. 2-2. Primer für *Mycobacterium tuberculosis*:

Name	Sequenz	Schnittstelle
<u>Verkürzungen/Holoenzyme</u>		
Rv1318c-s	gcg cgc caa ccg gtc gca ccc gac	
Rv1318c-GEE-s	c ggc gaa gaa cgc cac gtc gcc	
Rv1318c-Mfel-as	gct ggt cac <u>caa ttg</u> cgt cga gcc	Mfel
Rv1318c-KpnI-s	ttc ggg <u>gtg gta</u> ccg ggc tat gtc	KpnI
Rv1318c-KpnI-as	gac ata gcc <u>cgg tac</u> cac ccc gaa	KpnI
Rv1318c-as	gat ggg gtc gtc gtg ggt tcg ggc	
Rv1319c-s	att tac cgt ggg gcg cat ccg aca	
Rv1319c-GED-s	c ggc gaa gac cgc cac gcc gcc	
Rv1319c-BspMI-as	cac gtg ggc <u>ggc agg</u> ttg gtt gtc	BspMI
Rv1319c-EcoRV-s	att ctg tgg <u>gat atc</u> ggc ggg gcg	EcoRV
Rv1319c-EcoRV-as	cgc ccc gcc <u>gat atc</u> cca cag aat	EcoRV
Rv1319c-as	ttg gcg cgc tcg tgt tgt ttg ccc	
Rv1320c-s	cgc gca acg acg ttg ttc ctt aga	
Rv1320c-GEE-s	c ggc gaa gag cgc cat gtc gcc	

Name	Sequenz	Schnittstelle
Rv1320c-Mfel-as	gct ggt gac <u>caa ttg</u> agt tga acc	Mfel
Rv1320c-SacII-s	ttg ttt atc <u>ccg cgg</u> ttc ctg ttt	SacII
Rv1320c-SacII-as	aaa cag gaa <u>ccg cgg</u> gat aaa caa	SacII
Rv1320c-as	ctt ttt cgc cgg cat ggt ggc gtc	
Rv3645-s	atc agc gtt cgt ttc gcg aca att	
Rv3645-GQE-s	c ggt cag gaa cgc gac gtc gcg	
Rv3645-Sty-as	cgc ggc gtc <u>gcc ttg</u> gaa ctt gtt	StyI
Rv3645-PinAI-s*	gat ctg cca <u>ccg gtc</u> aac cta ctg	PinAI
Rv3645-PinAI-as*	cag tag gtt <u>gac cgg tgg</u> cag atc	PinAI
Rv3645-as	gcc ggc gaa gaa ggc agc caa gcg	
Rv1318c-Start-s	AA <u>AGA TCT</u> atg tcg gcc aag aag agc	BglII
Rv1319c-Start-s	AA <u>GGA TCC</u> atg ccg gcg aaa aag acc	BamHI
Rv1320c-Start-s	AA <u>GGA TCC</u> atg cca tcc gag aag gcc	BamHI
Rv 3645-Start-s	AA <u>AGA TCT</u> atg gat gcc gag gcg ttc	BglII
Rv3645-T473D-s	gcc cgc <u>ttc gaA</u> tac GAc gtc atc ggc	SfuI
Rv3645-T473D-as	gcc gat gac gTC gta <u>Ttc gaa</u> gcg ggc	SfuI
Rv3645-T473A-s	gcc cgc <u>ttc gaA</u> tac Gcc gtc atc gcc	SfuI
Rv3645-T473A-as	gcc gat gac ggC gta <u>Ttc gaa</u> gcg ggc	SfuI
<u>HAMP Domäne</u>		
Rv1319c-HAMP-s	<u>GGA TCC</u> ctg acg gcg gcg ccg gtg	BamHI
Rv1319cHAMPBgIII-s	cgc gtg cgA <u>gaT</u> ctt ttc ggc cgc	BglII
Rv1319cHAMPBgIII-as	gcg gcc gaa aag <u>Atc Tcg</u> cac gcg	BglII
Rv1319c-HindIII-as	TTT <u>AAG CTT</u> GGC tta ggt ggg cac ggc	HindIII
Rv3645-HAMP-s	<u>GGA TCC</u> tcg atc gcc gac ccg tta	BamHI
Rv3645-HAMPBgIII-s	cgg ttg cgA <u>gaT</u> Ctg ttc ggt cgc	BglII
Rv3645-HAMPBgIII-as	gcg acc gaa caG <u>Atc Tcg</u> caa ccg	BglII
Rv3645-HindIII-as	TTT <u>AAG CTT</u> CGA cta gcc gcg tac ttc	HindIII
Rv3645mutHAMP-s	AAA <u>GGA TCC</u> tcg ACC gcc gac ccg AAT cgc cag ttg cgc tgg gcg cta agc gag TCG cag	BamHI
Rv3645mutHAMP-as	gaa caG <u>Atc Tcg</u> caa ccg ctg ccg ctc	BglII

* Im Laborjournal auch als Rv3645-Agel-s/-as bezeichnet.

Name	Sequenz	Schnittstelle
	gga cag ctc gcg ATT cat gtc gtt gGa gcc ggc ttg ATT cag	
Rv1319cmutHAMP-s	AAA <u>GGA TCC</u> ctg acg gcg gcg ccg AAT cga gtg gtg cgc gct gcg ctc aag cgt TCG gag	BamHI
Rv1319cmutHAMP-as	gaa <u>aag Atc Tcg</u> cac gcg ttc gcg ctc gcg cag gcc gtt ATT cat cgc gtt gGa acc acg ctg ATT ctc	BgIII
Rv1319cmutHAMPHolo-s	tcc ctg <u>acC gcg gcg</u> ccg AAT	SacII
Rv1319cmutHAMPHolo-as	cgg <u>cgC gcC Ggt</u> cag cca agc aag	SacII
Rv3645mutHAMPHolo-s	gga tcc <u>gtc GAc</u> acc ctg ttg gtg gcc atg tcg AAC gcc gac ccg AAT	Sall
Rv3645mutHAMPHolo-as	cca cag ggt <u>gTC gac</u> gga tcc gat	Sall
<u>verbundene ACn</u>		
Rv1319c/18c-SacI-s	aca <u>cga gcT</u> cgc caa ccg gtc gca ccc gac tct tcg aca aac Cag tct gac	SacI
Rv1319c/18c-SacI-as	cgg ttg <u>gcg Agc</u> tcg tgt tgt ttg ccc ggc ttG ggt ggg	SacI
Rv1320c/19c-SacI-s	tac cgt <u>ggA gcT</u> cat ccg aca gat Cag gct gac	SacI
Rv1320c/19c-SacI-as	gtc agc ctG atc tgt cgg atg <u>Agc Tcc</u> acg gta	SacI

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 ... für molekularbiologische Methoden

2.5.1.1 Lösungen zum Auftrennen, Reinigen und Lagern von DNA

BX Probenpuffer (für Agarosegele):

1x TAE Puffer
5 % Glycerol
0,5 % Xylencyanol
0,5 % Bromphenolblau

TBE Puffer (10x; für Li-Cor):

1,34 M Tris
440 mM Borsäure
25 mM Na₂EDTA

TAE Puffer:

40 mM Tris/Acetat, pH 8,0
1 mM Na₂EDTA

TE Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM Na₂EDTA

2.5.1.2 Lösungen zur Modifikation und Transfektion von DNA

10x CM:

100 mM CaCl₂
100 mM MgCl₂

dNTPs:

20 mM je dNTP

10x Dephosphorylierungspuffer:

500 mM Tris/HCl, pH 8,5
1 mM Na₂EDTA

10x Klenowpuffer:

200 mM Tris/HCl, pH 7,9
60 mM MgCl₂
10 mM Dithiothreitol
5 µg/µl BSA

2.5.2 ... für proteinchemische Methoden

2.5.2.1 für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngelpuffer:

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

Sammelgelpuffer:

500 mM Tris/HCl, pH 6,8

Laufpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS

4x Probenpuffer

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

Coomassie Färbelösung

0,2 % Brilliant Blue G250
40 % Methanol
1 % Essigsäure
ad 100 % Wasser

Entfärber

10 % Essigsäure
30 % Ethanol
ad 100 % Wasser

2.5.2.2 Westernblotting

TBS Puffer (tris buffered saline)

20 mM Tris/HCl, pH 7,6
~ 0,8 % NaCl

M-TBS (-T)

5 % Milchpulver (fettfrei)
0,1 % Tween 20 (für einen
geringeren Hintergrund)
in TBS Puffer

Towbin-Blot-Puffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % Methanol

TBS-T

0,1 % Tween 20
in TBS Puffer

2.5.2.3 Puffer für die Ni²⁺-NTA Reinigung

Lysispuffer P2:

50 mM Tris/HCl; pH 8
2,5 mM Thioglycerol
50 mM NaCl

Waschpuffer:

P3:

50 mM Tris/HCl; pH 8
2,5 mM Thioglycerol
2 mM MgCl₂
400 mM NaCl
5 mM Imidazol

P4:

50 mM Tris/HCl; pH 8
2,5 mM Thioglycerol
2 mM MgCl₂
400 mM NaCl
15 mM Imidazol

P5:

50 mM Tris/HCl; pH 8
2,5 mM Thioglycerol
2 mM MgCl₂
10 mM NaCl
15 mM Imidazol

Elutionspuffer P6:

50 mM Tris/HCl; pH 8
2,5 mM Thioglycerol
2 mM MgCl₂
10 mM NaCl
150 mM Imidazol

2.5.2.4 Puffer für die Kristallisierung:

Dialysepuffer :

10 mM Tris/HCl pH 8
2,5 mM Thioglycerol
2 mM MgCl₂

2.5.2.5 Puffer für die Antikörperproduktion und –reinigung

HEPES-Puffer:

50 mM HEPES/NaOH, pH 7,4
2,5 mM Thioglycerol
3 mM MgCl₂
10 mM NaCl

PBS (phosphate buffered saline):

8 g/L NaCl
0,2 g/L KCl
0,14 g/L Na₂HPO₄
2,4 g/L KH₂PO₄
mit HCl auf pH 7,4 einstellen

2.5.3 Lösungen für den Adenylat- und Guanylat-Assay

Membransuspensionspuffer

50 mM Tris/HCl, pH 7,5
2,5 mM Thioglycerol
250 mM NaCl
20 % Glycerol

10x Start für AC Assay

750 µM ATP
inkl. ~4x10⁶ Bq/ml [α -³²P]-ATP

10x Start für GC Assay

750 µM GTP
inkl. ~4x10⁶ Bq/ml [α -³²P]-GTP

1,5x AC Stoppuffer

3 mM cAMP
1,5 % SDS

1,5x GC Stoppuffer

2 % SDS

2x AC Cocktail

43,5 % Glycerol
100 mM Tris/HCl pH 7,5 bzw. 8,1
4 mM cAMP
(inkl. ~300 Bq/ml [2'8'-³H]-cAMP
4 mM MnCl₂
oder 20 mM MgCl₂

2x GC Cocktail

43,5 % Glycerol
100 mM Tris/HCl pH 7,5
4 mM cGMP
(inkl. ~300 Bq/ml [2'8'-³H]-cGMP
4 mM MnCl₂
oder 20 mM MgCl₂

bei Zellhomogenaten oder Membranpräparationen zusätzlich im Cocktail:

0,45 mg/2 ml Kreatinkinase
6 mM Kreatinphosphat

0,45 mg/2 ml Kreatinkinase
6 mM Kreatinphosphat

2.5.4 Medien für E. coli

LB Medium

20 g/l LB Broth

LB Medium oder Plattenagar mit Antibiotika

und/oder 100 µg/ml Ampicillin
und/oder 50 µg/ml Kanamycin
10 µg/ml Tetracyclin

LB Plattenagar

35 g/l LB Broth

3 Methoden

3.1 Gentechnologische Methoden

3.1.1 Minipräparation (Miniprep)

E. coli aus 5 ml über Nacht gewachsener Kulturen wurden durch Zentrifugation (~14.000 g, 10 sec) gesammelt. Die Plasmide wurden nach den Anweisungen des verwendeten „Wizard Plus SV Plasmid Purification Kits“ aus dem Zellschlag isoliert. Anschließend erfolgte die Elution der Plasmide mit 100 µl sterilem Wasser.

3.1.2 Auftrennung von DNA über Agarosegele

Die Auftrennung der DNA nach ihrer Größe erfolgte über eine horizontale Elektrophorese (mit 80-105 V) durch ein Agarosegel, mit einer Konzentration von 1-2 % je nach Größe der zu trennenden DNA Fragmente. Dabei fand TAE als Elektrolysepuffer Verwendung. pBluescript SK-, MspI / SspI geschnitten, und EcoRV / HindIII geschnittene λ-DNA dienten als Marker. Nach dem Lauf wurde das Gel für 0,5-2 min in einem Ethidiumbromidbad (0,01 mg/ml) gefärbt und zur Hintergrundfärbung noch weitere 10 min laufen gelassen. Ein Videoprinter dokumentierte das Ergebnis mit UV-Licht von 302 nm.

3.1.3 Konzentration von DNA und Reinigung aus Agarosegelen

Aus dem Agarosegel wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde nach den Anweisungen des verwendeten „Nucleotrap“-Kits gereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 µl sterilem Wasser.

Eine zweite Prozedur desselben Kits ließ eine Konzentration der DNA mit gleichzeitiger Reinigung aus Reaktionsansätzen zu.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Ein Vergleich der erhaltenen DNA-Banden mit der Markerbande entsprechender Größe ließ auf ihre Konzentration schließen.

3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

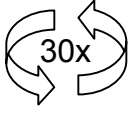
Die PCR wurde mit spezifischen synthetisch hergestellten Primern durchgeführt. Die (Primeranlagerungs-) Annealingtemperatur wurde anhand der ersten 18 durchgängig bindenden Basen nach folgender Formel berechnet:

$$2x (A+T) + 4x (G+C) = T_A$$

Der wegen der verwendeten Pfu-DNA-Polymerase auf Eis angesetzte Reaktionsansatz von 50 µl enthält:

1-10 ng Plasmid DNA
 0,5 µM Primer
 200 µM dNTPs
 1,5 U Pfu-DNA-Polymerase
 $\frac{1}{10}$ Gesamtvolumen 10x Pfu-PCR-Puffer
 5 % DMSO

Typisches Reaktionstemperaturprofil einer PCR:

Phase	Temperatur	Dauer	Cyclen
erste Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	T_A [°C]	1 min	
Verlängerung (2min/1kb)	72 °C	2 min	
Auffüllung	72 °C	5 min	

Die PCR Produkte wurden aus ihrem Reaktionsansatz konzentriert, phosphoryliert und über ein Agarosegel getrennt und nach Reinigung in den pBluescript SK-kloniert. Wurde mit der Taq-DNA-Polymerase gearbeitet, mußte das Produkt zuerst gebluntet werden.

3.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Ein beispielhafter Kontrollverdauansatz enthielt 3 µl (100-1000 ng) Plasmid-DNA und 0,2-0,5 µl (1-2 U) pro Restriktionsenzym in 10 µl Gesamtvolumen mit der entsprechenden Menge an Reaktionspuffer. Zusatz von BSA (5 µg/10 µl) stabilisierte die Enzyme. Die Restriktionsenzyme und deren Puffer wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die Reaktionszeit betrug 45-60 min.

3.1.7 Glätten (blunten) von überhängenden DNA-Enden

Mit Hilfe des „Klenow“-Fragments der DNA Polymerase I wurden 5'-Überhänge des Doppelstranges aufgefüllt und 3'-Überhänge abverdaut. Der Reaktionsansatz wurde

entsprechend den Herstellerangaben angesetzt. Dabei wurden pro 10 μl 1 μl 10x Klenowpuffer mit BSA, 0,8 U Klenowenzym, 7,5 μl (100-1000 ng) DNA und nach 10 min Reaktionszeit bei 37 °C 1 μl 1mM dNTPs (je 1 mM G-/A-/T- und CTP) zugesetzt.

3.1.8 5'-DNA Phosphorylierung von PCR Produkten

Zur Ligation von PCR Produkten mußten diese am 5'-Ende mit der T4-Polynucleotidkinase phosphoryliert werden. 15 μl (100-1000 ng) DNA oder Klenowansatz wurden mit 10 U Enzym, 2 μl 10 mM ATP und 1,5 μl 10x Reaktionspuffer versetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert.

3.1.9 5'-DNA Dephosphorylierung von Vektoren

Damit die Religation der geschnittenen Vektoren verhindert wird, wurden diese nach oder während des Restriktionsverdaues mit alkalischer Phosphatase (AP) dephosphoryliert. Dazu wurde der Restriktionsansatz auf 20 μl inklusive entsprechender Menge an AP-Puffer und 1 U AP verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 1 h.

War der Restriktionspuffer basisch genug ($\text{pH} \geq 8$), so genügte es, dem Ansatz nur die AP zuzugeben.

3.1.10 Ligation von DNA

Für die Ligation wurde das gewünschte molare Ligationsverhältnis von PCR/DNA-Fragment (Insert) zu Vektor (üblicherweise 3:1 bis 5:1, hier 1:1) per Abschätzung der Bandenstärke im Agarosegel ermittelt (üblicherweise gegen die Markerbanden).

Da in gleichhellen Banden kleinerer Fragmente mehr Moleküle vorliegen, muß nur ein dementsprechender Bruchteil (Verhältnissfaktor) verwendet werden. Dieser wird aus den Größenunterschieden der Fragmente berechnet.

Für eine optimale Ligation sollten 50 ng Vektor eingesetzt werden.

Beispiel:

	Größe [bp]	abgeschätzte Menge im Gel [ng]	errechnete Konz. (nach Nucleotrap) [ng/ μl]	Verhältnissfaktor (hier für 1:1)	eingesetzt: ng damit μl
Insert	~ 200	210	7	$\frac{1}{15}$	3,3 \rightarrow 0,5
Vektor	~3000	1000	33,3	$\frac{1}{1}$	50 \rightarrow 1,5

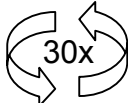
Für die Ligation wurde der „Rapid-DNA-Ligation Kit“ verwendet. Die Ligation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das in der Kit-Anleitung geforderte Volumen von 8 µl für die gesamte eingesetzte DNA (50-100 ng) wurde durch Zusatz von sterilem Wasser oder Konzentrierung in der Speedvac erreicht. Die Ligationsdauer betrug meist 20 min, bei komplizierten Ligationen (Tripligationen) auch länger. 10 µl des fertig ligierten Ansatzes wurden dann mit 100 µl gerade auftauender kompetenter Zellen vorsichtig vermischt.

3.1.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde mit dem „Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit“ nach Herstellerangaben durchgeführt.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 10 µl (~500 ng) Plasmid, 1,5 µl T₇- oder T₃-Primer [2 µM] (für pBluescript SK-) bzw. 2 µl [4 µM] U- oder R-Primer (für pQE) und 0,5 µl DMSO. Mit sterilem Wasser wurde auf 13 µl aufgefüllt. Davon wurden 3 µl mit je 2 µl vorgelegtem G-/A-/T- oder C-Reagenz durch Pipettieren vermischt. Die Überschichtung mit 1 Tropfen „Chill out Wax“ verhinderte das Verdampfen (war aber bei geschlossenem Heizdeckel des Thermocyclers nicht unbedingt notwendig).

Die Sequenzierreaktion verlief nach folgendem Programm:

Phase	Temperatur	Dauer	Cyclen
erste Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	20 sec	
Annealing	T _A [°C]	20 sec	
Verlängerung (2min/1kb)	70 °C	20 sec	

Die Annealingtemperatur betrug für die T₃-/T₇-Primer 56 °C und für die U-/R-Primer 54 °C. Der Ansatz wurde mit 6 µl Stopppuffer denaturiert. Jeweils 1-1,3 µl wurden auf das 6 %ige Polyacrylamidgel aufgetragen und über Nacht bei 50 °C mit 50 W Leistung (max. 1500 V, max. 37 mA; nach Herstellerangaben) sequenziert.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Herstellung kompetenter E. coli – Zellen

Wenn E. coli nach spezieller Behandlung Plasmide aufnehmen, sie werden kompetent. Die genaue Ursache für dieses Phänomen ist weitgehend unbekannt.

Mit 200 µl Vorkultur/100 ml frischem Medium angeimpfte E. coli wurden bei 37 °C bis auf eine A_{600} von 0,3 bis 0,4 gezüchtet. Nach Abkühlung auf 4 °C (ca. 10 min auf Eiswasser) wurden die Zellen bei ~1000 g für 15 min abzentrifugiert (alles bei 4 °C/Eis). Die vorsichtige Resuspendierung erfolgte mit 50 ml 100 µM kalter CaCl_2 -Lösung. Nach 20 min Einwirkzeit wurde wie oben zentrifugiert. Der erhaltene Zellkuchen wurde in 10 ml CaCl_2 mit 20 % Glycerol resuspendiert und >2 h (max. 4-6 h) auf Eis inkubiert. 100 µl Aliquots wurden bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.2 Transformation kompetenter E. coli – Zellen

Die kompetenten E. coli Zellen werden durch Aufnahme resistenzvermittelnder Plasmide, die auch die zu vervielfältigende oder zu exprimierende DNA enthalten, in den Zustand versetzt, in antibiotikahaltigem Medium zu wachsen.

Hierzu gab man 10 µl des Ligationsansatzes (evtl. mit 10 µl 10x CM-Puffer und Wasser zu 100µl vermischt) zu den kompetenten Zellen. Nach 20 min auf Eis, 45 sec 42 °C Hitzeschock und weiteren 10 min auf Eis wurden 500 µl LB Medium zugegeben und 30 min (bis max. 120 min) bei 37 °C inkubiert. 250 µl wurden dann auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen, der Rest in eine 5 ml Flüssigkultur (ebenfalls mit Antibiotika) gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Für eine Schnelltransformation mit intaktem Plasmid genügt es, 0,5 µl Plasmidlösung auf 100 µl kompetente Zellen zu geben, oder die kompetenten Zellen in die ehemals plasmidenthaltenden Epicups zu überführen. Nach 5-15 min Inkubation auf Eis wurden 10 µl auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen und wie oben inkubiert.

3.2.3 Herstellung von Dauerkulturen

Kulturen mit wichtigen Konstrukten wurden als Glyceroldauerkultur bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, um kurzfristig an Plasmid- oder Proteinpräparationen gelangen zu können.

Die Zellen von 2x 1,5 ml Kultur wurden durch Zentrifugation (10 sec bei 14.000 g) gesammelt und in 750 μl frischem LB-Medium resuspendiert. Sofort nach Zugabe von 250 μl Glycerol werden die Dauerkulturen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.2.4 Blau-Weiß-Screen

Die MCS des pBluescript SK- liegt innerhalb des lacZ Genes, das für die Komplementierung der β -Galactosidase der E. coli benötigt wird. Ein inkloniertes DNA Fragment zerstört das lacZ Gen, das Protein kann nicht gebildet werden und die Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff bei gleichzeitiger Induktion mit IPTG wird unterbunden. Nur Zellen mit intakter leerer Vektor-MCS bilden blaue Kolonien auf LB-Agarplatten. Weiße Zellkolonien enthalten das gewünschte DNA Fragment.

Für den Test trug man auf eine vorgetrocknete LB-Agarplatte je 40 μl 100 mM IPTG und 2 % X-Gal auf und ließ sie trocknen. Darauf wurden dann die transformierten Zellen ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden die weißen Kolonien gepickt.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Proteinexpression

LB-Vorkulturen wurden mit E. coli BL21(DE3)[pREP4] Dauerkulturen des gewünschten Konstrukts angeimpft und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ angezogen. Je 200 ml Expressionskulturen desselben Mediums impfte man mit je 10 ml Vorkultur an und ließ bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $A_{600} \approx 0,5$ anwachsen. Nach Induktion mit 30 (-1000) μM IPTG wurde bei RT (wenn einstellbar: $21,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) über drei Stunden exprimiert.

Die Ernte erfolgte über eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei $\sim 4000\text{ g}$. Die Zellen wurden mit 10 ml kaltem Zellwaschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 1 mM EDTA) resuspendiert und in 50 ml Falcons überführt. Diese wurden bei $\sim 2000\text{ g}$ für 20 min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abgießen des klaren Überstandes wurden die Zellen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.2 Zellhomogenat

Frische oder aufgetaute Zellen wurden in 1 ml 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 resuspendiert. Zur Lyse wurden die Zellen 3 mal 10 sec bei 4 °C mit Ultraschall, Stufe 4-5 behandelt. Sollte noch zwischen Überstand und Niederschlag unterschieden werden, schloß sich eine Zentrifugation bei 14.000 g für 20 min bei 4 °C an. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert.

3.3.3 Proteinreinigung

Die Zellen wurden in 25 ml Puffer P2 auf Eis (wie die ganze Reinigung) suspendiert. Durch zweimaliges Durchdrücken durch die French Press mit 1000 psi (\approx 60 atm) wurden sie aufgeschlossen (einmal genügt ebenfalls). An 30 min Zentrifugation bei 31.000 g schloß sich die Aufreinigung des Überstandes an. Dieser wurde mit 250 mM NaCl und 200 μ l Ni²⁺-NTA pro 200 ml Kultur (max. 500 μ l bei Großansätzen) versetzt und 30-60 min auf Eis im liegenden 50 ml Falcontube geschüttelt. Waschen erfolgte mit je 3 ml Puffer P3, P4 und P5 indem das jeweilige Volumen langsam durch Miniprep-Säulen mit Hilfe von 10 ml Spritzen gedrückt wurde. Die Elution erfolgte ebenso, aber diesmal sehr langsam (1 Tropfen/ 20 sec) mit 200-600 μ l Puffer P6. Anschließend lagerten die Konstrukte der mycobakteriellen ACn mit 20 % Glycerol bei -20 °C, die von *cyaB8* dagegen bei 4 °C im Kühlschrank.

Der Wechsel von Ultraschall zur French Press brachte einen dreifachen Ertragsgewinn (von \sim 2 μ g/ μ l Protein auf 5-6 μ g/ μ l).

3.3.4 Membranpräparation (mit Solubilisierung)

Die gesamte Präparation wurde bei 4 °C durchgeführt. Nach dem Aufschluß durch die French-Press schloß sich eine Zentrifugation bei 3000 g für 30 min an. Der Überstand wurde bei 100.000 g für 1 h zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1 ml Membransuspensionspuffer resuspendiert und davon 20 μ l in den Test eingesetzt.

Sollte eine Solubilisierung stattfinden, wurden 25 ml Suspension mit der entsprechenden Menge an Detergenzlösung versetzt und für 1 h im 50 ml Falcon auf Eis liegend geschüttelt. Danach schloß sich eine zweite Ultrazentrifugation (wie oben) an. Nach Zugabe von 400 μ l Ni²⁺-NTA zum Überstand wurde über Nacht auf

Eis gebunden. Die anschließende Reinigung verlief wie bei 3.3.3 allerdings mit je 6 ml Puffer. Eluiert wurde mit 800 µl Puffer P6.

Für die ausschließliche Messung des Detergenzeinflusses wurde nach 1 h Schütteln mit Detergenz bei ca. 48.000 g für 30 min zentrifugiert und Überstand und Niederschlag enzymatisch vermessen.

Die AC-Assays wurden mit regenerierendem System durchgeführt.

3.3.5 BioRad (Bradford) Mikro – Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung eignet sich besonders für lösliche Proteine (1-100 µg/ml). Dabei bildet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 mit basischen und aromatischen AAn Komplexe, die bei A_{595} photometrisch vermessen werden.

Die Proteinbestimmung wurde nach „BioRad“-Herstellerangaben durchgeführt. 5 µl Probe wurde mit Wasser zu 800 µl aufgefüllt, 200 µl BioRad Reagenz zugefügt und gevortext. Nach 5 min wurde gemessen. Als Standard wurde BSA in den Mengen von 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 und 20 µg eingesetzt.

3.3.6 MicroBC – Assay

Der MicroBC Assay (für 1-100 µg/ml) ist sequenzunabhängig und eignet sich deshalb für detergenzhaltige Lösungen und Membranprotein. Er beruht auf der Reduktion des Cu^{2+} zu Cu^+ durch die Peptidbindungen des Proteinrückgrades. Die Bicinchoninsäure (BCA) komplexiert das entstandene Cu^+ mit sehr hoher Spezifität und bildet einen purpurfarbenen Komplex, der bei A_{562} vermessen wird. Die Reaktion beschleunigt sich bei erhöhter Temperatur.

Die Ausführung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, die Ansätze zur Materialersparnis aber auf das halbe Volumen reduziert. Als Standard wurde BSA eingesetzt.

3.3.7 Antikörperproduktion gegen Rv3645

Die Antikörperproduktion wurde von der Firma BioGenes, Berlin, durchgeführt. Das benötigte Protein (Rv3645HAMPkat) wurde gereinigt und bei 4 °C gegen HEPES-Puffer über Nacht dialysiert. Das Protein war nicht vollständig löslich.

3.3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der Apparaturen von Hoefer (s.o.) und nach deren Angaben wurden die SDS-PAGE Gele gegossen. Die Gelzusammensetzung variierte je nach benötigter Geldichte, die sich wiederum nach der erwarteten Proteingröße richtete.

Trenngel, pH 8,8 (für 2 Gele!)				
erwartete Proteingröße [kDa]	36-94	16-68	14-56	12-43
Trenngeldichte	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
Trenngelpuffer, pH 8,8	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Wasser	6 ml	5 ml	4 ml	3 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml
TEMED	10 µl			
APS 10 %	80 µl			

Die Zusammensetzung des Sammelgels blieb stets gleich:

Sammelgel pH 6,8 (für 2 Gele!):

Sammelgelpuffer, pH 6,8	1 ml
Wasser	2,4 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	0,6 ml
TEMED	10 µl
APS 10 %	40 µl

Die löslichen Proteinproben wurden mit unterschiedlichen Mengen 4x SDS Probenpuffer versetzt. Membranproteine wurden 1:1 mit dem Probenpuffer versetzt und ≥ 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14.000 g für 5 min wurde das aufzutragende Volumen vorsichtig vom Überstand abpipettiert.

Als Proteinmarker wurde der Standard von peqLab verwendet. Vorher war folgendes selbsthergestelltes Proteingemisch im Einsatz:

BSA	66/68 kDa
Ovalbumin	45 kDa
GAPDH	36 kDa
Carboanhydrase	29 kDa
Chymotrypsinogen A	25 kDa
Trypsininhibitor	20 kDa
Cytochrom C	12,5 kDa

Die Gele wurden bei 20 mA/Gel und 200 V laufen gelassen. Wenn keine weitere Verwendung für einen Western-Blot vorgesehen war, wurden die Gele unterschiedlich lang (auch über Nacht) mit Coomassie Färbelösung gefärbt und anschließend entfärbt.

3.3.9 Western-Blot

War die Proteinmenge zu gering um durch Färbungen nachgewiesen zu werden oder sollte eine spezifische Antikörperreaktion durchgeführt werden, so war der elektrische Transfer (Blot) des Proteins vom Gel auf eine Membran vonnöten. Hierfür wurde die „Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“ verwendet.

Eine PVDF-Membran wurde durch kurzes Einlegen nacheinander in Methanol, Wasser und für 20 min in Blotpuffer vorbereitet. Das Gel selbst, sowie die 6 3MM Whatmanpaper pro Gel wurden ebenfalls 10-20 min in Blotpuffer eingelegt. Alle Lagen hatten die gleiche Größe, damit kein Nebenstrom fließen konnte.

Aufbauend auf der Anode (+) wurden drei Whatmanpaper aufeinander gelegt. Darauf wurde erst die Membran, dann das Gel plaziert. Den Sandwichaufbau vollendeten drei weitere Lagen Whatmanpaper und die Kathode (-). Die Blotzeit betrug meist 3 h bei 25 V und 5 mA/cm².

Nach Beendigung des Blots wurde das Gel gefärbt, um zurückgebliebene Proteine zu identifizieren. Die Membran wurde kurz (1-2 min) in Ponceau S geschüttelt und vorsichtig mit möglichst wenig Wasser entfärbt, da die Färbung rasch schwand. Wenn erkennbar, konnten die Markerbanden mit einem Bleistift oder durch Punktation markiert werden. Die anschließende Prozedur erfolgte bei RT und leichtem Schwenken auf einem Schüttler mit einem jeweiligen Volumen von 25 ml.

1. 1h Hintergrundblockierung mit M-TBS
2. 2x 2min mit TBS-T waschen
3. Inkubation mit primärem AK für 1 h
4. 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min waschen TBS-T
5. Inkubation mit sekundärem AK für 1 h
6. 2x kurz, 1x 15 min, 2x 5 min waschen mit TBS-T

Danach wurde die Signaldetektion nach den Anweisungen des verwendeten „ECL Plus Western Blot Detection System“ durchgeführt. Die nach der lichtinduzierenden Reaktion feuchte Membran wurde auf einer dünnen Kunststoffplatte in Frischhaltefolie eingewickelt. Danach erfolgte die Belichtung des „ECL Hyperfilms“ je nach Intensität des emittierten Lichts zwischen 2 sec und 10 min und die Entwicklung des Films.

Als primärer Antikörper fand für den HexaHis-Tag (der N-terminal an allen Proteinen vorhanden war) der anti-RGS(His)₄ Antikörper (Maus), für die HAMPkat-Domäne der anti-Rv3645HAMPkat-Antikörper (Kaninchen) Verwendung. Beide wurden 1:2000 mit M-TBS verdünnt. Der zweite Antikörper (1:5000 verdünnt) war jeweils ein Ziege gegen Maus bzw. Ziege gegen Kaninchen Antikörper, beide gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet und an Meerrettichperoxidase gekoppelt.

3.3.10 Kristallisierung

Gereinigtes Protein (ca. 600 µl) wurde bei 4 °C für 1-2 h oder ü. N. gegen 500 ml Dialysepuffer dialysiert. Die Proteinkonzentrierung erfolgte über eine Konzentrationssäule für Eppendorfgefäße (Ausschlußgröße: 10 kDa) in der Zentrifuge bei 4 °C und max. 10.000 g („soft start & stop“) für jeweils 2-15 min bis zur gewünschten Konzentration. Die Lagerung erfolgte mit 10 % Glycerol bei -20 °C.

Je 1 µl Kristallisationspuffer („Crystal Screen“) und Protein wurden mittig auf einem silanisierten Deckgläschen zu einem Tropfen gemischt. Dieses verschloß umgedreht eine Vertiefung einer 24-Well Platte mit 500 µl gleichen Kristallisationspuffers (Abb. 3-1).

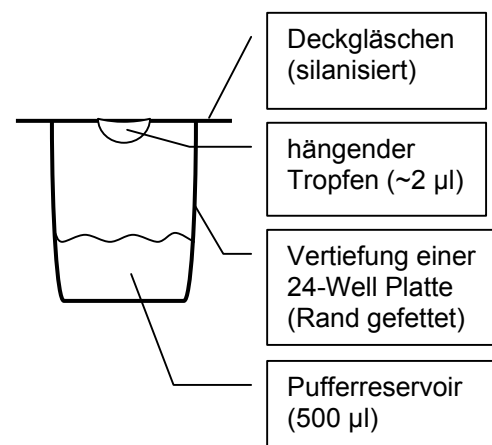


Abb. 3-1. Methode: „Hängender Tropfen“.

3.4 Adenylatcyclase Enzymtest (AC-Assay)

Die Enzymtests auf Adenylatcyclase- und Guanylatcyclaseaktivität entsprechen sich weitgehend. Unterschiede bestehen nur in der Art der verwendeten Substrate und internen Standards, sowie in der Füllmenge der Säulen mit der jeweiligen Matrix bzw. den daraus resultierenden Anwendungsvolumina. Hier wird beispielhaft der fast ausschließlich durchgeführte AC-Assay beschrieben. Grundlage des Assays ist:³⁵.

Für den Test wurden das Protein (mit Wasser ad 40 µl), zusammen mit dem AC-Cocktail (50 µl), der alle für den Test erforderlichen Substanzen inklusive des internen Standards [2',8'-³H]-cAMP für die Säulenausbeute aber kein ATP enthielt, auf Eis vorgelegt (zusammen 90 µl). Die Reaktion wurde mit 10 µl AC-Startlösung in Gang gesetzt und für meist 10 min bei 30 oder 37 °C inkubiert. Durch die Reaktion wurde das ATP (das einem Bruchteil an radioaktiv markiertem [α -³²P]-ATP enthielt) in 3',5'-cAMP umgesetzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Reaktion mit 150 µl AC-Stoppuffer beendet und mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Die Proben wurden dann auf Dowexsäulen (gefüllt mit 1,2 g Dowex 50WX4-400), die den cAMP-Durchlauf verzögerten, aufgetragen. Nach Einsickern wurde mit 3 ml Wasser gespült. Die Elution erfolgte mit 5 ml Wasser auf Aluminiumoxidsäulen (gefüllt mit 1 g Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral), die das cAMP banden. Das cAMP wurde unmittelbar mit 4 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 in die Szintillatorgefäße mit vorgelegten 4 ml Ultima Gold XR Szintillator eluiert.

Die Aktivitäten wurden berechnet nach Anhang 7.1.

Die Regeneration der Dowexsäulen erfolgte mit 1x 5 ml 2 M HCl und 1x 10 ml und 1x 5 ml Wasser bei den Dowexsäulen. Die Aluminiumoxidsäulen wurden mit 2x 5 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 regeneriert.

Wenn nicht anders angegeben wurde für *cyaB*-Konstrukte bei 30 °C, pH 7,5, bei Konstrukten der ACn von *M. tuberculosis* bei 37 °C und pH 8,1 getestet. Um der alkalischen Braunsteinbildung vorzubeugen, wurde der Cocktail erst unmittelbar vor Testbeginn zugegeben und der Test rasch durchgeführt. Als erfolgreich hat sich auch die Zugabe des MnCl₂ in die AC-Startlösung bewährt.

Die pH-Werte der Puffer wurden alle bei RT bestimmt und für Tris/HCl auf die jeweilige Temperatur berechnet (nach Sigma-Aldrich Katalog).

Werte wurden dann verwendet, wenn der doppelte Blindwert überschritten war. Als Negativkontrolle diente der leere Expressionsvektor pQE, die Positivkontrolle wurde von einem aktiven bekannten Enzym oder Konstrukt gestellt. Dabei fand die Expression und Reinigung der Negativprobe unter denselben Bedingungen statt. Im Verlauf der Arbeit wird die Negativkontrolle als pQE bezeichnet. Wurden Zellhomogenate oder Membransuspensionen getestet, so wurde zum Reaktionsansatz als regenerierendes System Kreatinphosphat und Kreatinkinase zugegeben.

Schwankungen in den gemessenen Aktivitäten könnten durch überalterten Szintillator hervorgerufen worden sein. Der lichtempfindliche Szintillator wurde in braunen Flaschen geliefert und war schon seit Jahren abgelaufen. Dieser Einfluß machte sich besonders bei höheren Aktivitäten bemerkbar.

3.5 computergestützte Untersuchungen

Hier werden nur wichtige system- und geräteunabhängige Untersuchungsprogramme aufgeführt. Für die Internetadressen siehe Anhang 7.6.

Lokale Sequenzuntersuchungen wurden mit dem Softwarepaket „DNA Star“ von Lasergene durchgeführt.

Als Datenbank für Protein- und die zugehörigen DNA-Sequenzen wurde sowohl die SWISSPROT Datenbank¹, als auch die des Sanger Zentrum (Projekt *Mycobacterium tuberculosis*) verwendet. Die SWISS-PROT Accession Numbers der bearbeiteten Enzyme sind in Anhang 7.5 angegeben.

Die Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des SMART-Programms^{36,37} des EMBL Heidelbergs analysiert. Hier befinden sich auch Links für weitere Informationen und Alignmentmöglichkeiten der ausgewählten Domänen.

Sequenzvergleiche auf DNA und Proteinebene wurden mit dem BLAST-Search des NCBI durchgeführt^{38,39}.

3.6 Klonierungsarbeiten

In diesem Kapitel werden die Klonierungen der Konstrukte dieser Arbeit besprochen. Weitere Angaben zu den Konstrukten finden sich im Ergebnisteil.

Die Konstrukte wurden alle per PCR mit den entsprechenden Primern amplifiziert. Nach Aufreinigung der PCR-Fragmente durch Entsalzung mit Nucleotrap mit oder ohne vorherige Trennung über eine Agarose-Gelelektrophorese wurden die Enden geglättet, phosphoryliert und in den EcoRV geschnittenen, dephosphorylierten pBluescript SK- Vektor kloniert. Sie wurden in XL-1 Blue Zellen amplifiziert und die Sequenz wurde durch Sequenzierung der Miniprep kontrolliert. Mit der „richtigen“ Orientierung ist diejenige gemeint, bei der im pBluescript SK- die BamHI-Schnittstelle am 5' Ende und die HindIII-Schnittstelle am 3' Ende des einklonierten Fragments liegt.

Danach erfolgte ein Zusammenbau im pBluescript mit anderen Sequenzfragmenten zum vollständigen Gen. Dazu wurden die Einzelsequenzen per Restriktionsverdau aus dem Vektor herausgeschnitten und in gewünschter Kombination ligiert und kloniert (Details s.u.).

Das Endprodukt wurde schließlich durch einen BamHI-HindIII-Verdau ausgeschnitten und in pQE 30 umklont. In der Regel wurden die Sequenzen der fertigen Konstrukte durch eine Sequenzierung kontrolliert.

Die Klonierung und Expression brachte es mit sich, daß alle Konstrukte N-terminal mit MRGSH₆GS... (dem HIS-Tag) gefolgt von der eigentlichen Sequenz beginnen. Das zweite GS stellt hierbei die BamHI Klonierungsschnittstelle dar.

3.6.1 *Stigmatella aurantiaca*

Alle Konstrukte dieser AC wurden vom Gen des Holoenzym *cyaB* angefertigt, das von O. Sismeiro (Institut Pasteur, Paris) dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurde. Es lag kloniert in der SacII Schnittstelle des pBluescript SK+ Vektors vor.

Es handelt sich um das Gen „SCYAB“ (NCBI Acc. No. AJ223795). Die codierende Region wird mit 872-1930 bp angegeben. Die NCBI Acc. No. CAA11548 gehört zum darin codierten Protein. Die bp Angaben der Klonierungen beziehen sich auf den Codonstart der SCYAB (*cyaB*) (Abb. 4-2).

3.6.1.1 Holoenzyme

cyaB

Das cyaB Holoenzym (4.1.1) wurde mit den Primern CyaB-Start-s und CyaB-stop-as (beide mit EcoRV) amplifiziert. Das erhaltene Produkt entsprach der erwarteten Größe von 1059 bp. Für die Umklonierung wurde das Fragment mit EcoRV herausgeschnitten und in den BamHI-HindIII geschnittenen, geblunteten und dephosphorylierten pQE30 kloniert. Die richtige Lage wurde durch Sequenzierung bestätigt.

cyaBV1 und cyaBM7

Das Gen SCYAB (s.o.) wurde zur Sequenzüberprüfung durch drei Restriktionsverdauere (Abb. 3-2) in überlappende Fragmente geschnitten. Diese wurden zur Sequenzierung in die EcoRV-Schnittstelle des pBluescript kloniert. Nach Sequenzierung zeigte die Ergebnisanalyse eine upstream verlängerte Sequenz mit zwei weiteren möglichen Starts (4.1.1). Diese verlängerten Holoenzyme wurden als cyaBV1 und cyaBM7 kloniert.

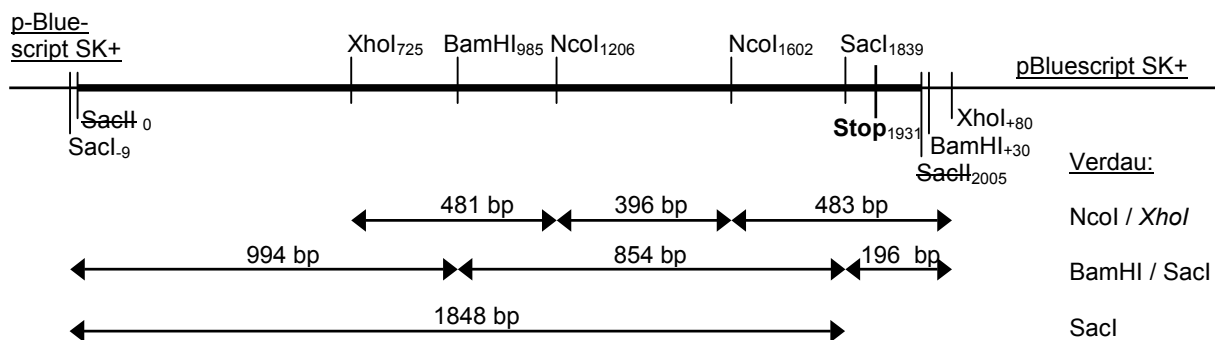


Abb. 3-2. Sequenzstückelung.

Für die Sequenzierung wurde das Gen in überlappende Bereiche geschnitten. Die oberste Linie stellt das Gen (stärkere Linie) mit den verwendeten Schnittstellen dar (darunter die für den Vektor). Das Gen ist in die ursprüngliche SacII-Schnittstelle des pBluescript SK+ (durchgestrichen, da nicht mehr existent) kloniert. Das Insert besetzt die Positionen 1-2004, so daß die Schnittstellenpositionen entsprechend dem Insert numeriert sind (Indexzahlen). Zur Übersicht wurde das Stopcodon markiert.

Die verlängerten Holoenzyme wurden für die Klonierung mit den Primern CyaB-Start-V-s, CyaB-Start-M2-s (beide KpnI) und CyaB-Stop-as (Sall) amplifiziert. Bei dieser Amplifizierung mußten die Bedingungen experimentell angepaßt werden. Für beide

Ansätze wurden statt 5 % DMSO 2,5 % Glycerol zugesetzt. *cyaBM7* benötigte für die PCR einen fünfschleifigen Vorlauf mit einer Annealingtemperatur von 62 °C für 2 min und einer Elongationszeit von 3 min, gefolgt von den restlichen 25 Schleifen mit 2 min Elongationszeit. Bei *cyaBV1* wurde wie oben verfahren, nur daß hier die Annealingtemperatur 56 °C betrug.

Die Umklonierung in den pQE30 erfolgte über die Schnittstellen *KpnI* und *Sall*.

3.6.1.2 Verkürzungen

Um das kleinste aktive Zentrum der *cyaB* zu finden, wurden vier N-terminale Verkürzungen hergestellt (4.1.2).

***cyaB* 6,7,8 und 9**

Für die Verkürzungen wurden folgende sense-Primer verwendet:

<i>cyaB6</i> :	<i>CyaB-FAR-s</i>	(mit F137)
<i>cyaB7</i> :	<i>CyaB-DTV-s</i>	(mit D154)
<i>cyaB8</i> :	<i>CyaB-GEK-s</i>	(mit G160)
<i>cyaB9</i> :	<i>CyaB-VTV-s</i>	(mit V165)

Als antisense-Primer fand *CyaB-as* Verwendung.

Bei der Klonierung in den pBluescript SK- wurden die Konstrukte ausgewählt, deren *HindIII*-Schnittstelle am 3'-Ende des Fragments lagen, damit die Umklonierung in den pQE 30 dann mit dieser und der primer-internen *BamHI*-Schnittstelle durchgeführt werden konnte (Abb. 3-3).

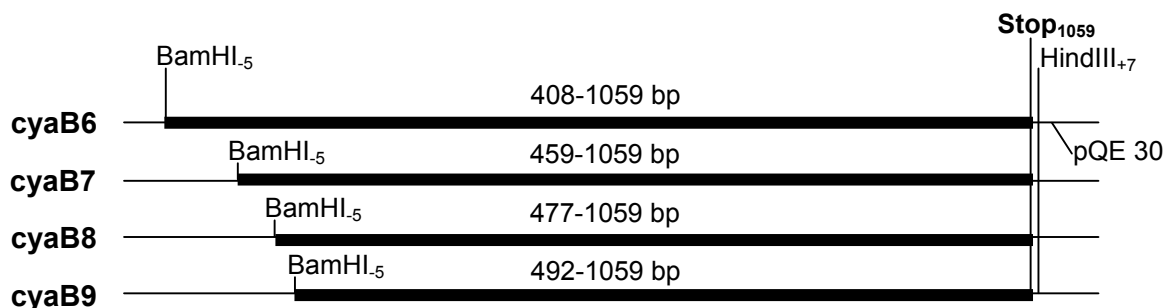


Abb. 3-3. Klonierungsschema der Verkürzungen im pQE 30.

Die starken Linien bezeichnen maßstabsgerecht die angegebene Länge der Konstrukte. Sie wurden jeweils über die gleichen Schnittstellen in den pQE 30 (dünne Linie) kloniert. Zur Orientierung ist der Stop eingezeichnet.

3.6.1.3 weitere Konstrukte

Um Hinweise auf Eigenschaften der paraAC bzw. deren Domänen zu finden, wurden verschiedene Konstrukte von *cyaB8* hergestellt (4.1.4). Bei *cyaB8* Δ P wurde eine AA im katalytischen Zentrum entfernt. Chimären mit den TPRs von Paramecium und Anabaena wurden hergestellt (Konstrukte *cyaB8E*/MparaTPR und *cyaB8-anaTPR*), und von PD. Dr. J. Linder wurde der N-terminale Bereich des katalytischen Zentrums gegen den von *cyaB* und paraAC ausgetauscht (PAX, SAX und anaAC) (4.1.4).

***cyaB8* Δ P**

Das Konstrukt wurde in zwei Teilen amplifiziert, die über die durch die Primer *CyaB-8* Δ P-s/-as neu eingeführte PinAI-Schnittstelle zusammengefügt wurden. Als Primerpaare wurden *CyaB-GEK-s* / *CyaB-8* Δ P-as und *CyaB-8* Δ P-s / *CyaB-Stop-as* (Sall) verwendet (Abb. 3-5).

cyaB8E-paraTPR* und *cyaB8M-paraTPR

cyaB8 wurde mit den Primern *CyaB-GEK-s* und *Stig-ParaE-TPR-as* bzw. *Stig-ParaM-TPR-as* amplifiziert. Der Paramecium TPR wurde als Klon „Fragment e+f“¹⁸ in pQE30 kloniert von A. Schultz zur Verfügung gestellt. Nach Herausschneiden des Fragments „e“ über einen BamHI-Sful Verdau wurde in diese Schnittstellen die *cyaB8* einkloniert (Abb. 3-5).

cyaB8-AnaTPR

Das *cyaB8*-Fragment für dieses Konstrukt wurde mit den Primern *CyaB-GEK-s* und *Stig-Ana-TPR-s* amplifiziert. Der Anabaena-TPR, kloniert in die XbaI-BamHI Schnittstellen des pBluescript SK-, wurde von PD Dr. J. Linder zur Verfügung gestellt. *cyaB8* wurde mit BamHI-XbaI, der TPR mit XbaI-HindIII ausgeschnitten und beide zusammen als Tripelligation in den BamHI-HindIII geschnittenen pBluescript SK- kloniert (Abb. 3-5).

PAX, SAX und anaAC

Die Klonierung der Paramecium-Anabaena- (PAX) und der Stigmatella-Anabaena-Chimäre (SAX) (4.1.4) wurde von A. Schultz durchgeführt (Abb. 3-4). Das paraAC- bzw. cyaB-Fragment wurde über die am 3'-Ende eingeführte MscI-Schnittstelle mit dem anaAC-Fragment über eine am dortigen 5'-Ende eingeführten SmaI-Schnittstelle zusammenklontiert, wodurch beide Schnittstellen zerstört wurden.

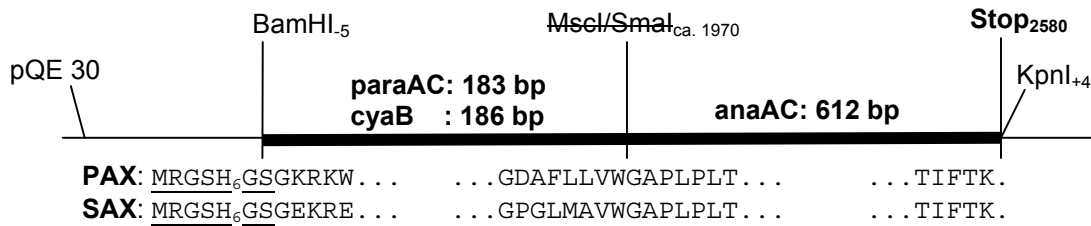


Abb. 3-4. Klonierungsüberblick für PAX und SAX.

Unter der Darstellung für das Konstrukt (dicke Linie) im pQE 30 (dünne Linie) ist zur Orientierung ein Proteinsequenzausschnitt angegeben. Die AAn des Vektors sind unterstrichen (anaAC = cyaB1₆₅₇₋₈₅₉). Schnittstellennumerierung für anaAC.

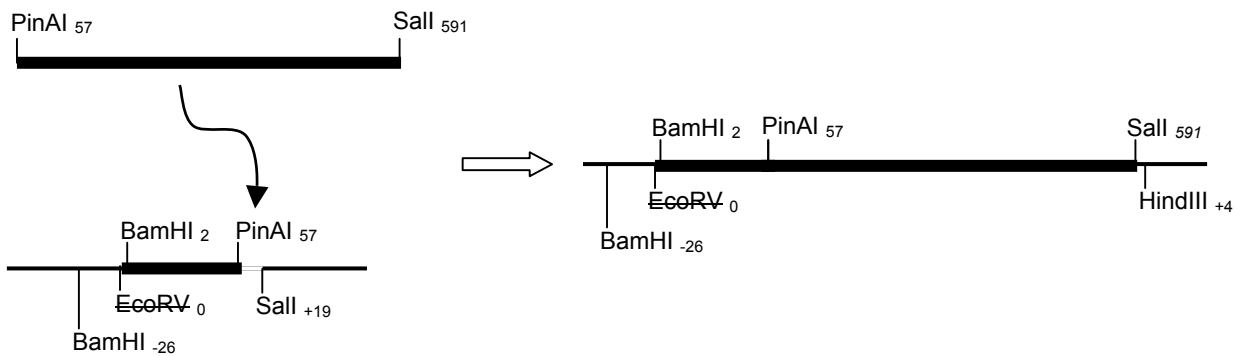
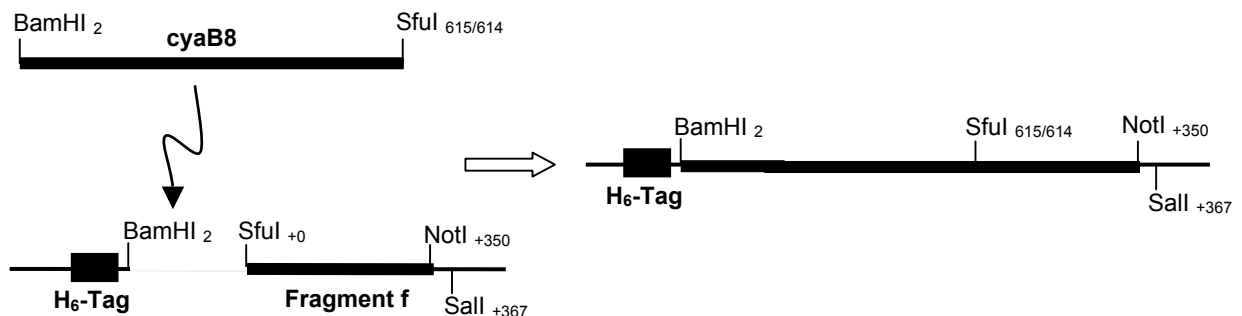
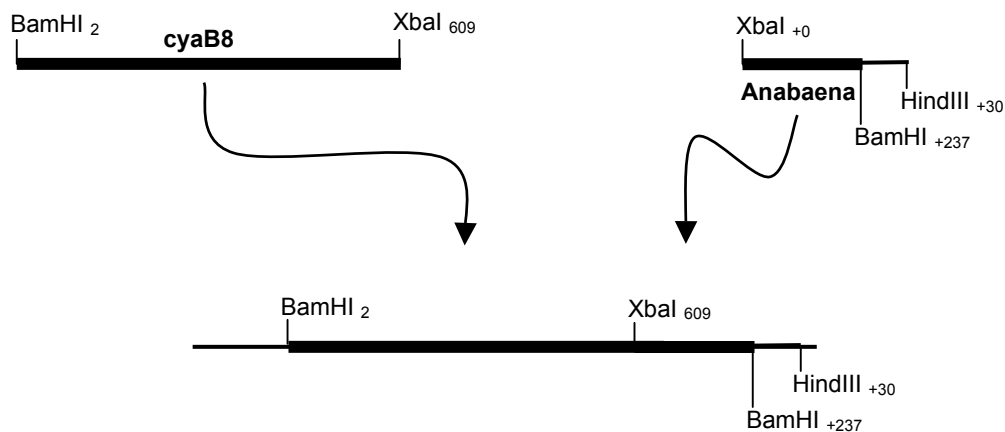
cyaB8ΔP (in pBluescript SK-):**cyaB8E/MparaTPR** (in pQE30):**cyaB8anaTPR** (in pBluescript SK-):

Abb. 3-5. Klonierungsschemata von *cyaB8ΔP*, *cyaB8-E/MparaTPR* und *cyaB8-anaTPR*.

Die stärkere Linie bezeichnet das jeweilige zu klonierende Fragment, während die dünne Linie den Vektor darstellt. Schnittstellen der Fragmente sind über dem Schema eingezeichnet, die für den Vektor darunter. Die Positionen beziehen sich auf das Holoenzym der Datenbanksequenz, die übrigen Schnittstellen sind relativ zu ihr beziffert (nicht maßstabsgerecht).

3.6.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Die DNA von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv wurde von Prof. Boettger, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

Viele Konstrukte wurden aus mehreren Fragmenten zusammengesetzt, die für jede Klonierung neu durchnummeriert werden.

3.6.2.1 Holoenzyme

Die Klonierung der Holoenzyme Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c und Rv3645 (4.2.1) erfolgte jeweils aus drei Fragmenten im pBluescript.

Da der antisense-Primer für das jeweilige Fragment 3 ohne integrierte Schnittstelle hinter dem Stopcodon lag, mußte die HindIII-Schnittstelle des pBluescript SK- am 3'-Ende dieses Fragments liegen. Diese wurde dann zur Umklonierung in den pQE 30 verwendet.

Das Fragment 3 war zugleich auch das katalytische Zentrum der jeweiligen mycobakteriellen AC (3.6.2.3 und 4.2.4.1).

Die sense-Primer des Fragments 1 von Rv1318c und Rv3645 enthalten eine BglII-Schnittstelle am 5'-Ende, da das jeweilige Gen BamHI-Schnittstellen in Fragment 1 und 2 enthält. BglII und BamHI sind kompatibel, werden aber beim Ligieren zerstört. Die Konstrukte werden nachfolgend einzeln besprochen.

Rv1318c

Für die PCR wurden die Primerpaare Rv1318c-Start-s und -KpnI-as (Fragment 1), Rv1318c-KpnI-s und -MfeI-as (Fragment 2) und Rv1318c-GEE-s und Rv1318c-as (Fragment 3) verwendet.

Die Fragmente 1 und 2 wurden mit einem BglII-KpnI bzw. KpnI-MfeI Verdau aus dem pBluescript ausgeschnitten. Mit einer Tripelligation (I) wurden sie dann vor Fragment 3 (im BamHI-MfeI geschnittenen und dephosphorylierten pBluescript SK-) kloniert (Abb. 3-6). Durch die Ligation der BglII- auf die BamHI-Schnittstelle wurden beide zerstört. Deswegen wurde Fragment 1 durch die folgenden Schritte erneuert.

Ein XbaI-KpnI Verdau (II) schnitt Fragment 1 und 2+3 (zusammenhängend) aus pBluescript heraus. Fragment 1 wurde neu (mit intakter BglII-Schnittstelle) mit XbaI-KpnI präpariert und in den ebenso geschnittenen pBluescript SK- kloniert (III). Fragment 2+3 wurde in einem letzten Schritt wieder hinter Fragment 1 in die KpnI-Schnittstelle einkloniert (IV).

Rv1319c

Die Fragmente für diese Klonierung wurden durch die Primer Rv1319c-Start-s, -EcoRV-as (Fragment 1), Rv1319c-EcoRV-s, -BspMI-as (Fragment 2) und Rv1319c-GED-s und Rv1319c-as (Fragment 3) gewonnen.

Fragment 2 wurde im pBluescript belassen, da beide internen Schnittstellen (EcoRV und BbrPI) blunt-cutter waren (die BspMI-Schnittstelle hatte versagt) (Abb. 3-7). Fragment 3 wurde mit einem BbrPI-HindIII-Verdau hinter Fragment 2 kloniert. Anschließend wurde Fragment 1 über einen BamHI-EcoRV-Verdau vor Fragment 2 einkloniert.

Die mitgeführte Sequenz zwischen den beiden BamHI-Schnittstellen des Vektors (nicht eingezeichnet) und des Konstrukts wurde durch BamHI-Verdau und anschließender Religation eliminiert.

Rv1320c

Ermöglicht wurde die Amplifizierung durch die Primer Rv1320c-Start-s, -SacII-as (Fragment 1), Rv1320c-SacII-s, -MfeI-as (Fragment 2) und Rv1320c-GEE-s und Rv1320c-as (Fragment 3).

Fragment 3 wurde beim BamHI-MfeI-Verdau im pBluescript SK- belassen. Die Fragmente 1 und 2 wurden mit einem BamHI-SacII- bzw. SacII-MfeI-Verdau ausgeschnitten und über eine Tripelligation vor Fragment 3 kloniert (Abb. 3-8).

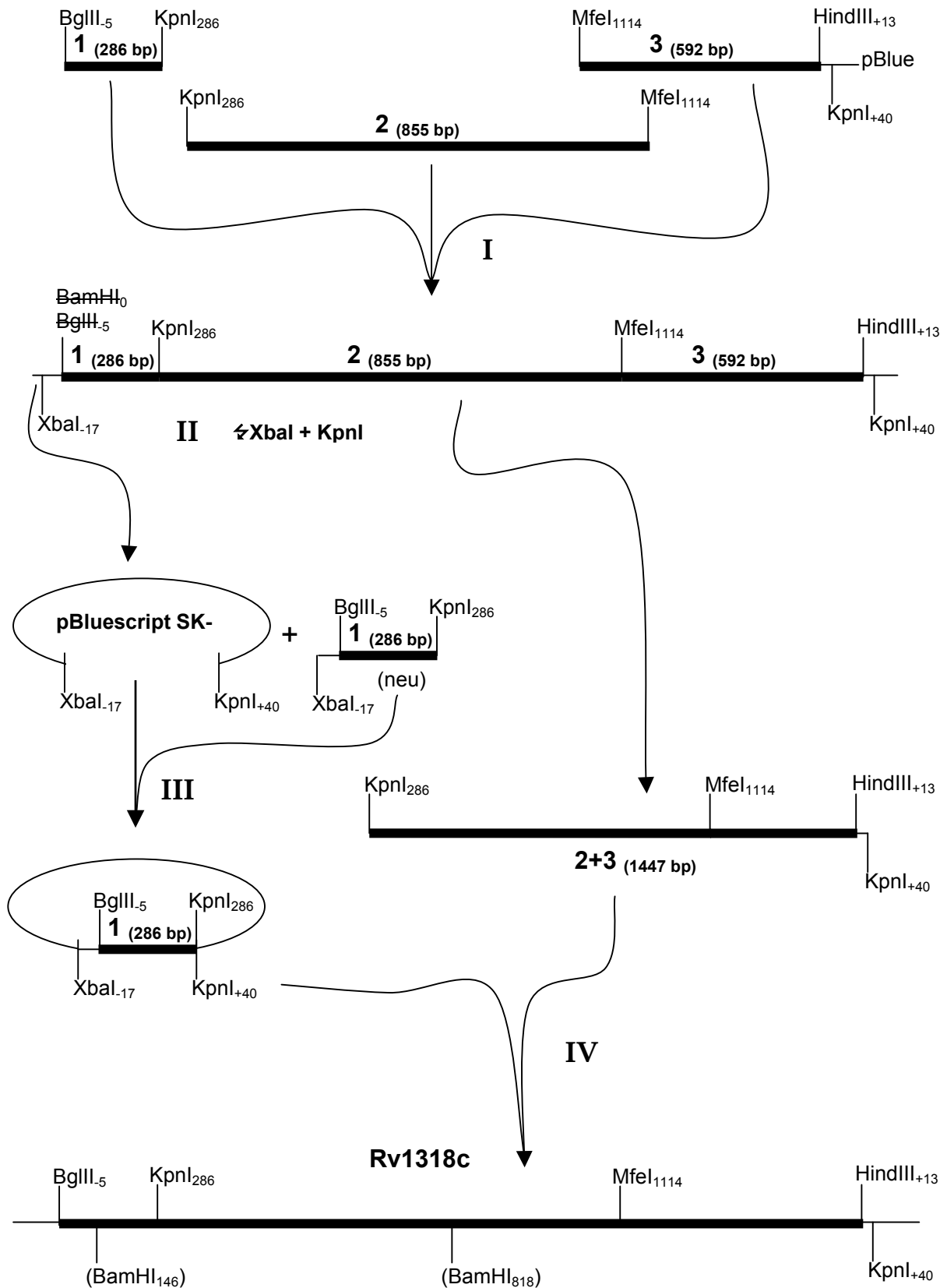


Abb. 3-6. Klonierungsschema von Rv1318c.

I Tripelligation der Fragmente 1 und 2 in pBluescript SK-, der Fragment 3 enthält. II-IV Ersetzen der zerstörten BglIII Schnittstelle. Die dünnen Linien stehen jeweils für den Vektor, die dicken für die Fragmente. Die Positionen der Schnittstellen beziehen sich auf die Konstruktsequenz.

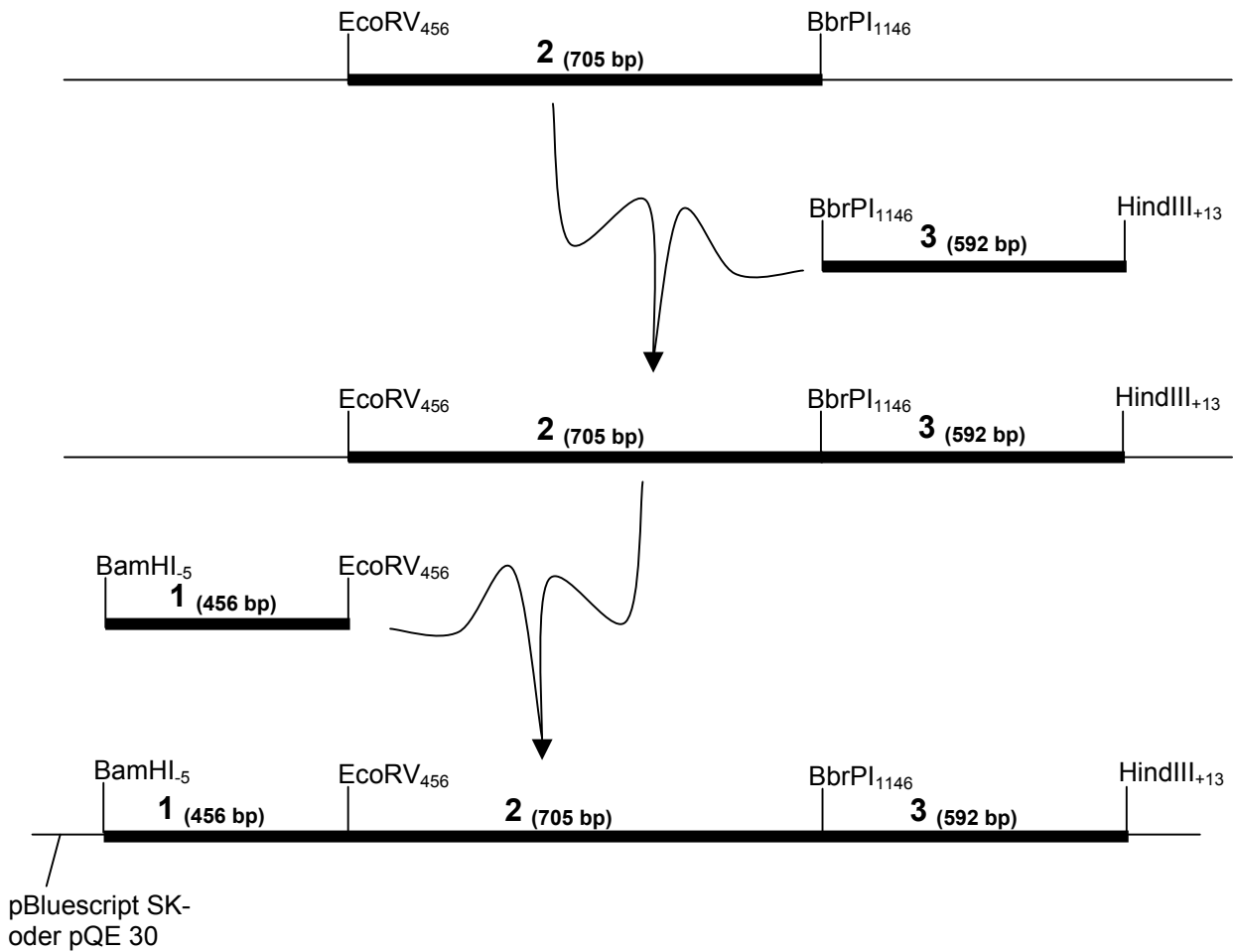


Abb. 3-7. Klonierungsschema von Rv1319c.

Die dünnen Linien geben den Vektor, die dicken die zu klonierende Sequenz wieder.

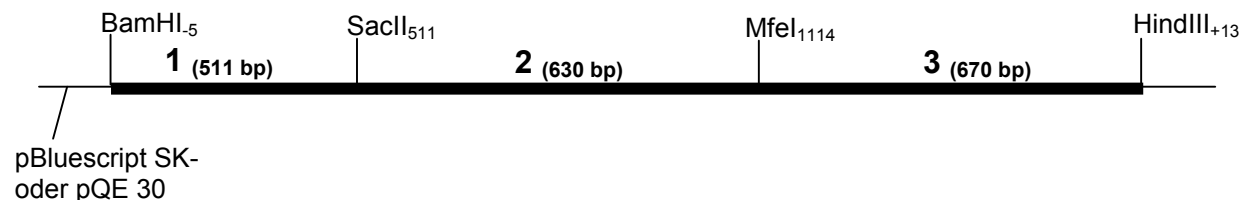


Abb. 3-8. Schnittstellen- und Fragmentverteilung von Rv1320c.

Zur Vereinfachung wird hier nur das fertige Produktschema gezeigt. Die dünne Linie repräsentiert den Vektor, die dicke die klonierte Sequenz.

Rv3645

Unter Verwendung der Primer Rv3645-Start-s, -PinAI-as (Fragment 1), Rv3645-PinAI-s*, -Styl-as (Fragment 2) und Rv3645-GQE-s und Rv3645-as (Fragment 3) wurden die einzelnen Fragmente amplifiziert.

Auch dieses Konstrukt war über eine Tripelligation zugänglich. Da auch hier interne BamHI-Schnittstellen enthalten waren, wurde Fragment 3 im pBluescript SK-belassen. Fragment 1 wurde mit einem XbaI-PinAI-Verdau, Fragment 2 mit einem PinAI-Styl-Verdau ausgeschnitten und in die XbaI-Styl-Schnittstelle vor Fragment 3 inkloniert (Abb. 3-9). Die Umsetzung in den pQE 30 fand über die BglIII-HindIII-Schnittstellen statt.

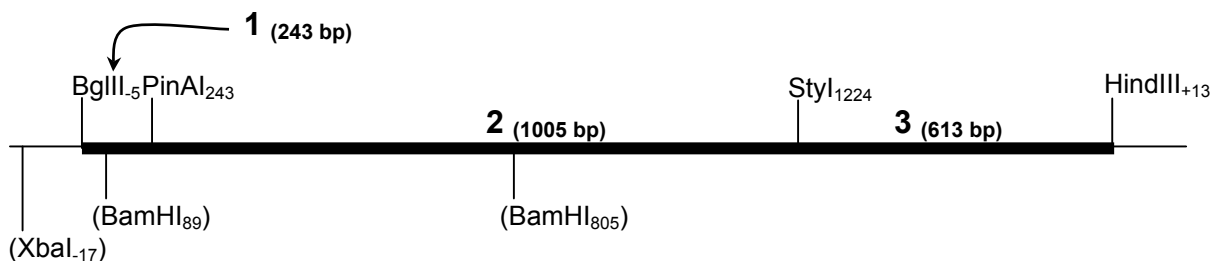


Abb. 3-9. Schnittstellen- und Fragmentverteilung von Rv3645.

Beschreibung wie bei Abb. 3-8.

3.6.2.2 Holoenzymmutationen

Zur Untersuchung des angesprochenen D/T Austausches im katalytischen Zentrum wurden die Konstrukte Rv3645T473A/D kloniert (4.2.2). Der Einfluß der hintereinandergehängten ACn wurde mit Rv1320c1319c und Rv1319c1318c untersucht (4.2.3). Mit den Konstrukten Rv1319c- und Rv3645mutHAMPHolo sollte der Einfluß der mutierten Domänen auf das Holoenzym beobachtet werden (4.2.5.3).

Rv3645T473A, Rv3645T473D

Zur Amplifizierung von Fragment 3 wurden die Primer Rv3645-GQE-s und Rv3645T473D/A-as verwendet. Für die Fragmente 4_A und 4_D wurde die gewünschte Mutation durch die Primer Rv3645T473A-s bzw. Rv3645T473D-s eingeführt. Als Gegenprimer diente Rv3645-as. Die Mutationsprimer führten zugleich die singuläre SfuI-Schnittstelle ein.

* Im Laborjournal auch mit Agel (Isoschizomer zu PinAI) bezeichnet.

Die Konstruktion verlief über ein Zusammenklonieren der Fragmente 4_A bzw. 4_D hinter Fragment 3 über die SfuI- und HindIII-Schnittstellen (I) (Abb. 3-10). Das entstandene Produkt wurde über einen StyI-HindIII-Verdau hinter die im pBluescript verbliebenen Fragmente 1 und 2 kloniert (II).

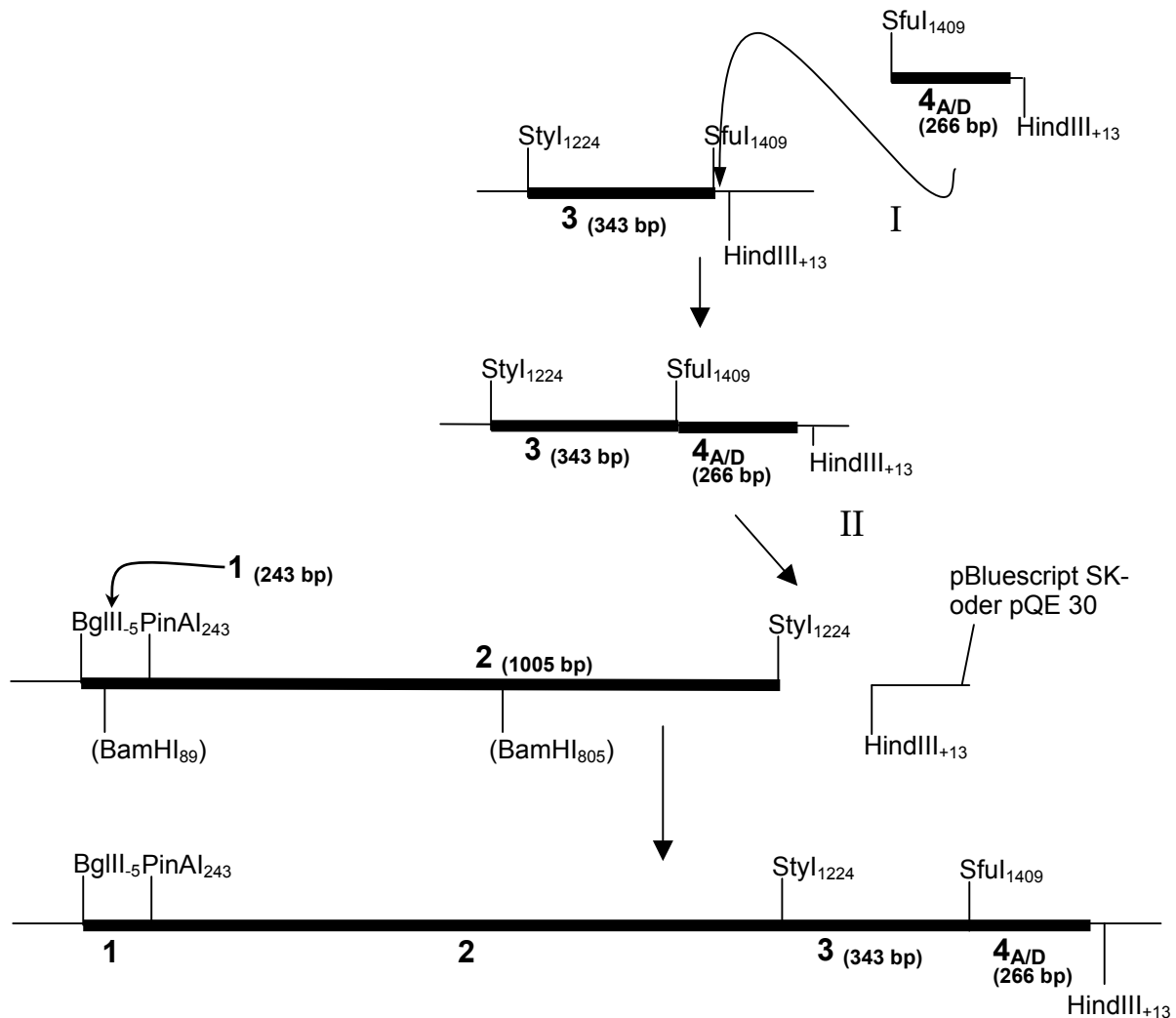


Abb. 3-10. Klonierungsschema von Rv3645T473A und Rv3645T473D.

Nach Klonierung der auszutauschenden Fragmente, werden diese in die Gesamtsequenz eingefügt (dünne Linie = pBluescript; dicke Linie = Konstrukt).

Rv1320c1319c

Die Fragmente 2 und 3 wurden mit den Primern Rv1320c-SacII-s und Rv1320c/19c-SacI-as bzw. Rv1320c/19c-SacI-s und Rv1319c-EcoRV-as amplifiziert. Diese wurden im pBluescript SK- über die Schnittstellen SacII, SacI und EcoRV zusammenkloniert (I) (Abb. 3-11). Das Holoenzymkonstrukt Rv1319c (s.o.) im pBluescript SK- wurde SacII-EcoRV geschnitten, so daß das obige Produkt vor Fragment 4 (den 3'-Rest von

Rv1319c) kloniert werden konnte (II). Abschließend wurde das resultierende Konstrukt 2+3+4 über einen SacII-HindIII-Verdau hinter Fragment 1 (5'-Anfang von Rv1320c) in den pQE 30 kloniert (III).

Rv1319c1318c

Die Amplifizierung wurde mit Hilfe der Primer Rv1319c-EcoRV-s und Rv1319c/18c-SacI-as für Fragment 2 und Rv1319c/18c-SacI-s und Rv1318c-KpnI-as für Fragment 3 durchgeführt. Die Fragmente 1 und 4 entsprachen den jeweils vorhandenen Restsequenzen der Holoenzyme Rv1319c und Rv1318c. Die Klonierung verlief entsprechend der von Rv1320c1319c mit den in Abb. 3-12 aufgeführten Schnittstellen. Unterschiedlich war, daß schon in Schritt II in den pQE 30 kloniert wurde und in Schritt III Fragment 1 mit seinem RGS_{H6}-Tag vor Fragment 2+3+4 gesetzt wurde.

Rv3645mutHAMPHolo, Rv1319cmutHAMPHolo

Mit den Primern Rv3645-Start-s und Rv3645mutHAMPHolo-as wurde Fragment 1, mit Rv3645mutHAMPHolo-s und Rv3645-HindIII-as Fragment 2 amplifiziert (für Konstrukte von Rv1319c entsprechend). Die Konstrukte waren für beide über eine Tripelligation zugänglich, die für Rv3645mutHAMPHolo gleich mit dem pQE 30 durchgeführt wurde (Abb. 3-13). Der Zusammenbau erfolgte über die silent eingefügte Sall- bzw. Sall-Schnittstelle, die Integration in den Vektor über die Schnittstellen BglII bzw. BamHI und HindIII.

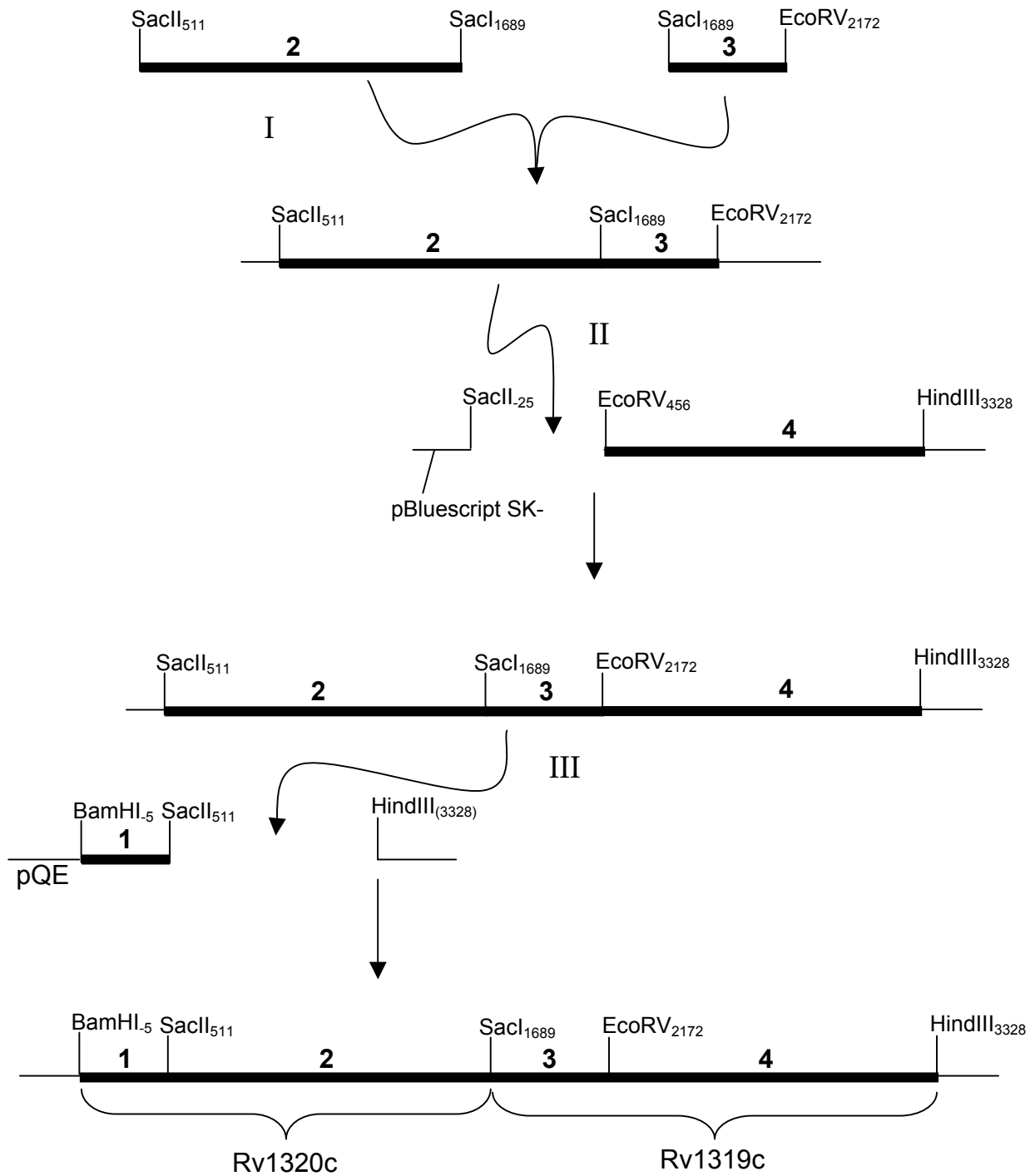


Abb. 3-11. Klonierungsschema von Rv1320c1319c.

Bei dieser Klonierung wurden nur der 3' Terminus von Rv1320c (mit herausmutiertem Stop) und der 5' Terminus von Rv1319c ausgetauscht und zusammenligiert. Die Numerierung bezieht sich auf den fertigen Gesamtklon (dünne Linie: Vektor, dicke Linie: Konstrukt).

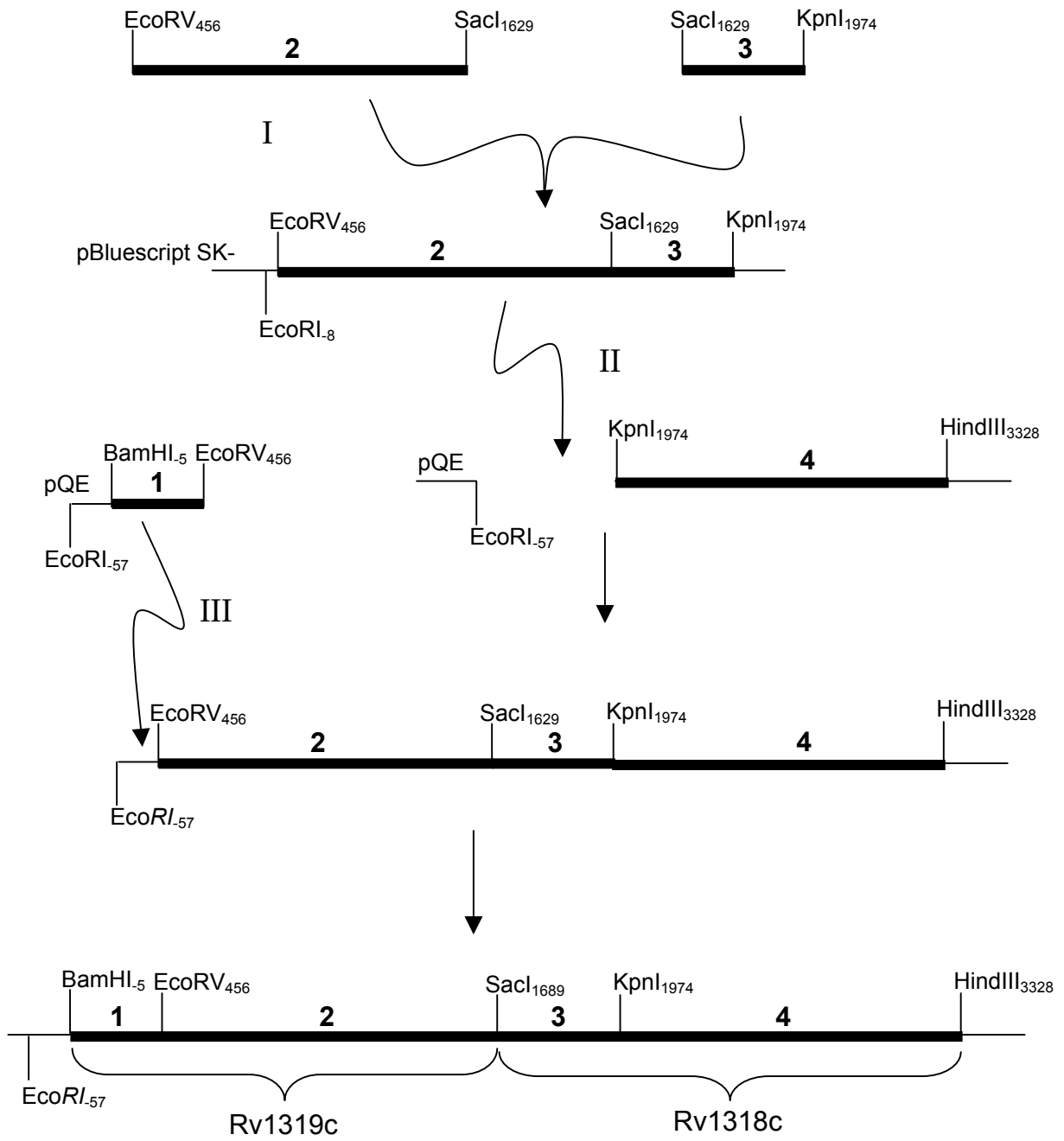


Abb. 3-12. Klonierungsschema von Rv1319c1318c.

Die Numerierung bezieht sich auf den Gesamtklon (dünne Linie: Vektor, dicke Linie: Konstrukt).

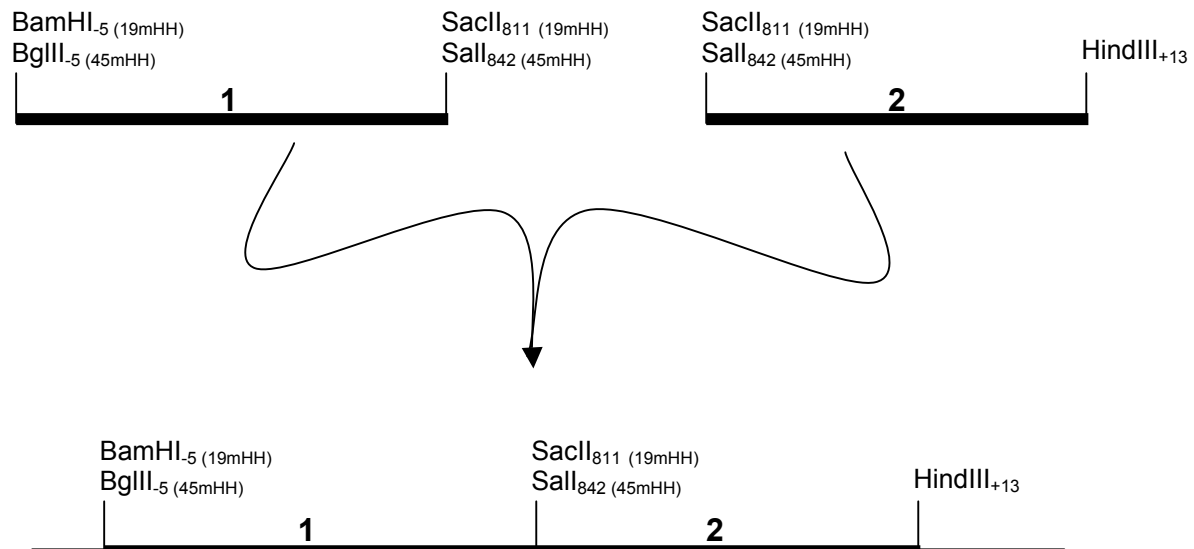


Abb. 3-13. Klonierungsschema Rv1319cmutHAMPHolo und Rv3645mutHAMPHolo.

Die Konstrukte unterscheiden sich nur in den Schnittstellen. 45mHH entspricht Rv3645mutHAMPHolo, für Rv1319c entsprechend (dünne Linie: Vektor, dicke Linie: Konstrukt).

3.6.2.3 katalytische Zentren

Rv1318ckat, Rv1319ckat, Rv1320ckat und Rv3645kat

Die katalytischen Zentren wurden auf die gleiche Art kloniert und werden deswegen zusammen besprochen. Sie wurden als ganzes amplifiziert und kloniert.

Die für die PCR verwendeten sense-Primer (Rv1318c-GEE-s, Rv1319c-GED-s, Rv1320c-GEE-s und Rv3645-GQE-s) enthalten am 5'-Ende alle ein Cytosin (C), das durch Ligation an das 3'-Ende einer geblunteten BamHI-Schnittstelle diese rekonstituiert (Abb. 3-14). In dieser Orientierung kann auch die am 3'-Ende des Fragments liegende HindIII des pBluescripts SK- zum Umklonieren in den pQE 30 verwendet werden. Die antisense-Primer sind jeweils Rv1318c-20c-as bzw. Rv3645-as. Die katalytischen Zentren entsprechen dabei dem jeweiligen Fragment 3 von 3.6.1.1.

BamHI

5'-Vektor...GGATCC...Primer-3'
3'-Vektor...CCTAGG...Primer-5'

Abb. 3-14. Rekonstitution der BamHI Schnittstelle.

Der BamHI Restriktionsverdau hinterläßt das kursiv markierte Ende seiner Erkennungssequenz mit ‚CTAG‘ als 5'-Überhang (sticky-end). Durch das bluten des Überhangs werden die unterstrichenen Basen hinzugefügt und eine unvollständige Schnittstelle mit glattem (blunt) Ende gebildet. Diese wird durch die Ligation des Cytosin (C) im Primer (sense; hier fett dargestellt) wieder komplettiert.

3.6.2.4 katalytische Zentren mit HAMP Domäne

Rv1319cHAMPkat, Rv3645HAMPkat

Diese Konstrukte wurden mit Hilfe der Primer Rv1319c-HAMP-s und Rv1319c-as bzw. Rv3645-HAMP-s und Rv3645-as als ganzes Konstrukt amplifiziert. Rv1319cHAMPkat wurde am 3'-Ende über die SacI-Schnittstelle (des pBluescript SK-) in den pQE 30 kloniert.

Rv1319cHAMP3645kat, Rv3645HAMP1319ckat

Fragment 1 wurde mit den Primern Rv1319cHAMP-s und Rv1319-HAMP-BglII-as, Fragment 2 mit Rv1319c-HAMP-BglII-s und Rv1319c-HindIII-as amplifiziert. Die Primer für Rv3645 heißen entsprechend. Die Zusammenführung der Fragmente erfolgte über die Einklonierung von Fragment 2 hinter 1 über eine BglII-Schnittstelle (Abb. 3-15). Für die Übergänge zum Vektor wurden die Schnittstellen BamHI und HindIII verwendet.

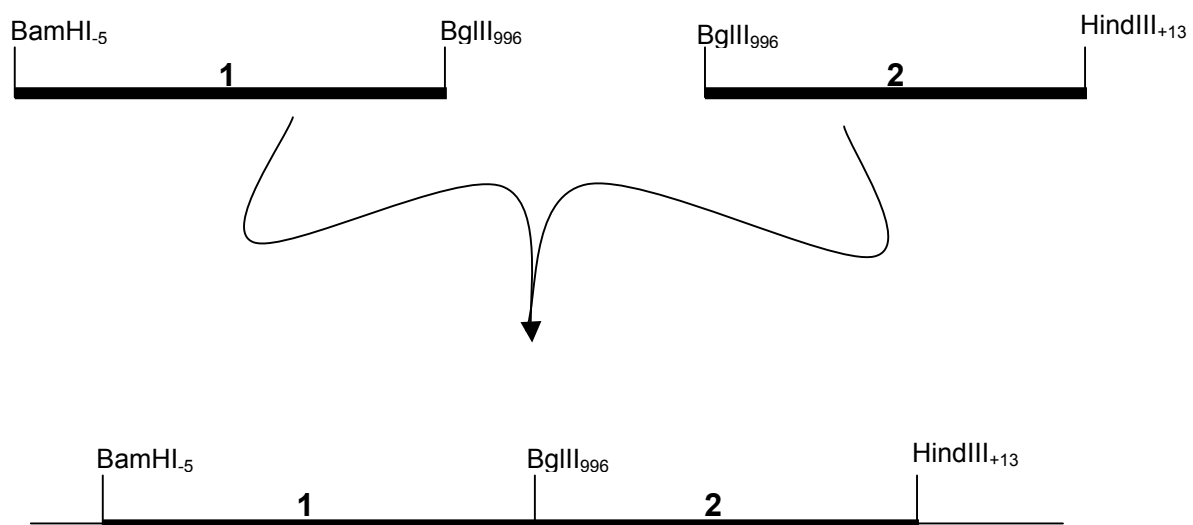


Abb. 3-15. Klonierungsschema für Rv1319cHAMP3645kat und Rv3645HAMP1319ckat.

Die Klonierung ist für beide Konstrukte gleich. Nach Gewinnung der Fragmente werden diese zusammenkloniert (dünne Linie: Vektor, dicke Linie: Konstrukt).

Rv1319cmutHAMPkat, Rv3645mutHAMPkat

Die Primer für Fragment 1 waren Rv1319cmutHAMP-s und Rv1319cmutHAMP-as bzw. Rv3645mutHAMP-s und Rv3645mutHAMP-as.

Die Klonierung verlief entsprechend Rv1319cHAMP3645kat (s.o.).

4 Ergebnisse

4.1 *Stigmatella aurantiaca*

4.1.1 *cyaB* Holoenzym

Das Holoenzym *cyaB* wurde mit dem prognostizierten Start „VLQGHH...“ kloniert¹⁹, wobei V (GTG) gegen ein M (ATG) ausgetauscht wurde (vgl. Abb. 4-2).

Das SDS-PAGE-Gel zeigte im Überstand eine verdickte Bande mit der erwarteten Größe von 41 kDa. Im Niederschlag fand sich keine entsprechende Bande. Die gefundenen Aktivitäten der *cyaB* entsprachen denen des pQE. Das Protein war demnach inaktiv.

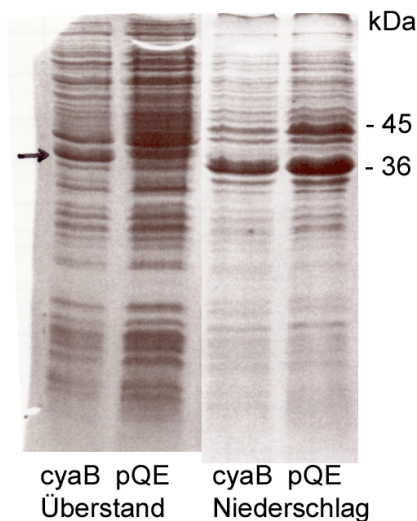


Abb. 4-1. SDS-PAGE-Gel, 15 %.

Die Expression von *cyaB* war im Überstand als zusätzliche Bande gegen den pQE bei ca. 41 kDa zu erkennen (Pfeil). Aufgetragen wurden je ca. 30 µg (*cyaB*) und 45 µg (pQE).

Spätere Verkürzungen (4.1.2) zeigten allerdings Aktivität. Um die Ursache dafür zu finden, wurde die Nucleotidsequenz untersucht.

Durch drei Restriktionsverdauungen (NcoI-XhoI, BamHI-SacI und SacI) wurden verschieden lange Fragmente erhalten, deren Sequenz sich überlappte (Abb. 3-2). Nach Sequenzierung wurden gegenüber der Datenbanksequenz drei Abweichungen gefunden. Zwei Basen (G-545 und G-228) waren zusätzlich zur Genbanksequenz eingebaut, eine Base (C-394) fehlte (Numerierung relativ zum *cyaB* Gen; negative Bezifferung: Basen vor dem prognostizierten Start). Darüber hinaus gab es einen Basenaustausch (C487G), der zum Aminosäureaustausch P163R (Abb. 4-2) führte. Die gefundenen Insertionen lagen vor dem prognostizierten Start, so daß die

Ergebnisse

mögliche N-terminal Region betroffen war, die Cyclasedomäne selbst dagegen nicht. Durch die Änderungen ergab sich ein um 426 bp bzw. 142 AAn verlängertes Protein.

In der N-terminalen Verlängerung befanden sich zwei mögliche Startpunkte. Da bei Bakterien sowohl ‚ATG‘ als auch ‚GTG‘ für ein fMet kodieren können, kommen hier V-142 und M-136 als Start in Frage.

	bp
G-545 ACCCTGGGCCCCCAAGGGCCCTCAACCGGGGGCCTGCCGGGTTGGCCCTCACTCTCGGCTCACCAGGA	-495
T L G P P K G P Q P G A C R V G P H S R L T R	-166
GTGGGCCCTGGGGTACGATTCACTCCATCTGGGCCCTTTCCGGAAGATCCGGGGTTTCCTCCCGG V-142	-425
S G P P G V R F T P S G P F P E D P G V S S R V	-142
M-136 ΔC-349 G GTAAAGCTTGACTCG A TGAGTTCTCCAGCCCCCTTTCGGCGACCTTCTCCTCAAGCTGGGCATCGTC	-355
V K L D S M S S S S P L F G D L L L K L G I V	-119
ACGCCAGTCAGGTCCAAGAGGGCGCTCGCGCTGCAGCCCCGCACGGGGCAGCGTGTGGGCGAGGCACTCA	-285
T P S Q V Q E A L A L Q P R T G Q R V G E A L	-96
TCTCCCTGGGCTACGTACCCGGGCGCAGCTCCACGACCGCTGAGCGAGGCGCTGGGGCTCAACCACGA	-215
I S L G Y V T R A Q L H D A L S E A L G L N H D	-72
CAAGGGCCCCGCGCACCCGCCCTGGGCGAACTGCTGGTGGGCTGAAGTACATCACCCCTGGGACAGCTC	-145
K G P A H P P L G E L L V G L K Y I T L G Q L	-49
GAGGAGGCGCTCGCCTTCCAGCGCAAGGATGGGCGCAAGCTGGGCGAAATCCTGGTGGAGATGGGCCACT	-75
E E A L A F Q R K D G R K L G E I L V E M G H	-26
GCACCTACCGGCAGATCTACGAGGCGTTAAGCCTCCAGGGCCGCATACCCGGGCGCCAGGAGGCCCTCG	-5
C T Y R Q I Y E A L S L Q G R I T G R Q E A P R	-2
¹ CCAG GTG CTCCAGGGCCACCACCGGTGATGGTGGTGGATGACAGCCCGCTGGCCTGCGACTTCGTGAAG	65
Q V L Q G H H R V M V V D D S P L A C D F V K	22
_{-1 1}	
GAGGGGCTGGAGGCGCTGGGGCTGGGCTACGAGGTGATGTGCTTCCAGGATCCCTACGAGGCGCTGGAGC	135
E G L E A L G L G Y E V M C F Q D P Y E A L E	45
AGGTGGGCAAGGTGCAGCCGGCCATCGTGCTGTCCGACCTGGACATGCCGGGCATCGACGGGTTGGAGCT	205
Q V G K V Q P A I V L S D L D M P G I D G L E L	69
GTGCTGGCGGCTGAAGGAGAGCCCTTCCCGCAGGTGCCCCGCATCATCCTCACGGCCAATGACAGCGAG	275
C W R L K E S P S R Q V P V I I L T A N D S E	92
GCCGAGCGCGTGAAGGGCCTGCGCGCCGGCGCGGATGACTACGTGAACAAGTCGGCCTCCATGGCCGAGC	345
A E R V K G L R A G A D D Y V N K S A S M A E	115
TGTCGGCGCGCATCGAGAGCGTCATGCGCCGACGAGCGAGACGGAGCGCATGCGCAAGCTGTTTCGCGCG	415
L S A R I E S V M R R T S E T E R M R K L F A R	139
<i>cyaB6</i>	
CTACACGTCCGACGCGGTGGTGGAGGAGATTCTCAAGAGCCCGACACGGTGGTGTCTACCCGGCGAGAAG	485
Y T S D A V V E E I L K S P D T V V L T G E K	162
<i>cyaB7</i> <i>cyaB8</i>	
C487G CGCGAGGTGACGGTGTCTTTCGCGGACATCCGCAACTTTCACGGGCTTGGCCGAGAGCCTCCCCCGAGC	555
R E V T V L F A D I R N F T G L A E S L P P E	185
<i>cyaB9</i>	

```

AGGTGGTGGGTGTGCTGAACCAGGTGCTCGGGCGGCTGTCTGGACGCGGTGCTCACCTGCGGGGGCACGCT 625
Q V V G V L N Q V L G R L S D A V L T C G G T L 209

GGACAAGTTCCTCGGGGACGGGCTGATGGCGGTGTGGGGTGCGCCAGTGCACCGCACGGATGACGCGCTG 695
D K F L G D G L M A V W G A P V H R T D D A L 232

CGGGCGCTCCAGGCCGCGAAGATGATGATGACGGCCATGGTGGAGCTGCGCCAGGCCGCTCAGGCCGAGT 765
R A L Q A A K M M M T A M V E L R Q A A Q A E 255

GGGCCGCCAACGAGCGGCTGGGCCGCGCCGCTGGTGTCTGGAGCTGGGCATCGGCATCAACTCGGGGCTGGC 835
W A A N E R L G R P L V L E L G I G I N S G L A 279

GGTGGCCGGCAACATCGGCGGCTCCATGCGCACCGAGTACACGTGCATTGGCGACGCGGTGAACGTGGCC 905
V A G N I G G S M R T E Y T C I G D A V N V A 302

GCGCGGCTGTGCGCCCTGGCGGGCCCCGGGGAAATCCTGGCGGGCGAGCGGACGCGGGAGCTCGTCTCGC 975
A R L C A L A G P G E I L A G E R T R E L V S 325

ACCGGGAGATGCCTTTTCGAGGACTTGCCTCCGGTGC GGCTCAAGGGCAAACAGCAGCCCGTGCCGCTCTA 1045
H R E M P F E D L P P V R L K G K Q Q P V P L Y 349

CCGCGTGTGTGA 1058
R V L . 352
    
```

Abb. 4-2. mit Vorseite: Sequenz der N-terminal verlängerten *cyaB*.

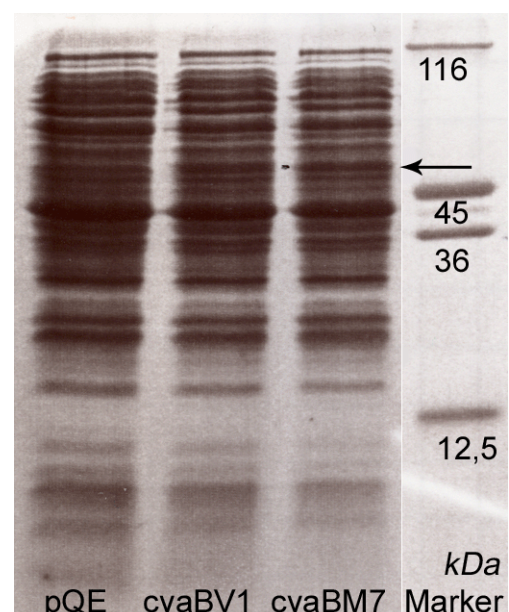
Die jeweils obere Reihe gibt die Nucleotidsequenz wieder, darunter die Aminosäuresequenz. Rechts davon stehen die Basen- bzw. Aminosäurezählungen (fett). Hier ist zu beachten, daß der Start (1) (invers) in Übereinstimmung mit der Datenbanksequenz P40138 (SWISSPROT) innerhalb der Sequenz beginnt, da die N-terminale Verlängerung in dieser Arbeit gefunden wurde!

Die Nucleotidinsertionen bzw. -deletionen sind hellgrau unterlegt (C-394 war deletiert, G-545 und G-228 inseriert). Die zusätzlichen Starts sind dunkelgrau und der Basen- bzw. Aminosäureaustausch C487G → P163R hellgrau abgehoben. Die N-termini der verkürzten Konstrukte (4.1.2) sind fett und unterstrichen mit den jeweiligen Konstruktamen darunter.

Die verlängerten Holoenzyme wurden als *cyaBV1* und *cyaBM7* kloniert (3.6.1.1). Das SDS-PAGE-Gel zeigt eine Expression der verlängerten Enzyme bei 55 kDa (Abb. 4-3).

Der AC-Test des Überstands ergab keine Aktivität für *cyaBV1* und *cyaBM7*.

Abb. 4-3. SDS-PAGE-Gel (15 %) der Überstände. *cyaBV1* und *cyaBM7* sind als etwas verdickte Banden auf Höhe der erwarteten Größe von 55 kDa zu erkennen (Pfeil).



Protein [µg]:	~45	~35	~35
Aktivitäten [pmol/(mg*min)]:	22	31	35

4.1.2 *cyaB* Verkürzungen

Da das Holoenzym keine Aktivität zeigte, trat die Frage auf, ob die katalytische Domäne allein aktiv war. Dazu wurden vier N-terminal verkürzte Konstrukte hergestellt.

Die Konstrukte wurden als *cyaB6* (ab 137FAR), *cyaB7* (ab 154DTV), *cyaB8* (ab 160 GEK) und *cyaB9* (ab 165VTV) kloniert. C-terminal endete ihre Sequenz immer mit dem üblichen Stop (Abb. 4-2).

Nach Klonierung wurden die Konstrukte exprimiert und das Zellhomogenat in Überstand und Niederschlag getrennt. Im SDS-PAGE-Gel sind alle Proteine je nach Größe gestaffelt sichtbar (Abb. 4-4). Die entsprechende Bande für *cyaB9* taucht im Überstand nicht auf, d.h. sie wurde wahrscheinlich nicht löslich exprimiert, was auch die geringe Gesamtproteinmenge wiedergibt.

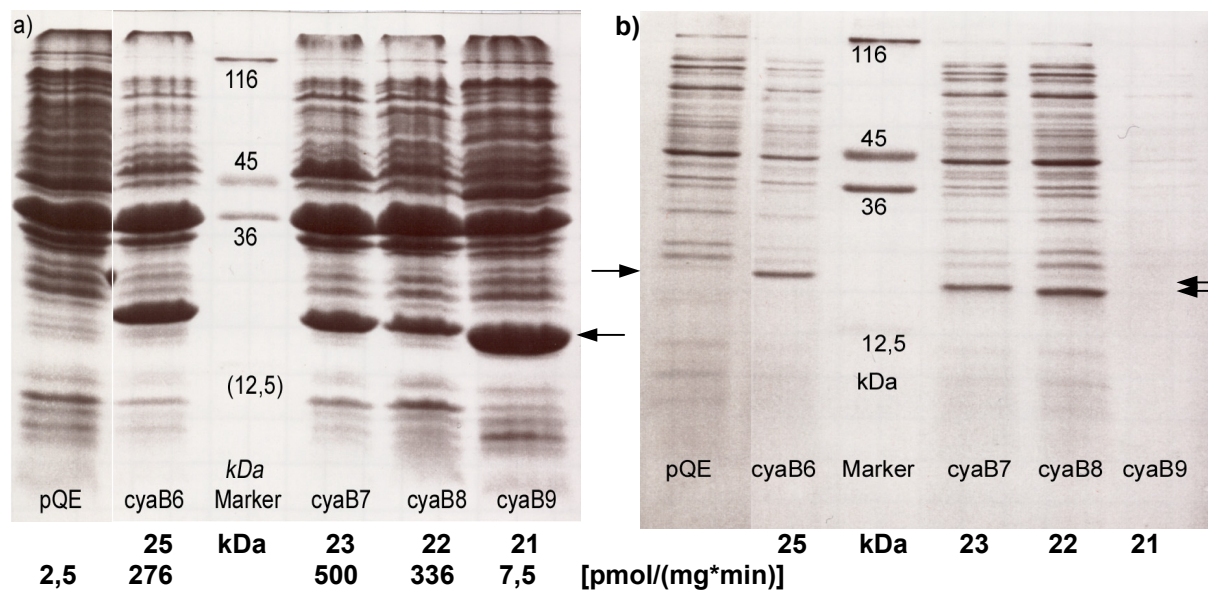


Abb. 4-4. SDS-PAGE-Gele (15 %) der Konstrukte *cyaB6* bis 9 und pQE.

Das Gel zeigt die exprimierten Proteine a) in den Niederschlägen und b) im Überstand. Aufgetragen wurden jeweils mit 5 μ l (ca. 40 μ g, Niederschläge) und 2 μ l (0,35 bis 4 μ g, Überstand). Die Banden für *cyaB6* bis 8 traten in beiden Gelen deutlich zutage (Pfeile). *cyaB9* war nur im Niederschlag zu erkennen (Pfeil). Unterhalb der Gele sind die erwarteten Größen und die gemessenen Aktivitäten aufgeführt.

Die Aktivitäten der löslichen Enzyme zeigen die höchste Aktivität für *cyaB7* (500), gefolgt von *cyaB8* (336) und *cyaB6* (276 [pmol/(mg*min)]) (Abb. 4-4). *cyaB9* hatte nur die dreifache Leervektoraktivität, was 2 % der Aktivität von *cyaB7* entspricht. Bezogen auf die geringe lösliche Proteinmenge weist dies auf eine mögliche hohe Aktivität hin.

Die Reinigung von cyaB7 und cyaB8 brachte einen deutlichen Aktivitätszuwachs: cyaB7 21,5 nmol/(mg*min) und cyaB8 9,4 nmol/(mg*min). Das SDS-PAGE-Gel zeigte eine gute Reinigbarkeit.

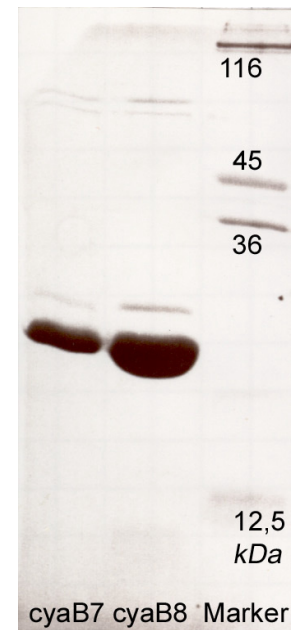


Abb. 4-5. SDS-PAGE-Gel (15 %) von cyaB7 und cyaB8.
Unter dem Gel sind die aufgetragene Proteinmenge und die gemessenen Aktivitäten angegeben.

	2,5 µg	5 µg
[nmol/(mg*min)]:	21,5	9,4

4.1.3 cyaB8 Charakterisierung

Obwohl cyaB7 die aktivste Verkürzung war, wurde die weitere Charakterisierung mit cyaB8 durchgeführt, da sie die kleinste lösliche aktive Form der AC darstellte.

Sofern nichts anderes ausgeführt wird, wurden 2 µg \approx 0,9 µM gereinigtes Protein 10 min bei 30 °C mit 2 mM Mn^{2+} und 100 µM ATP bei pH 7,5 vermessen. Die Reinheit des Enzyms entsprach Abb. 4-5.

4.1.3.1 Kinetik

Die Kinetik wurde mehrmals bestimmt, wobei starke Schwankungen auftraten. Es sind die Mittelwerte aller Messungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte (SEM; 7.3) aufgetragen. Daraus wurden die kinetischen Parameter mit Hilfe der Lineweaver-Burk Auftragung bestimmt: $v_{max} = 19$ nmol/(mg*min), $K_M = 27$ µM ATP. Die katalytische Effizienz (7.4) betrug: $k_{cat}/K_M = 93$ s⁻¹M⁻¹.

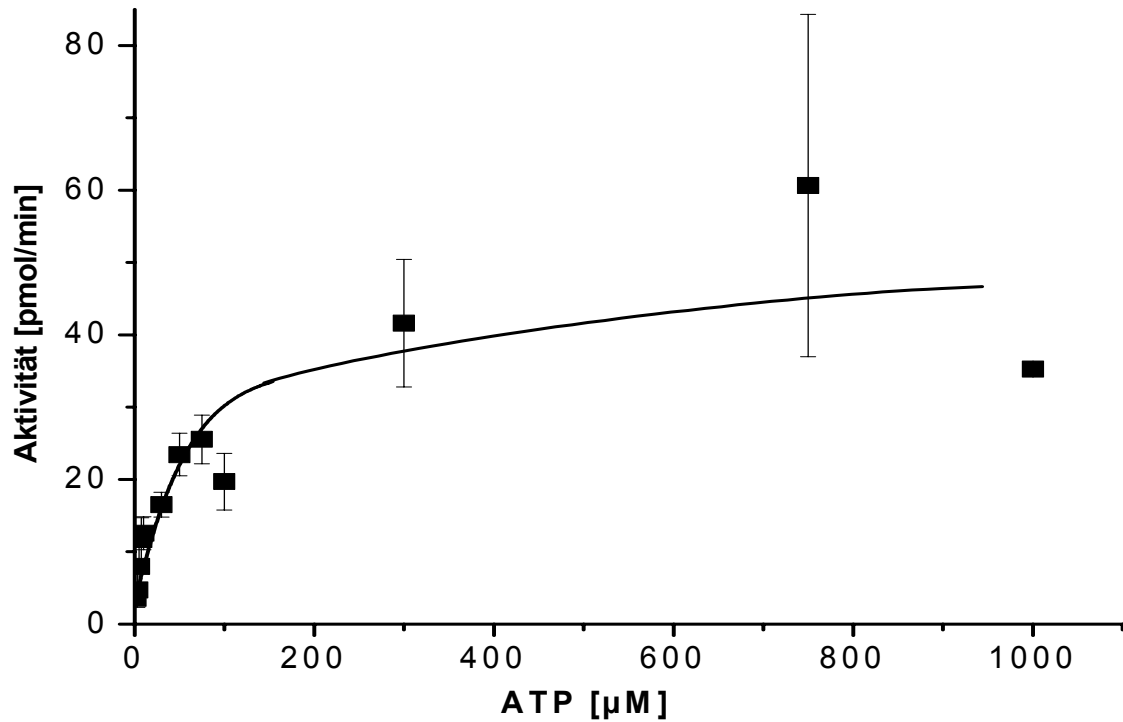


Abb. 4-6. Michaelis-Menten Auftragung der kinetischen Meßwerte.

Datenpunkte \pm SEM (n=2-4). Der SEM des Wertes bei 1000 μ M ist 0,15 (n=2).

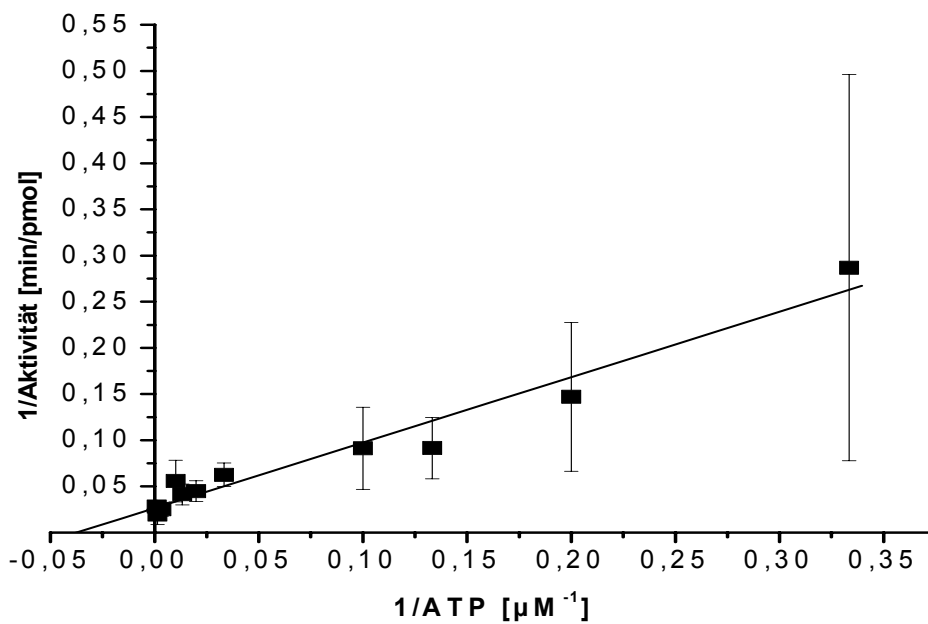


Abb. 4-7. Lineweaver-Burk Auftragung der Kinetik von Abb. 4-6 mit Standardabweichungen.

Es wurden nur Werte ab 3 μ M ATP berücksichtigt (n=2-4).

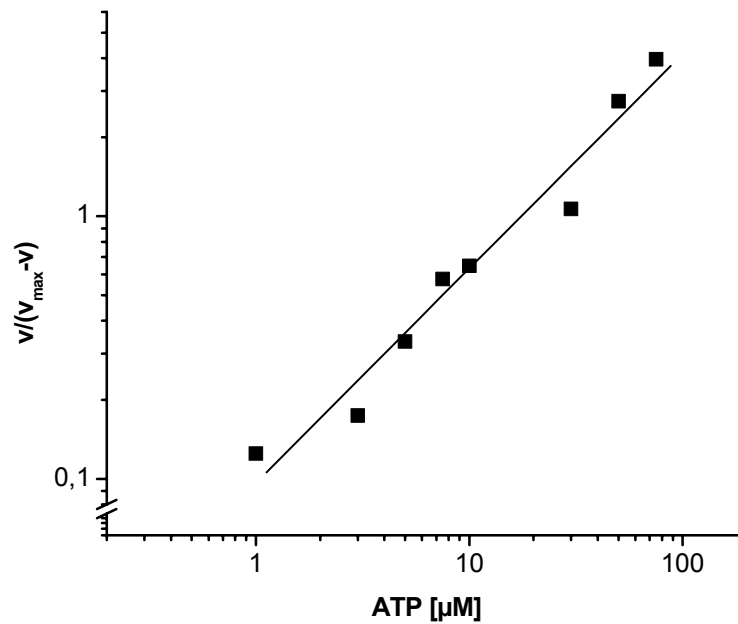


Abb. 4-8. Hill Plot von cybB8.
Korrelationskoeffizient: $R = 0,98141$.

Die Steigung der Ausgleichsgeraden nach Hill mit $m = 0,82$ zeigte für cybB8 eine leichte negative Kooperativität.

4.1.3.2 Temperaturoptimum

Die Aktivität wurde von 5-80 °C vermessen, die Aktivierungsenergie wurde im linearen Teil des Arrhenius-Diagramms mit $E_A = 100$ kJ/mol bestimmt (Abb. 4-9).

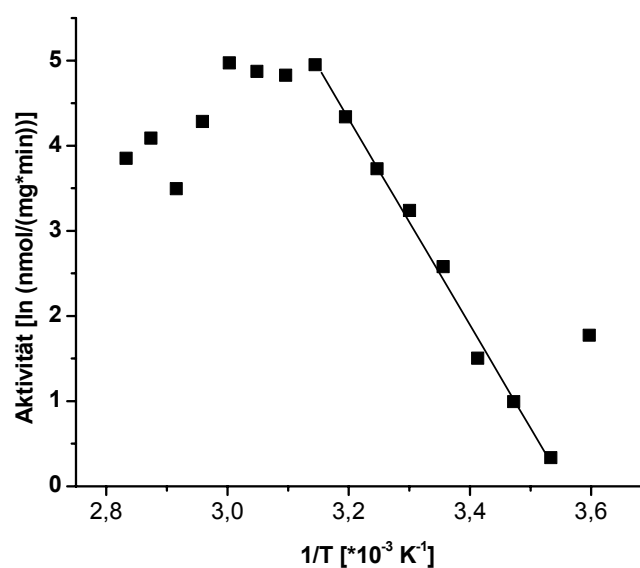


Abb. 4-9. Arrhenius Auftragung für die Temperaturmessung von cybB8.

Das Plateau der maximalen Aktivität erstreckt sich von 45 – 60 °C. Die Linearisierung erfolgte von 10 bis 45 °C.

4.1.3.3 pH-Optimum

Das pH Optimum wurde mit folgenden 50 mM Puffern vermessen:

Puffer	pH Bereich
Acetat	4,0 – 5,5
MES	5,5 – 6,5
Tris / HCl	7,0 – 8,5
Glycin / NaOH	9,0 – 10,0

Aktivität wurde erst ab pH 6 gefunden (Abb. 4-10). Das pH Optimum lag bei pH 10 in Glycin/NaOH-Puffer. Die Anfangsaktivität lag hier schon ca. 3 mal höher als im vorhergehenden pH-Bereich. Ein Puffereffekt kann nicht ausgeschlossen werden.

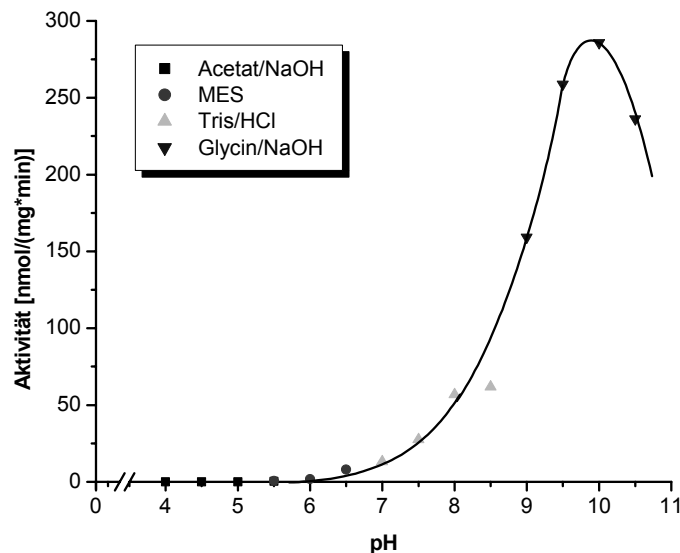


Abb. 4-10. Auftragung der Aktivität gegen den pH.

4.1.3.4 Cofaktoren

Für Mg^{2+} und Mn^{2+} wurde die Konzentrationsabhängigkeit bestimmt (Mg^{2+} bis 15 mM; Mn^{2+} bis 5 mM). Der Nullwert wurde mit 1 mM EDTA gemessen. Die kleinste Konzentration, bei der sich maximale Aktivität zeigte, war 5 mM Mg^{2+} bzw. 0,3 mM Mn^{2+} (Abb. 4-11). Mit Mn^{2+} als Cofaktor ließen sich doppelt so hohe Aktivitäten wie mit Mg^{2+} erreichen. Die üblich eingesetzten 2 mM Mn^{2+} lagen demnach im Sättigungsbereich für die gegebenen Bedingungen.

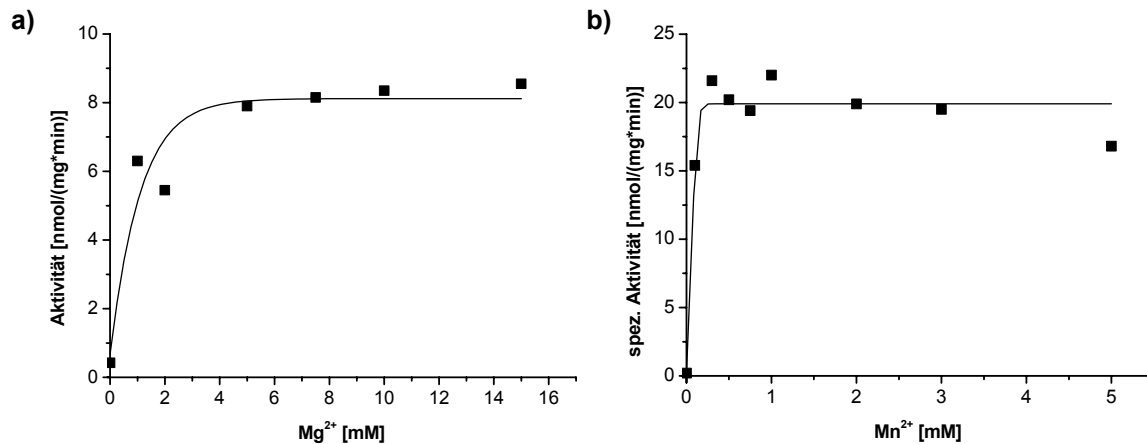


Abb. 4-11. Darstellung der Aktivität von *cybB8* gegen die Cofaktor-Konzentration.

a) Mg²⁺ (n=2), b) Mn²⁺ (n=1), man beachte die unterschiedlichen Maßstäbe.

4.1.3.5 Proteinabhängigkeit

Bestimmte man die Proteinabhängigkeit von *cybB8* in einem Bereich von 0 bis 2,5 μ M, so zeigte sich, daß über 0,5 μ M hinaus die Aktivität abfiel (Abb. 4-12). Dies deutet vielleicht auf die Bildung inaktiver Multimere hin. Frisch gereinigtes Protein zeigte keinen Aktivitätsabfall, hatte demgegenüber aber nur 6 % Aktivität. Der maximale ATP-Umsatz betrug 10 bzw. 16 %.

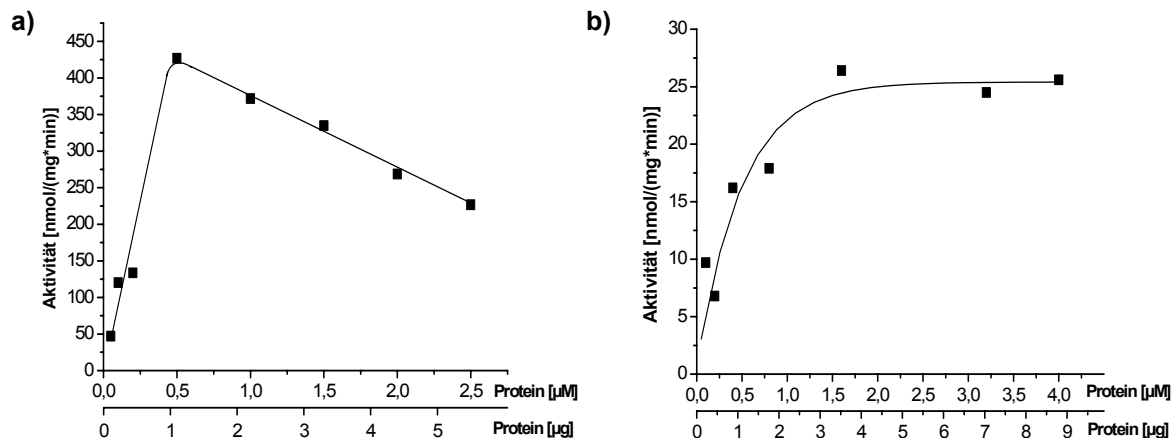


Abb. 4-12. Abhängigkeit der Aktivität von der Proteinmenge.

a) nach 14 Tagen Lagerung bei -20°C mit 20 % Glycerin (ATP 500 μ M), b) frisch gereinigt, ohne Glycerol (ATP 75 μ M). Man beachte die unterschiedlichen Maßstäbe.

4.1.3.6 Zeitabhängigkeit

Die Menge an gebildetem cAMP stieg bis 15 min linear an. Danach sank die Substratkonzentration soweit, daß nicht mehr alle katalytischen Zentren gesättigt und die Bedingungen der Anfangsgeschwindigkeit nicht mehr erfüllt waren.

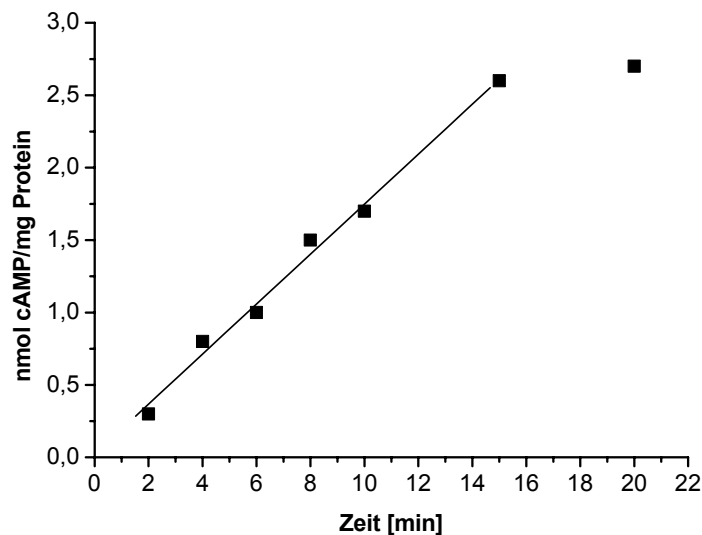


Abb. 4-13. Darstellung der Zeitabhängigkeit.
(ATP 100 μ M, Protein 0,9 μ M (2 μ g), n=1)

4.1.3.7 Stabilität

cyaB8 ist bei 4 °C mit 20% Glycerol stabil (Abb. 4-14).

Eine Lagerung bei -20 °C führte zur Aktivitätsabnahme, vor allem, wenn der Glycerolanteil von 20 auf 50 % erhöht wurde. Zwar sank auch hier die Aktivität bei 20 % Glycerol nur von 18 auf 17 nmol/(mg*min) in 11 Tagen, aber schon die Anfangsaktivität lag niedriger als bei 4 °C. Zudem veränderte sich die Proteinabhängigkeit nach zwei Wochen Lagerung (Abb. 4-12). Der Zusatz von 20 % Glycerol scheint für die Stabilität unerlässlich.

Noch tiefere Temperaturen (-80 °C) ließen die Aktivität auch bei 50 % Glycerol auf knapp 50 % nach 11 Tage sinken. Ohne Glycerol sank die Aktivität bei 4 °C in demselben Zeitraum auf Null ab.

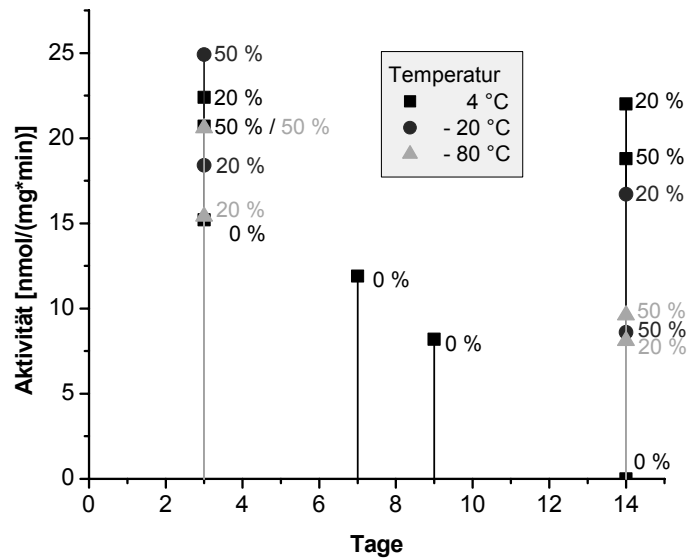


Abb. 4-14. Auftragung der Lagerungsbedingungen.
Neben den Punkten sind die Glycerolkonzentrationen in % angegeben.

4.1.3.8 Substratspezifität

Das Substrat der *cyaB8* war ATP. In einem parallelen AC/GC-Test war die GC-Aktivität zu vernachlässigen (0,4 %). Als Positivkontrolle für den GC-Test wurde die Paramecium Guanylatcyclase⁴⁰ (in HEK 293 Zellen exprimiert) verwendet. Diese war als eingefrorene testfertige Probe im Labor vorhanden.

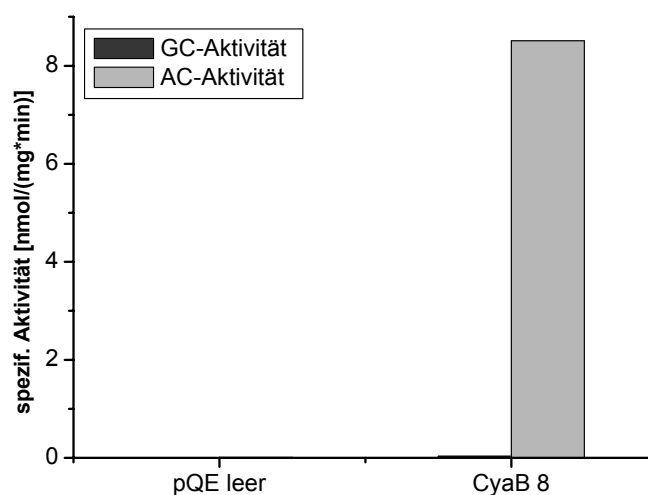


Abb. 4-15. Die AC/GC Aktivität von *cyaB8*.

Die Aktivität für GTP liegt bei 35 pmol/(mg*min), die für ATP bei 8,5 nmol/(mg*min). Die Werte für den pQE lagen innerhalb der Blankwerte.

4.1.4 Andere Konstrukte von *cyaB8*

Im Rahmen der Arbeitsgruppe wurden mit *cyaB8* auch Versuche zum Verständnis anderer ACn durchgeführt. Insbesondere wurde der Einfluß des C-terminalen Tetratrico Peptid Repeat (TPR) von *Paramecium tetraurelia* und *Anabaena sp. PCC 7120* und die Längendifferenz im katalytischen Zentrum der Paramecium-AC untersucht. Diese ACn wurden zeitgleich von Dr. K. Hambach (Paramecium) und Dr. T. Kanacher (Anabaena) untersucht.

Der TPR ist ein wichtiges Sequenzmotiv für Protein-Protein Interaktionen^{41,42}. In der Paramecium-AC ist dieses Motiv verkürzt, weswegen hier von einem ‚TPRL‘-Rest (Tetratrico Peptid Repeat Like) gesprochen wird^{18,43}.

In einem Alignment der Paramecium-AC (paraAC) mit *cyaB8* zeigte die paraAC einen Längenunterschied von einer Aminosäure im N-terminalen Bereich des katalytischen Zentrums zwischen den beiden Mg²⁺-bindenden Aspartaten (s. Abb. 4-19 und Abb. 1-2). Daher wurde das Konstrukt *cyaB8ΔP183* untersucht. Als Aminosäure wurde P183 in *cyaB8* entfernt. Das gereinigte Protein war mit 8 nmol/(mg*min) halb so aktiv wie *cyaB8* mit 19 nmol/(mg*min).

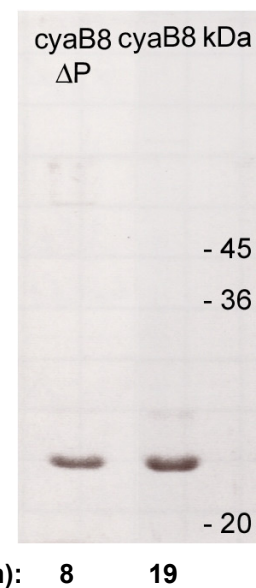


Abb. 4-16. SDS PAGE (12,5%).

Das Gel zeigt gereinigte Banden für *cyaB8ΔP* und *cyaB8*. Darunter sind die Größen und Aktivitäten angegeben.

Die Anabaena Cyclase *CyaB1₅₉₅₋₈₅₉* (*anaAC*) benötigte den TPRL für die Aktivität⁴³. Da die Paramecium-AC ebenfalls einen TPRL besaß, aber nicht exprimiert werden konnte, stellte sich die Frage nach der Notwendigkeit dieses Strukturelements. *cyaB8* ist ohne TPRL aktiv. Drei Chimären wurden hergestellt. *cyaB8EparaTPR* und *cyaB8MparaTPR*, die beide C-terminal den TPRL von Paramecium besaßen (Start der TPRL-Domäne mit E745 bzw. M746 der paraAC). Diese Chimären berücksichtigten die verschiedenen Übergangsaminoaciden, mit der die jeweilige katalytische Domäne abschloß (Abb. 4-17). *cyaB8AnaTPR* war die entsprechende

Chimäre mit dem TPRL der Anabaena AC, bei der keine Aminosäure ausgetauscht wurde.

```

cyaB8      : DLPPVRLKKGKQQPVPLRYRVL----- : 352
paraAC     : QIDKVTVKGSVKPIGLFTVLEMEADDLPPSKQDYPO : 760
anaAC      : QLDKIRVKGKHQAVNIYELISDRSTPLDDNTQEFL  : 796
                TPRL-->
    
```

Abb. 4-17. Übergang cyaB8 und den TPRs von Anabaena und Paramecium.

Ausschnitt aus einem Alignment zwischen cyaB, anaAC und paraAC. Der N-Terminus der TPR-Domäne ist grau hervorgehoben. cyaB8 besitzt am C-Terminus L als letzte AA, die paraAC aber E am TPRL-Übergang. Daher wurde bei cyaB8EparaTPR L352 (cyaB8) gegen E745 (paraAC) ausgetauscht (invers).

Alle Konstrukte wurden exprimiert, fanden sich aber in der unlöslichen Fraktion. Im Überstand war keine Aktivität. cyaB8MparaTPR zeigte eine Restaktivität (8 pmol/(mg*min); = 4x pQE), die aber nur 15 % der Aktivität von cyaB8 (54 [pmol/(mg*min)]) entsprach.

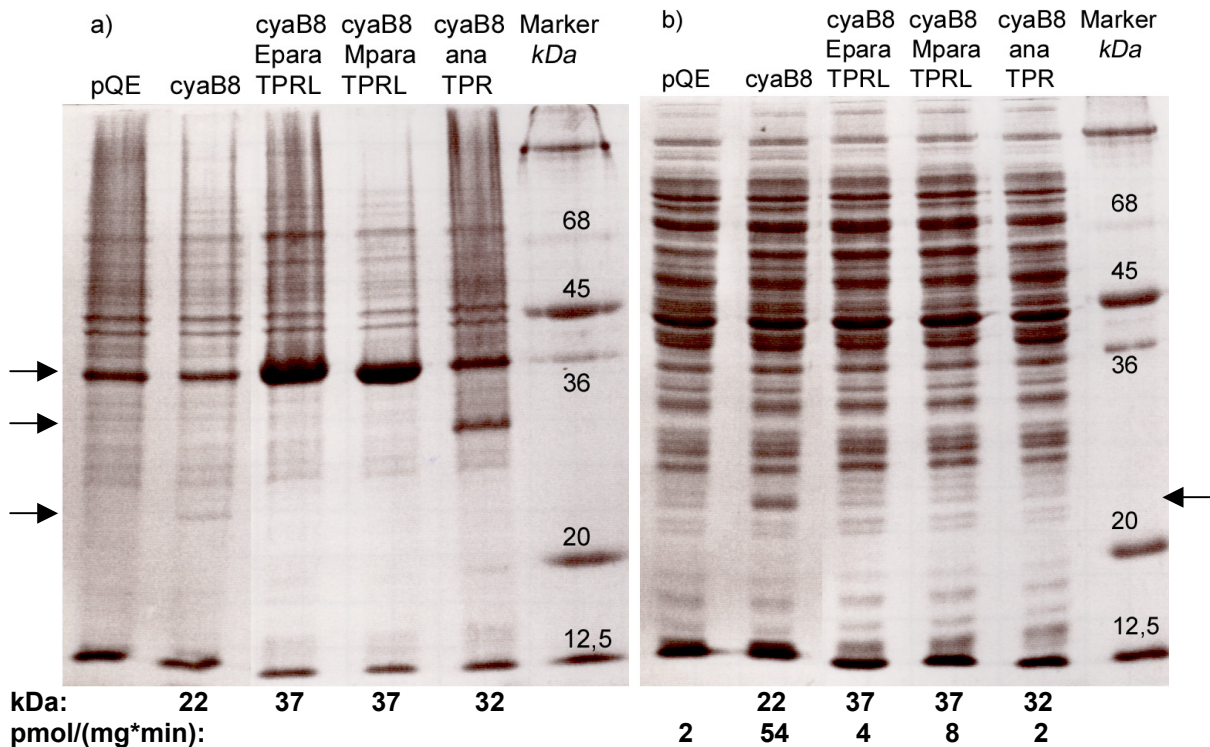


Abb. 4-18. SDS-PAGE-Gele (12,5 %) der Chimären.

a) Im Niederschlag sind alle drei TPR Konstrukte vertreten. b) Im Überstand tritt dagegen nur cyaB8 in Erscheinung. Darunter sind die gemessenen Aktivitäten angegeben.

Ebenfalls zur Überprüfung eines möglichen Lösungsansatzes für eine Aktivierung der paraAC wurde der N-terminale Bereich des katalytischen Zentrums der anaAC

Ergebnisse

gegen den entsprechenden Teil der paraAC und der cyaB8 als Positivprobe ausgetauscht. Hierbei handelte es sich vor allem um die Bindungsstellen für Mg²⁺ und eine für ATP. Diese Untersuchung wurde durchgeführt und dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt von PD Dr. J. Linder.

Die Konstrukte wurden als Paramecium₅₃₄₋₅₉₄-Anabaena CyaB1₆₅₇₋₈₅₉ Chimer (PAX) und Stigmatella₁₆₀₋₂₂₁-Anabaena CyaB1₆₅₇₋₈₅₉ Chimer (SAX) kloniert (Abb. 3-4 und Abb. 4-19). Bei der Expression wurden nur SAX und anaAC löslich exprimiert. PAX blieb unlöslich in den inclusion bodys. Im AC Test zeigte das SAX Konstrukt noch 3 % Restaktivität gegenüber anaAC, während PAX keine Aktivität über pQE zeigte.

```

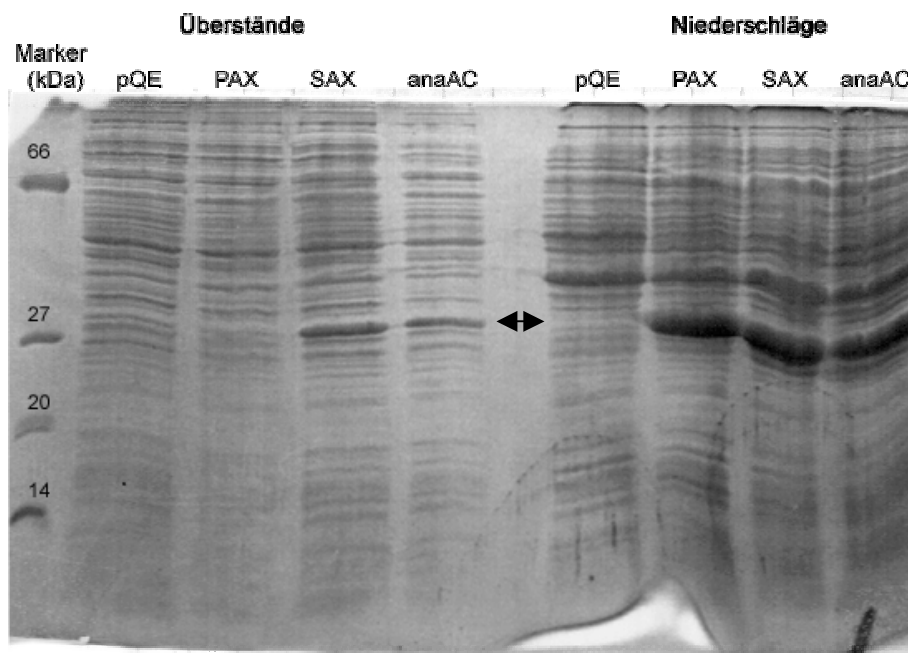
                                     k
cyaB8  160 : G E K R E V T V L F A D I R N F T G L A E S L P P E Q V V G V L N Q V L G R L S D A V L T C G
paraAC  534 : G K R K W A I Y G F C D I R N F T D A T E V L Q K D - V M L F V N N I A E I V H S M V D R Y Q
anaAC   595 : G E R K E V T V L F S D I R G Y T T L T E N L G A A E V S L L N Q Y F E T M V E A V F N Y E

                                     k   k
cyaB8  207 : G T L D K F L G D G L M A V W - - - - -
paraAC  580 : G S A N K N I G D A F L L V W - - - - -
anaAC   642 : G T L D K F I G D A L M A V F G A P L P L T E N H A W Q A V Q S A L D M R Q R L K E F N Q R R
```

Abb. 4-19. Ausschnitt aus dem Alignment von cyaB8, paraAC und Anabaena CyaB1.

Die ersten 61-62 AAn der Konstrukte PAX und SAX stammen von der paraAC bzw. cyaB. C-terminal schließen alle mit dem Rest der anaAC (hellgrau unterlegt) ab. Man beachte den Sequenzlängenunterschied.

Das in cyaB8 Δ P183 entfernte Prolin und die entsprechende Sequenzlücke in der paraAC sind dunkelgrau unterlegt (Pfeile). Identische AAn sind invers, an der Katalyse beteiligte AAn mit „k“ gekennzeichnet.



pmol/(mg*min): 17 17 187 8080

Abb. 4-20. SDS-PAGE-Gel (15 %) von Überstandsfractionen für die exprimierten Konstrukte PAX, SAX und anaAC (auf Höhe des Doppelpfeils).

PAX war nur im Niederschlag. Unter dem Gel sind die gemessenen Aktivitäten angegeben (Gel von PD Dr. J. Linder). Erwartete Größe für alle drei Konstrukte: 30 kDa.

4.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Als im Arbeitskreis die Untersuchung der Adenylatcyclasen von *Mycobacterium tuberculosis* begann, ergab eine Datenbankrecherche vier mycobakterielle ACn, deren aktive Zentren wie bei *cydB* ein Threonin anstelle des kanonischen Aspartats enthielten. Damit waren diese vier, Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c und Rv3645, ebenfalls der Klasse IIIb zuzuordnen.

Die weiteren für die Substratbindung und Katalyse wichtigen AAn sind identisch (Abb. 4-21). *cydB* besitzt im katalytischen Zentrum einen Einschub von 16 AAn.

		▼		↓ Mg			
Rv1318c	353	:	LGGEERHVAVVF	IDIVG	STQLVTSRPPADVVKLLNKFFAI	VVDEVD	RHHG
Rv1319c	354	:	LGGEDRHA	AVFVDIVG	STQLVDNQPAAHVVKLLNRF	FAIVVNEVD	RHHG
Rv1320c	353	:	LGGEERHVAVVF	VDIVG	STQLVTSRPAAEVVMMLLNRF	FTVIVDEVN	HHRG
Rv3645	354	:	LGQERDVAVL	FVDLVG	STQLAATRPPAEVQLLNEFF	RVVETVAR	HGG
<i>cydB</i>	300	:	LTGKREVT	VLFADIRN	FTGLAESLPPEQVVGVLN	QVLGRLSDA	VLTCCG

Ergebnisse

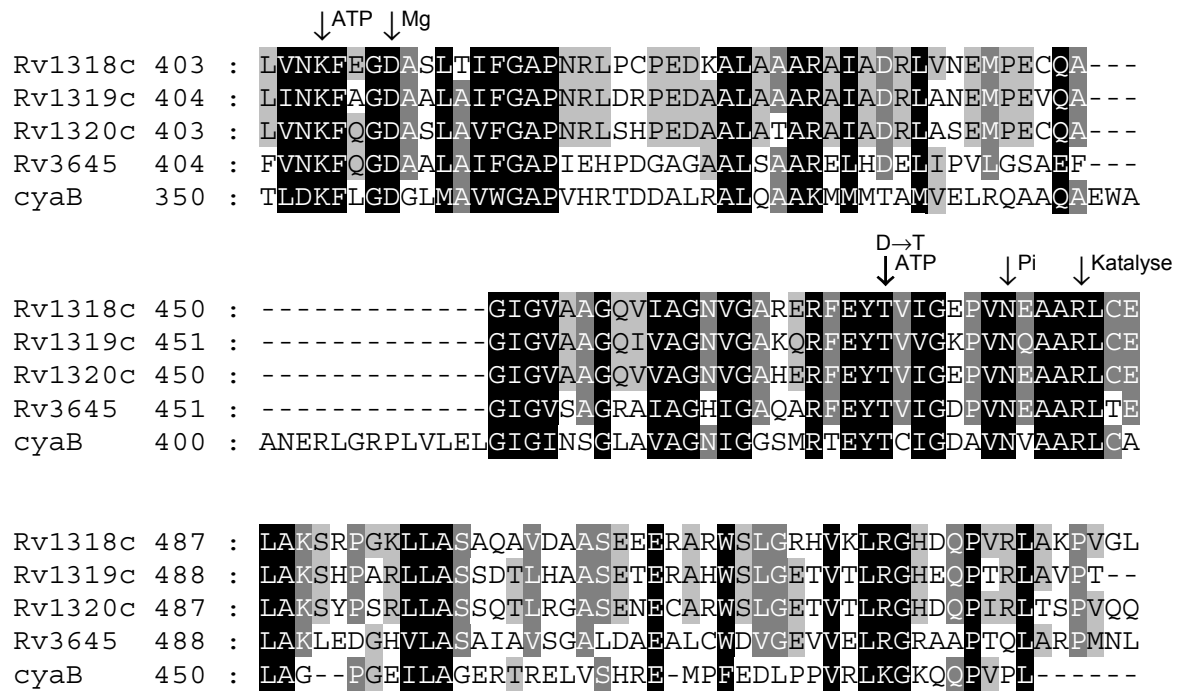


Abb. 4-21. Alignmentausschnitt der mycobakteriellen ACn mit cyaB.

Die Unterlegung der konservierten Aminosäuren erfolgt in drei Graustufen (konserviert nach Blossum 62 in 5 (invers), 4 (dunkelgrau) und 3 (hellgrau) Sequenzen). Die katalytisch wichtigen AAn (↓) sind in allen Cyclasen gleich. Der Pfeil (▼) bezeichnet die Starts von cyab8 und Rv1318c-20ckat und Rv3645kat.

4.2.1 Holoenzyme

Die Holoenzyme Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c und Rv3645 haben einen identischen Aufbau (Abb. 4-22). Die Analyse der konservierten AAn ergab eine starke Konservierung von Rv1318c-20c (≥62 % identische und ≥74 % ähnliche AAn) und eine geringere Ähnlichkeit dieser ACn mit Rv3645 (≤34 % identische und ≤52 % ähnliche AAn) (Tab. 4-1).

%	Rv1318c	Rv1319c	Rv1320c	Rv3645
Rv1318c		69	64	34
Rv1319c	82		62	32
Rv1320c	75	74		32
Rv3645	52	51	50	

Tab. 4-1. Identische (fett) und ähnliche Konservierungen der AAn der Holoenzyme von Rv1318c-20c und Rv3645.

Rv1318c 1 : MSAK-----KSTAQRLGRVLETVTRQSGRLPETPAYGSWLLGRVSESQR
 Rv1319c 1 : MPAK-----KTMAQRLGQALETMTRQCGQLPETPAYGSWLLGRVSESPS
 Rv1320c 1 : MPSE-----KATTRHLPGAVETLSPRTGRRPETPAYGSWLLGRVSESPR
 Rv3645 1 : MDAEAFVGFVRQVPAARYCGLMATTAALPRRIH---AFVRWVV-----R

intra

Rv1318c 45 : RRRVRIQVMLTALVVTANLLGIGVALLLVTTIAIP-EPSTVRDTPRWLTFG
 Rv1319c 45 : RRWVRIKRIVTVYIMTANLTGIVVALLLVTFAFP-VPSIYTDAPWVWTFG
 Rv1320c 45 : MRRVRIQGMILTVAAILVTNVIGLIVGAMLLTVAFP-KPSVILDAPHWVSFG
 Rv3645 41 : TPW----PLFSLSMLQSDIIGALFVLGFLRYGLPPQDNIIQLQDLPPVNL

extra

TM1

Rv1318c 94 : VVPGYVLLALALGSYALTRQTVQA-LRWA-----IEGRKPTREE--ERRT
 Rv1319c 94 : VAPAYATLALAIPTYWITTRIVRASIRWA-----IEERAPSQAD--GRNT
 Rv1320c 94 : IVPGYCVLAFILGTYWLTROQTARA-LRWA-----IEERTPSHDE--ARSA
 Rv3645 87 : IFVSTVIILFLAGAV-VNLKLLMPVFRWQRDNLLTEPDPAATELARSR

intra

TM2

Rv1318c 136 : FLAPWRVAVGHLMFVGVGTALLTTLYGLINNAFIPRFLFAVSFCGVLVAT
 Rv1319c 137 : LLLPFRVAAVHLILWDICGALLATLYGLANRVFVTIILFSVTICGVLVAT
 Rv1320c 136 : FLVPLRVALAVLFLWGAAAALWTIIYGLANRLFIPRFLFSMGVIGVVAAT
 Rv3645 136 : LRMPLYRTLISLAVWATCGGVFILASWSVAKHAAPVVAVATALGATATAI

extra

TM3

TM4

Rv1318c 186 : ATYLHTEFALRPFAAQALEAGPPRRRLAPGILGRMTMVVWLLGSGVPVVGI
 Rv1319c 187 : NCYLFTEFALRPVAAKALEAGRPPRRFAPGIMGRMTMVWSLGSVPVTGI
 Rv1320c 186 : SCYLLTEFALRPMAAQALEVCGATPRSLVRGIVGRMTMLVWLLCSGVPNVGV
 Rv3645 186 : IGYLQSERVLRPVAVAALRSGVPENVNAPGVILRLMLAWIPSTGVPLLAI

intra

TM5

Rv1318c 236 : ALMAMFEMV-LLNLTIRMOFATGVLIISMVTLVFGFILMWILAWLTATPVR
 Rv1319c 237 : ATTALYVLL-VHNLTTETQLASAVLILSTTTLIFGFLVMWILAWLTAAAPVR
 Rv1320c 236 : ALTAIFDDT-FWELSNQCFMITVLILWAPLLIFGFLMWILAWLTATPVR
 Rv3645 236 : VLAVAADKIALLHATPEALFNPILMMALAAALGIGSVSTLLVAMSADPLR

extra

TM6

Rv1318c 285 : VVRAALRRVERGELRTNLVFDGTELGELOQGFNAMVAGLRERERVRDLF
 Rv1319c 286 : VVRAALKRVEQGLRGDLVFDGTELGELOQGFNAMVNGLRERERVRDLF
 Rv1320c 285 : VVREALNRVEQGLSGDLVFDGTELGELOQGFNRMVEGLRERERVRDLF
 Rv3645 286 : QLRWALSEVQRGNYNAMQIYDASELGLLOAGFNDMVRELSEQRRLDLF

HAMP

↓ Mg

Rv1318c 335 : GRHVGREVAAAERERSKLGGEERHVAVFVIDIVGSTQLVTSRPPADVVK
 Rv1319c 336 : GRHVGREVAAAERERPQLGGEDRHAAVFVIDIVGSTQLVDNQPAAHVVK
 Rv1320c 335 : GRHVGREVAAAERERPQLGGEEERHVAVFVIDIVGSTQLVTSRPAAEVVM
 Rv3645 336 : GRVYGEDVARRALERGTELGGQERDVAVLFVDLVGSTQLAATRPPAEVVQ

Cyclase – Domäne

Ergebnisse

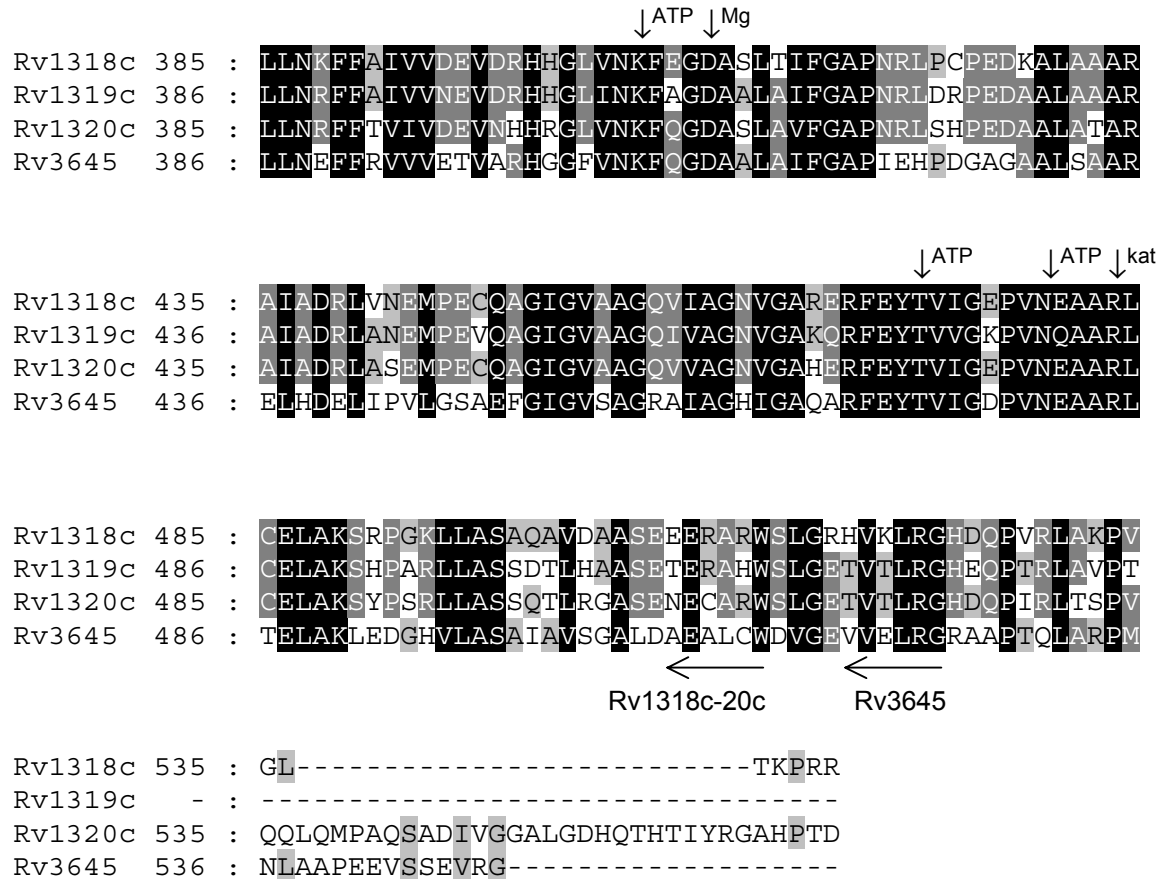


Abb. 4-22. Alignment der Holoenzyme Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c und Rv3645.

Die Unterlegung der Aminosäuren umfaßt drei Stufen. Invers: identische oder nach Blossum 62 konservierte AAn. In zwei heller werdenden Graustufen folgen die in drei bzw. zwei ACn konservierten AAn. Mit „intra“ und „extra“ wurde die prognostizierte Lage der Schleifen zwischen den Transmembrandomänen angegeben. Der Start der klonierten katalytischen Zentren ist mit einem Pfeil (▼) markiert. Wichtige AAn sind markiert (↓, kat = Katalyse).

Eine Aktivitätsüberprüfung der vier membranständigen Holoenzyme als Membranpräparation ergab nur für zwei eine Aktivität über pQE. Dabei war Rv3645 (958 pmol/(mg*min)) 25x aktiver als Rv1319c (39 pmol/(mg*min)) (Abb. 4-23). GTP wird nicht umgesetzt. Im weiteren wurde mit Rv1319c und Rv3645 gearbeitet.

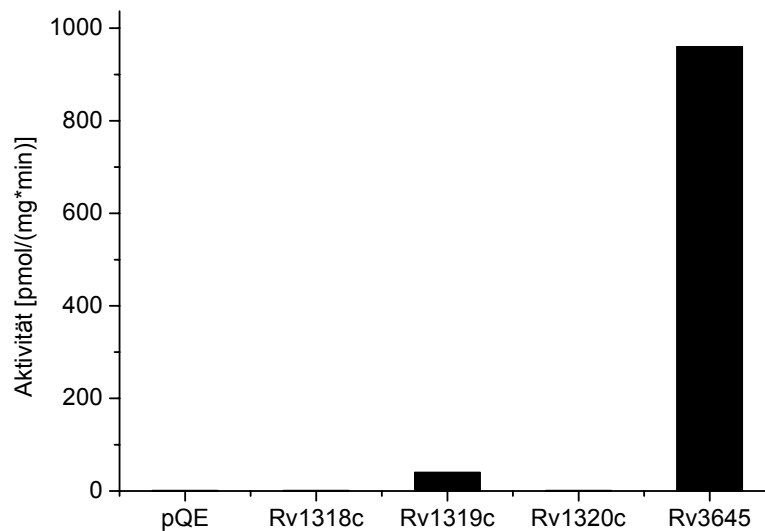
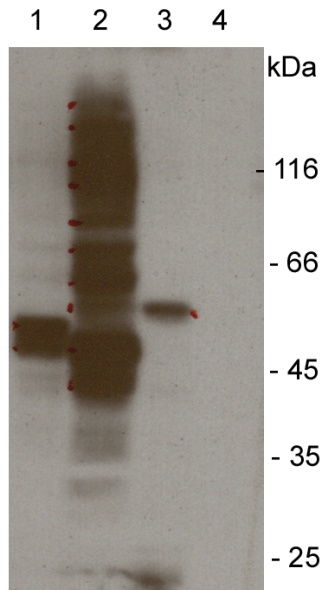


Abb. 4-23. Aktivitätsübersicht der vier Holoenzyme.

Die Membranpräparation ergab nur für Rv1319c und Rv3645 Aktivität.

Der Nachweis der exprimierten Holoenzyme (je ca. 60 kDa) war nur durch einen Western-Blot möglich. Zudem waren die Banden oft nur schwach zu erkennen. Exemplarisch sei hier ein Western-Blot vom Zellhomogenat abgebildet (Abb. 4-24). Die Spur für Rv1318c (1) zeigte zwei Banden bei 56 und 51 kDa, während Rv1320c (3) eine diskrete Bande bei 59 kDa ergab. Die Spur von Rv1319c (2) bestand aus wenigstens 10 Banden zwischen 129 und 44 kDa. Hierbei handelte es sich vermutlich um Abbauprodukte oder Multimere. Da alle drei Enzyme eine Bande um 60 kDa zeigten, wurde von einer erfolgreichen Expression ausgegangen (für Rv3645 siehe Abb. 4-25).



**Abb. 4-24. Western-Blot der Holoenzyme Rv1318c, Rv1319c und Rv1320c mit RGS₄-Antikörper (Bel.: 2 sec).
Spuren: 1: Rv1318c, 2: Rv1319c, 3: Rv1320c, 4: pQE**

Für die eingezeichneten Punkte wurden folgende Größen berechnet:

1 (Rv1318c): 56, 51 kDa
 2 (Rv1319c): 129, 119, 104, 79, 82, 75, 64, 60, 51, 44 kDa
 3 (Rv1320c): 59 kDa

Probenvorbereitung:

Zellen von 40 ml Kultur wurde in 1 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,5 suspendiert und 2 x 10 sec mit Ultraschall (Stufe 4) bei 4 °C aufgeschlossen. 50 µl des Zellhomogenats wurden mit der gleichen Menge SDS-Probenpuffer versetzt und 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei ~14.000 g bei RT wurden je 10 µl des Überstands aufgetragen.

Selbst der Nachweis der aktivsten AC Rv3645 gelang nur per Western-Blot (Abb. 4-25). Bereits ohne Induktion erfolgte bei Rv3645 schon eine Hintergrundexpression. Die angegebenen mittleren Helligkeiten der Banden lassen halbquantitativ auf eine zusätzliche Expression von Rv3645 durch IPTG-Zusatz schließen.

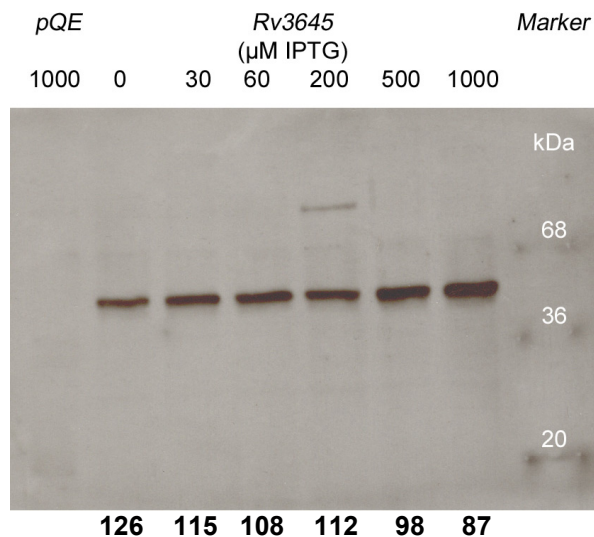


Abb. 4-25. Western-Blot einer Expressionsreihe von Rv3645 mit anti-RGS₄-Antikörper.

Rv3645 läuft auf erwarteter Höhe (52 kDa, obere Bande bei 200 µM IPTG bei 85,7 kDa). Unterhalb: mittlere Helligkeit der Banden (gleiche Fläche: 0,168; Grauskala, nach NIH-ImageJ).

Probenvorbereitung:

Zellen von 1 ml des 20 ml Expressionsansatzes wurde in 100 µl SDS-Probenpuffer suspendiert und mit 2 x 10 sec mit Ultraschall (Stufe 4) bei 4 °C aufgeschlossen. Nach 30 min bei 37 °C wurde bei RT für 5 min bei 14.000 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 2 µl aufgetragen. Blot: 2 h, 25 V, 260 mA.

Die Reinigung der Holoenzyme Rv3645 und Rv1319c aus der Membran (3.3.4, mit Solubilisierung) wurde mehrfach mit verschiedenen Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen versucht. Es war allerdings keine Aktivität von den Ni²⁺-NTA-Säulen eluierbar. Deswegen wurde der Detergenzeinfluß auf die Membranpräparationen (MP) untersucht (Abb. 4-26 und Abb. 4-28).

Die Detergenzien Polydocanol (0,6-3 %), Dodecylmaltosid (0,3 %) oder Triton X 100 (1-3 %) hemmten die Aktivität der MP um etwa 90 % gegen die Aktivität der MP ohne Detergenz (Aktivität = 100 %).

CHAPS führte bei Rv3645 zu einer geringeren Aktivitätssenkung (um 53 % bei 0,5 % CHAPS und 75 % bei 2 % CHAPS, Abb. 4-26). Nach Schütteln mit Detergenz und Trennung in Überstand und Niederschlag zeigte nur Rv3645 Aktivität (Abb. 4-28). Rv1319c wird weiter unten besprochen.

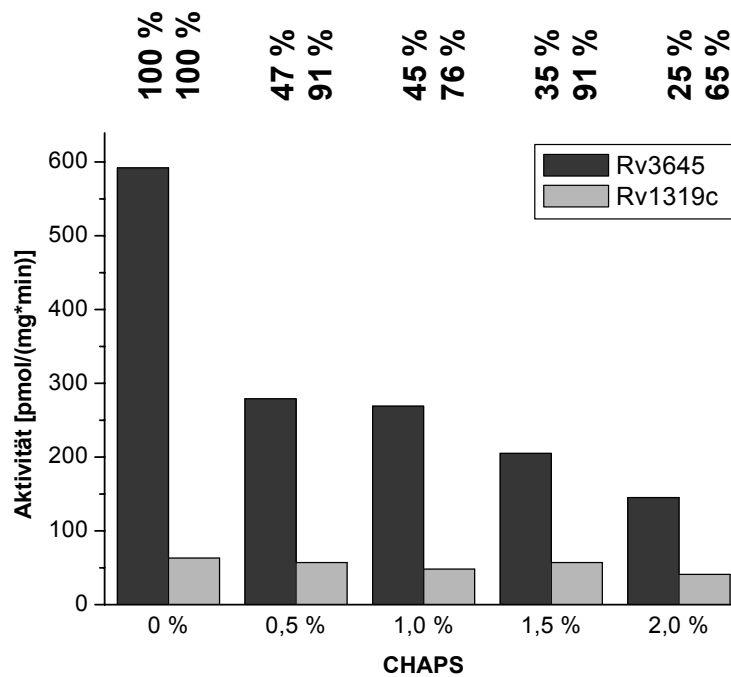


Abb. 4-26. Einfluß von CHAPS auf die AC-Aktivitäten der MP von Rv3645 und Rv1319c.

Auffällig ist der geringe Aktivitätsverlust von Rv1319c (9-35 %). Über dem Graphen sind die Restaktivitäten gegen 100 % der jeweiligen MP angegeben.

Das SDS-PAGE-Gel ließ für Rv3645 im Niederschlag für Triton X 100 und CHAPS sowie auch im CHAPS-Überstand kräftigere Banden erahnen. Die Proteine liefen hier auf einer Höhe von 68 kDa (Abb. 4-27, Pfeil). Der pQE hatte in diesem Bereich keine verstärkten Banden. Bei Rv1319c ließen sich kaum Proteinbanden erkennen.

Ergebnisse

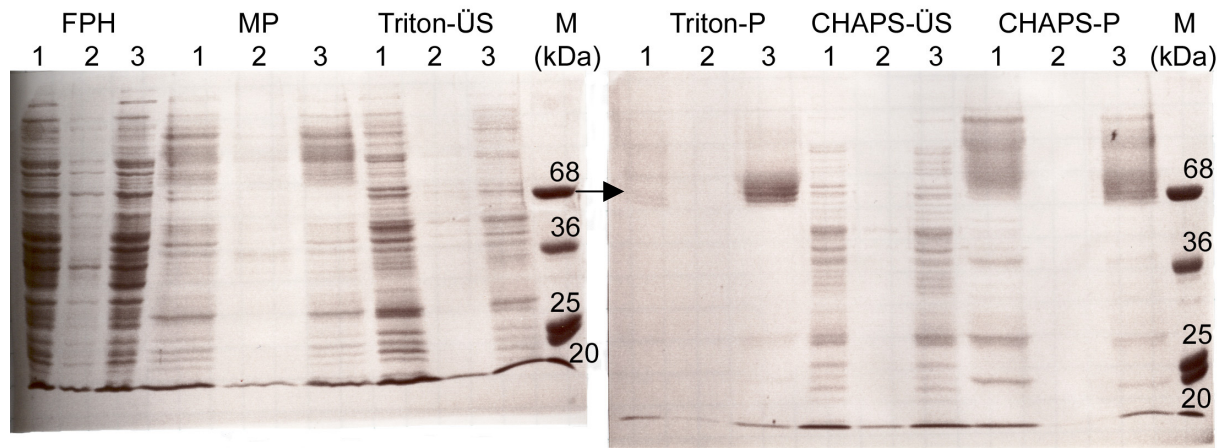


Abb. 4-27. SDS-PAGE-Gele von Rv1319c und Rv3645 unter Triton X 100 und CHAPS Einfluß (12,5 %).

1 = pQE; 2 = Rv1319c; 3 = Rv3645

FPH = French-Press Homogenat; MP = Membranpräparation; ÜS = Überstand; P = Niederschlag; M = Marker.

Rv1319c kam mit 63 pmol/(mg*min) nur auf etwa 10 % der Aktivität von Rv3645 (592 pmol/(mg*min); Abb. 4-26). Rv1319c wird aber nur wenig von Detergenzien gehemmt (91-65 % Restaktivität bei 0,5-2 % CHAPS). Der scheinbare Aktivitätsanstieg von Rv1319c bei 2 % Triton X 100 bzw. CHAPS ist wahrscheinlich ein Effekt der Proteinkonzentration der MP. Vergleicht man die Aktivitäten nach Zugabe von 2 % CHAPS für Rv3645 in Abb. 4-28 und Abb. 4-26, so waren sowohl die Aktivitäten (150 bzw. 100 [pmol/(mg*min)]), als auch die prozentuale Hemmung (75 % bzw. 83 %) für die mit Detergenz versetzte MP gleich.

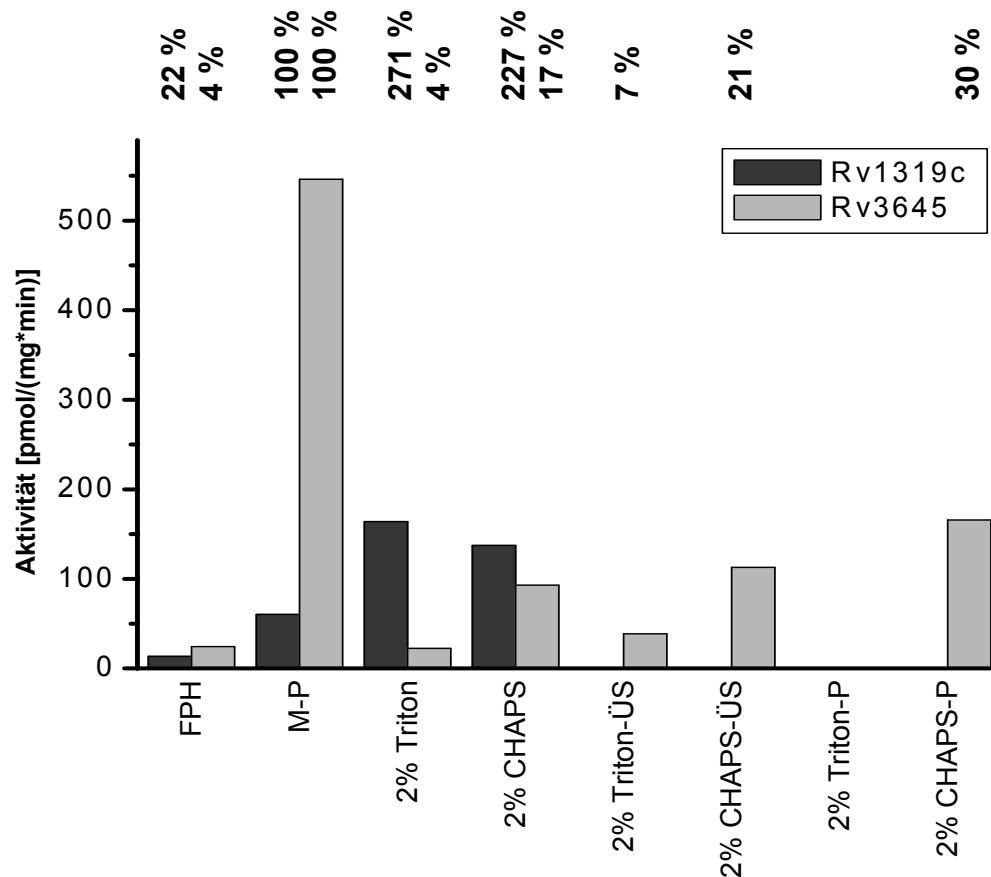


Abb. 4-28. Membranpräparation mit Solubilisierungsversuch für Rv1319c und Rv3645.

Werte nach 1 h schütteln mit Detergenz bei 4 °C, anschließender Zentrifugation bei 48.000 g für 30 min und Resuspension des Niederschlags in Membransuspensionspuffer (FPH = French-Press-Homogenat, ÜS = Überstand, P = Niederschlag). Über dem Graphen stehen die Restaktivitäten in Prozent bezogen auf die angegebenen 100 % Werte.

4.2.2 Rv3645 Mutationen

Rv3645 besitzt, wie *cyaB*, ein T473 anstatt eines D in der katalytischen Tasche. Das Threonin ist wahrscheinlich an der Ausrichtung des Adeninringes des ATP beteiligt (Abb. 1-1), wie für *cyaB1* aus *Anabaena sp. PCC 7120* gezeigt wurde³⁴. Zur Überprüfung des Einflusses von T473 in Rv3645, wurden die Mutanten Rv3645T473A und Rv3645T473D hergestellt.

Die Konstrukte zeigten geringere Aktivitäten als der Wildtyp. Die Mutation zum kanonischen Aspartat ergab eine Restaktivität von 20 % (65 pmol/(mg*min)), während die in der T473A-Mutante noch 60 % (177 pmol/(mg*min)) der Wildtypaktivität erhalten blieb.

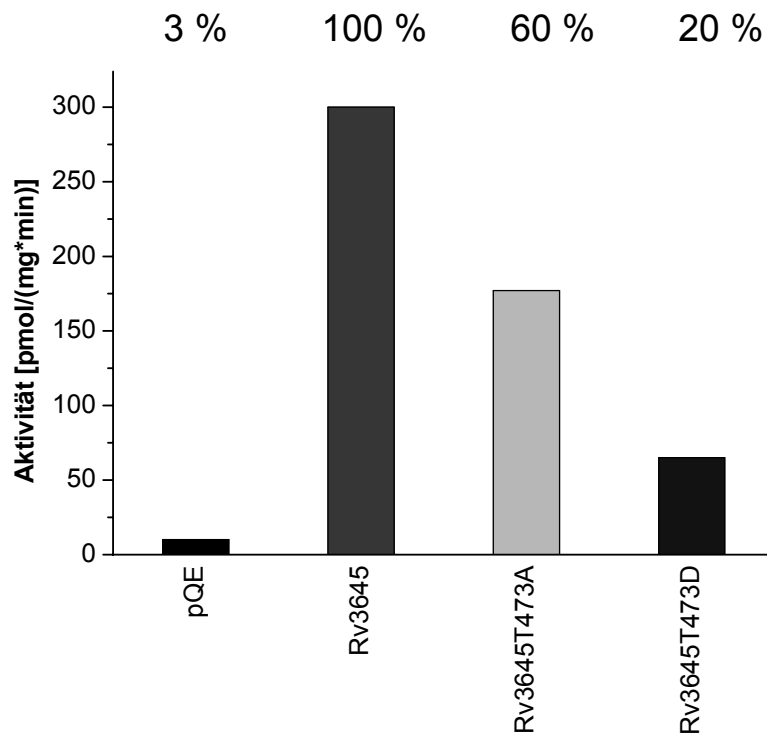


Abb. 4-29. Aktivitäten von Rv3645, Rv3645T473A und Rv3645T473D.

Aktivitäten der resuspendierten MP eines von zwei repräsentativen Versuchen (n=1); oben Aktivitäten in Prozent bezogen auf den 100 % Wert (AC-Assay: T=37 °C, ATP= 75 µM, 50 mM Tris/HCl, pH 8,1).

4.2.3 Verbundene Holoenzyme

In Mammalia-ACn liegen die beiden katalytischen Schleifen in einem einzigen Protein vor. C1 ist zwischen den beiden Membranankern plaziert, C2 liegt C-terminal. Im aktiven Protein bilden beide intramolekular ein katalytisches Zentrum. Evolutionär ist dieser Aufbau wahrscheinlich durch Genverdopplung entstanden.

Im Genom des Stammes H37Rv von *M. tuberculosis* liegen die drei ACn Rv1318c-20c unmittelbar hintereinander (Abb. 4-30). Der Leserahmen der drei Gene ist durchgängig, und die codierenden Regionen sind nur durch ein bzw. zwei Stops getrennt (Abb. 4-31). Diese Aufreihung erinnerte an die Domänenanordnung der Mammalia-ACn und führte zur Idee von Doppelkonstrukten.

Die beiderseits angrenzenden Gene waren durch Änderungen des Leserahmens oder der Leserichtung abgegrenzt.

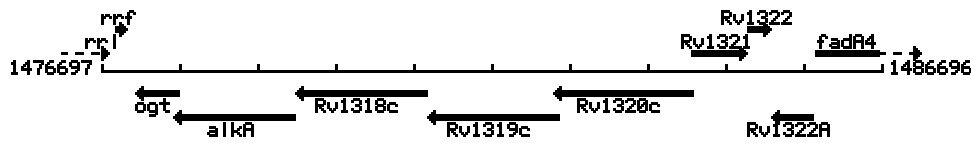


Abb. 4-30. Anordnung der drei ACn Rv1318c-20c in der Nucleotidsequenz von H37Rv.

Abhängig von der Leserichtung sind die Gene über bzw. unter dem Nucleotidlineal eingezeichnet. Rv1318c, Rv1319c und Rv1320c folgen unmittelbar aufeinander.

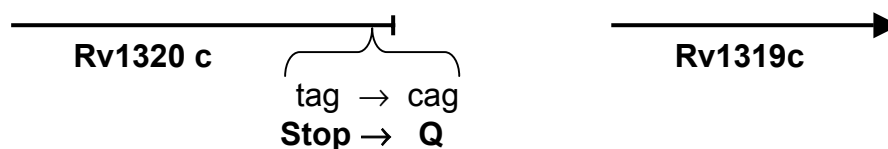
Die Abbildung wurde der Website „TubercuList“ des Institute Pasteur, Frankreich, entnommen und angepaßt: (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>).

Zur Realisierung der Doppelkonstrukte wurden die Stopcodons durch Basenaustausche zu Glutaminen mutiert. Statt TAG bzw. TAA wurde CAG bzw. CAA = Glutamin (Q) eingefügt (Abb. 4-31). Die Linker zwischen den einzelnen ACn der Doppelkonstrukte haben eine Länge von 4 AAn in Rv1320c1319c bzw. 18 AAn in Rv1319c1318c.

Die Expression der Konstrukte wurde mit einem Western-Blot überprüft. Rv1320c1319c zeigte eine Einzelbande von 97 kDa mit einer schwachen Nebenbande bei ca. 116 kDa, während Rv1319c1318c zwei Banden bei 104 und 97 kDa und eine schwächere Bande bei 129 kDa lieferte (berechnetes Molekulargewicht: ca. 120 kDa).

a) *Rv1320c1319c*

CGTGGGGCGCATCCGACAGATTAGGCTGACGCCACCATGCCGGCGAAAAAGACCATGGCGCAACGCCTGG 1750
R G A H P T D . A D A T M P A K K T M A Q R L



b) Rv1319c1318c

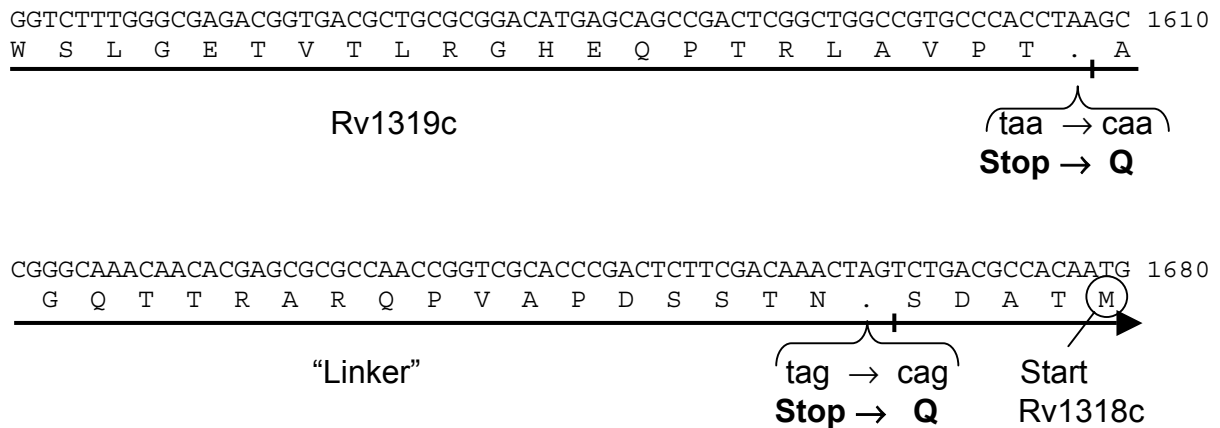


Abb. 4-31. mit Vorseite: Sequenzausschnitt des Übergangs der Cyclasen Rv1320c und Rv1319c (a) und Rv1319c und Rv1318c (b). Die Stopcodons wurden durch Basenaustausche zu Q mutiert.

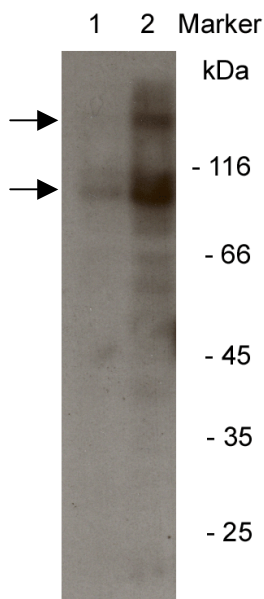


Abb. 4-32. Western-Blot von Rv1320c1319c und Rv1319c1318c.

Belichtung 10 sec., um die schwache Bande für Rv1320c1319c (Pfeil) zeigen zu können. Für Rv1319c1318c sind auf etwa der gleichen Höhe zwei stärkere Banden zu sehen, eine weitere darüber (Pfeile). Die übrigen schwächeren Banden entstammen der für die übrigen Proben des Blots (Abb. 4-24) langen Belichtungszeit; Probenvorbereitung siehe dort, erwartete Größe ca. 120 kDa.

Für die einzelnen Banden wurden folgende Größen berechnet:

1 Rv1320c1319c: 97 kDa

2 Rv1319c1318c: 97, 104 und 129 kDa

Rv1319c1318c hatte eine geringe Aktivität (21 pmol/(mg*min)), was dem doppelten pQE entsprach, Rv1320c1319c war inaktiv.

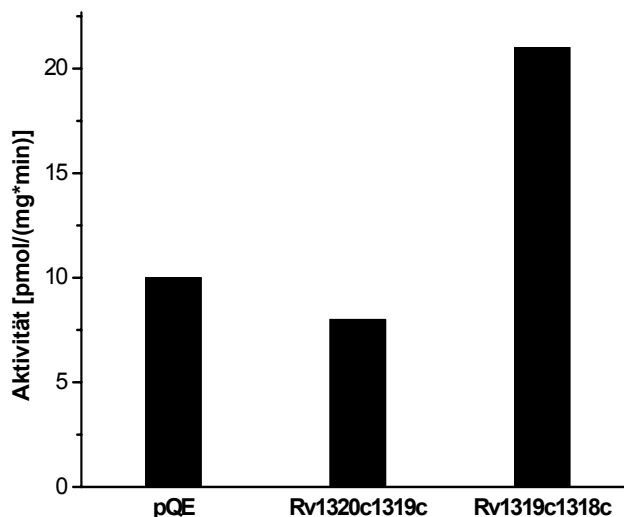


Abb. 4-33. Aktivitätsvergleich der MP der verbundenen ACn mit den Einzelcyclasen (einer von zwei repräsentativen Versuchen, n=1).

4.2.4 Charakterisierung von Rv1319ckat

4.2.4.1 Aktivitätsüberblick aller vier katalytischen Zentren

Die Aminosäurekonservierung der katalytischen Zentren der vier mycobakteriellen ACn ist zwischen Rv1318c-20c größer (64-69 % Identität, 73-79 % Ähnlichkeit) als gegen Rv3645 (46-52 % Identität, 61-69 % Ähnlichkeit; Tab. 4-2).

%	Rv1318ckat	Rv1319ckat	Rv1320ckat	Rv3645kat
Rv1318ckat		69	67	52
Rv1319ckat	79		64	48
Rv1320ckat	74	73		46
Rv3645kat	69	62	61	

Tab. 4-2. Identische (fett) und ähnliche Konservierungen der AAn der katalytischen Zentren von Rv1318c-20c und Rv3645.

Zur Untersuchung wurden von allen vier Holoenzymen die katalytischen Zentren Rv1318ckat, Rv1319ckat, Rv1320ckat und Rv3645kat kloniert. Ihre Proteinsequenzen begannen N-terminal bei GE (Rv1318c-20c) bzw. GQ (Rv3645) (Pfeil ▼ in Abb. 4-22) und endeten mit dem unveränderten C-terminus. Damit wurde die gleiche Startposition wie bei *cyaB8* gewählt (Abb. 4-21).

Ergebnisse

Das SDS-PAGE-Gel zeigte eine Anreicherung der löslichen Proteine Rv1319ckat, Rv1320ckat und Rv3645kat (Abb. 4-34). Rv1318ckat war erst auf einem Western-Blot sichtbar.

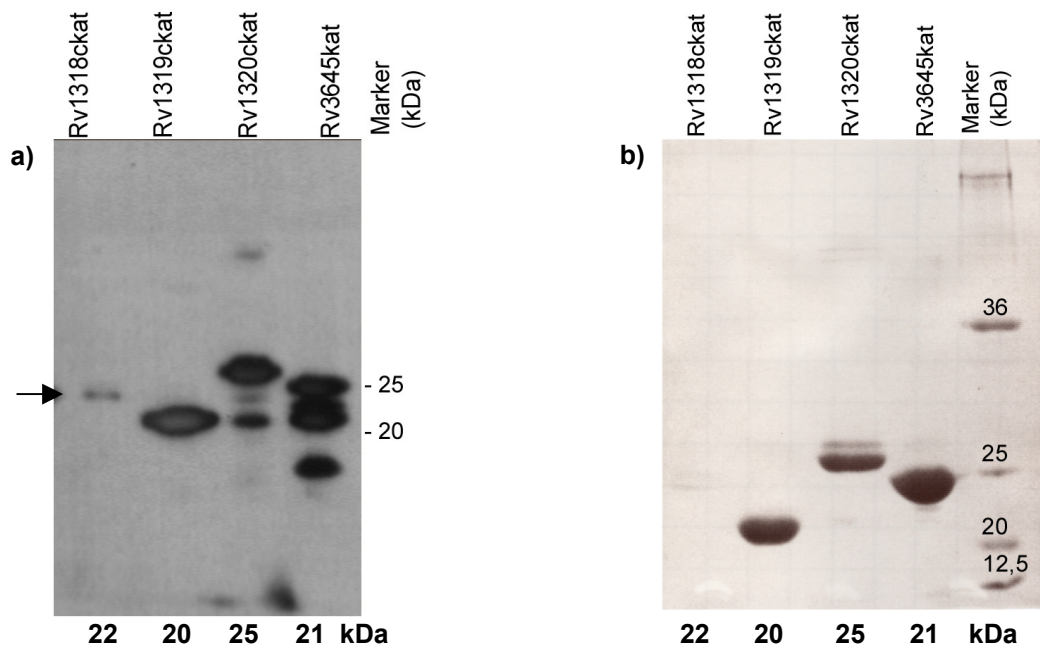


Abb. 4-34. a) Western-Blot und b) SDS-PAGE-Gel (12,5 %) von Rv1318ckat, Rv1319ckat, Rv1320ckat und Rv3645kat.

a) Western-Blot (mit anti-RGSH₄-Antikörper) zeigt eine Bande für Rv1318ckat (Pfeil). Rv1320ckat und Rv3645kat zeigen beide Abbauprodukte. Einzig Rv1319ckat ergibt eine starke Einzelbande.

b) Das SDS-PAGE-Gel weist eine Anreicherung der Enzyme nach. Rv3645kat läuft zu hoch, zeigt im Western-Blot aber eine Bande der richtigen Größe.

Rv1319ckat war aktiv (903 ± 109 [pmol/(mg*min)]), während Rv1318ckat (121 ± 77 [pmol/(mg*min)]) und Rv3645kat (34 ± 18 [pmol/(mg*min)]) wenig aktiv sind (10 µg Protein im Test) (Abb. 4-35; Werte: Aktivität \pm SEM mit 10 µg frisch gereinigtem Protein, T = 30 °C, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5). Rv1320c war nicht aktiv.

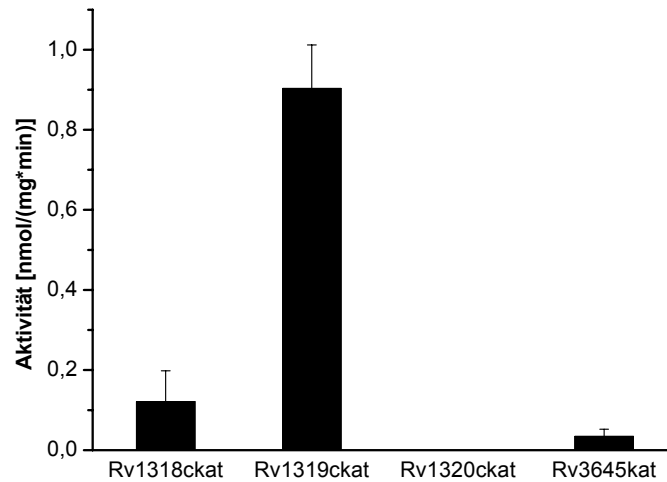


Abb. 4-35. Aktivitätsüberblick für Rv1318ckat, Rv1319ckat, Rv1320ckat und Rv3645kat.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit deren Standardfehlern (SEM) aus 4 Messungen mit gereinigtem Protein (75 μM ATP).

Rv1319ckat wurde zur Charakterisierung des katalytischen Zentrums benutzt. Dieses konnte in großer Menge exprimiert und gereinigt werden. Übliche erzielte Konzentrationen beliefen sich bei French-Press Aufschluß auf 5-6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gereinigtes Protein. Die Reinheit entsprach dabei jeweils der von Abb. 4-34.

4.2.4.2 Proteinabhängigkeit

Die Proteinabhängigkeit war linear bis 8 μM . Bei höheren Konzentrationen flacht die Aktivitätszunahme ab. Die Aktivitäten waren bei 37 $^{\circ}\text{C}$ insgesamt höher als bei 30 $^{\circ}\text{C}$.

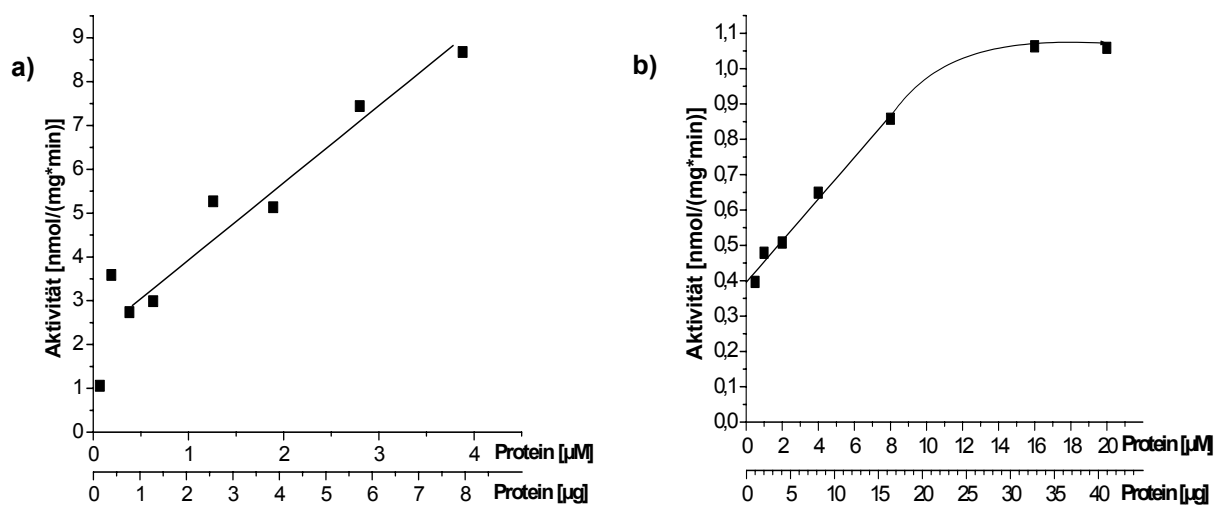


Abb. 4-36. Proteinabhängigkeit von Rv1319ckat.

Die Kurven wurden mit 75 μM ATP a) bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und pH 8,1 und b) bei 30 $^{\circ}\text{C}$ und pH 7,5 aufgezeichnet. Man beachte die unterschiedlichen Maßstäbe.

4.2.4.3 pH Optimum

Die pH-Abhängigkeit wurde mit verschiedenen 50 mM Puffern bei 30 °C, 75 µM ATP für 10 min gemessen. Die pH-Messung der Reaktionsansätze fand ohne Protein bei RT statt. Da Tris/HCl temperaturempfindlich ist (-0,12 pH-Einheiten pro +5 °C), wurden die Werte um -0,25 pH korrigiert. Das pH-Optimum von Rv1319ckat lag bei pH 9,5 (Abb. 4-37).

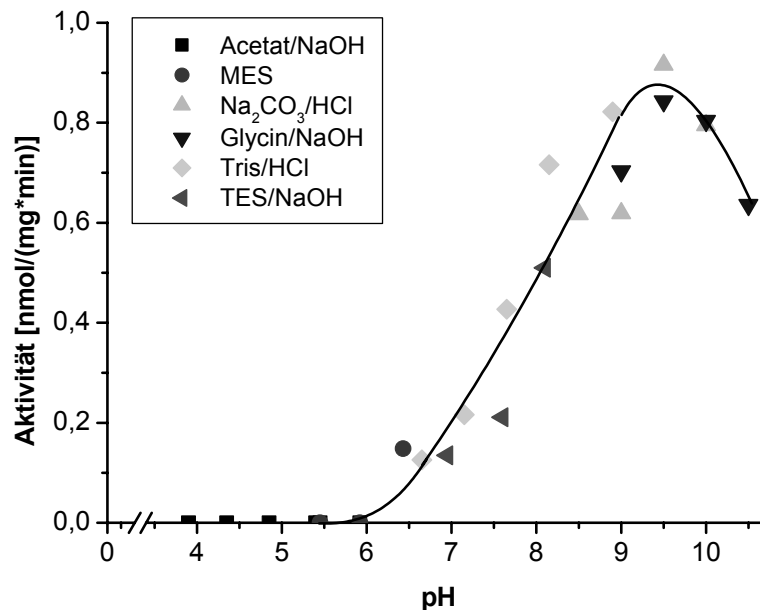
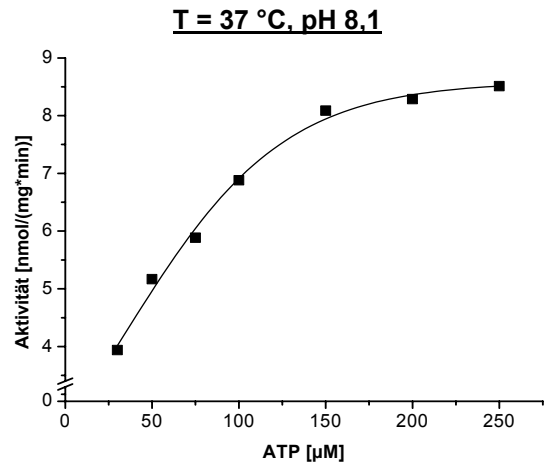
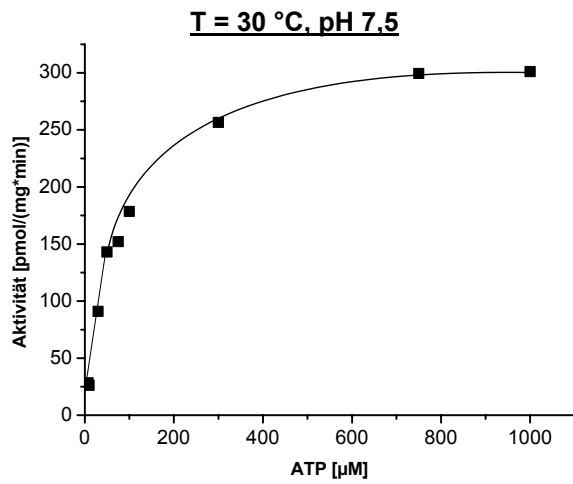


Abb. 4-37. Einfluß des pH auf die Aktivität von Rv1319ckat (4 bzw. 8 µg Protein).

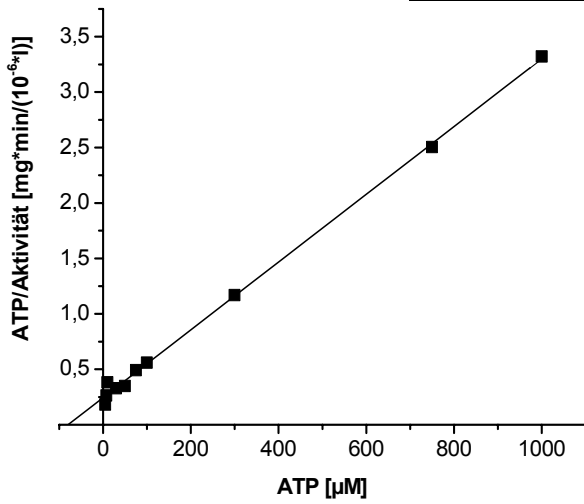
4.2.4.4 Kinetik

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden zwei von mehreren Tests herangezogen. Im zweiten gezeigten Test wurde die Spanne von 0,5 bis 3 K_M -Werten des ersten untersucht. Die unterschiedlichen Bedingungen zeigten einen starken Einfluß. So kletterte v_{max} von 327 pmol/(mg*min) bei 30 °C und pH 7,5 um das 30 fache auf 10 nmol/(mg*min) bei 37 °C und pH 8,1. Der K_M blieb mit 80 bzw. 50 µM ATP konstant. Der Hill Plot bestätigte keine Kooperativität der beiden katalytischen Zentren (0,99 bzw. 1,08).

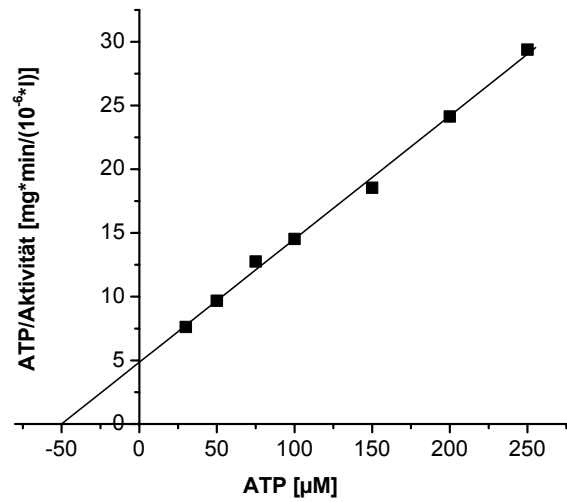
Michaelis-Menten Auftragung



Hanes-Woolfe Auftragung

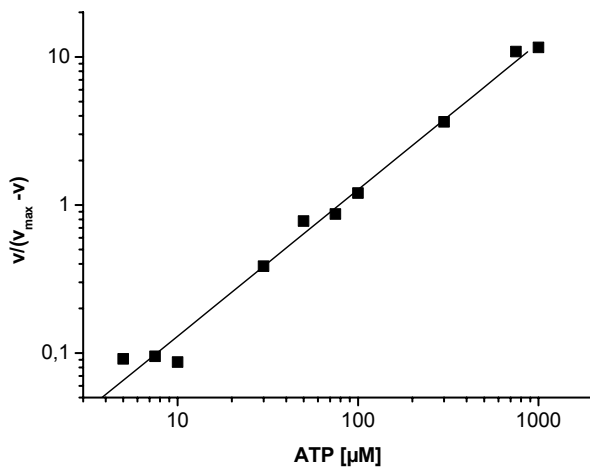


$v_{max} = 327 \text{ pmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$
 $K_M = 80 \text{ µM}$
 $R = 0,99897$

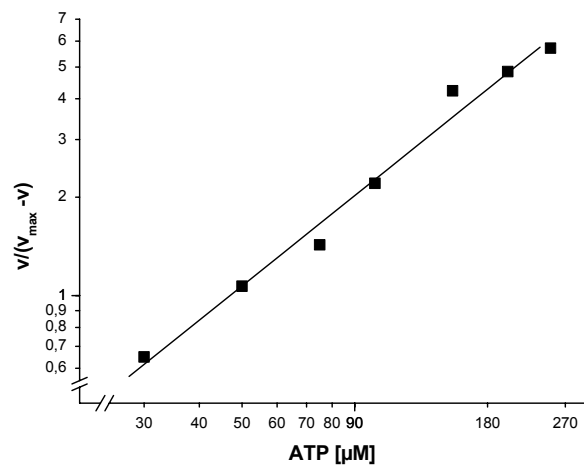


$v_{max} = 10 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$
 $K_M = 50 \text{ µM}$
 $R = 0,99837$

Auftragung nach Hill



Hill Koeffizient = 0,99
 $R = 0,99434$



Hill Koeffizient = 1,08
 $R = 0,9922$

Abb. 4-38. Vorseite: Kinetische Bestimmungen für Rv1319ckat.

Gezeigt sind (von oben) die Auftragung nach Michaelis-Menten, Hanes-Woolfe und Hill. Die Enzymmenge betrug jeweils 4 µg.

Die Bestimmung nach Hanes-Woolfe wurde gewählt, da so die Schwankungen der gemessenen Aktivitäten verkleinert wurden; Berechnung der Ergebnisse: 7.2.1; Bestimmung bei 37 °C, pH 8,1: Mittelwerte, n=2.

4.2.4.5 Temperaturoptimum

Die Temperaturabhängigkeit wurde von 5 bis 65 °C bestimmt. Die Enzymaktivität war glockenförmig mit einem Maximum bei 37 °C. Die Arrheniusauftragung ergab eine Aktivierungsenergie von $E_A = 28$ kJ/mol.

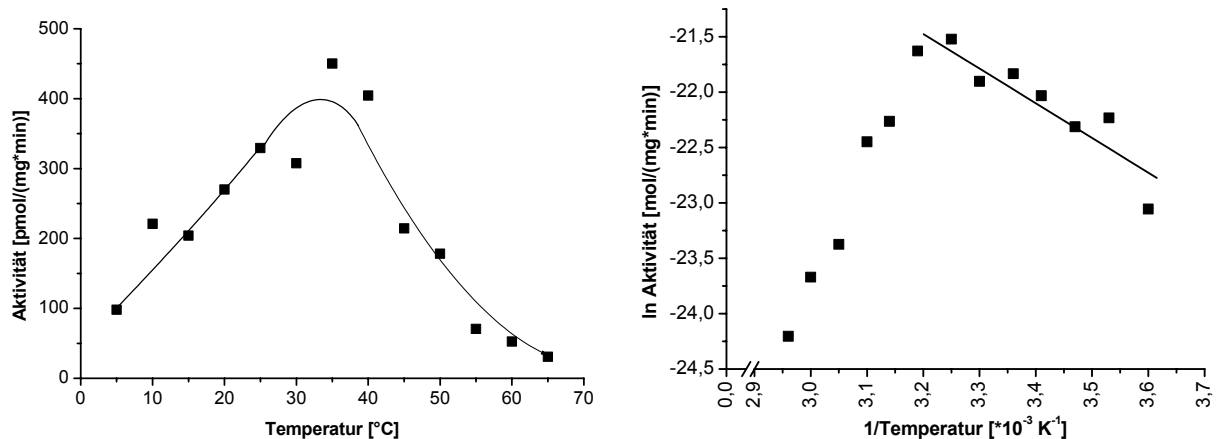


Abb. 4-39. Temperaturabhängigkeit der Aktivität von Rv1319ckat.

Rechts: Auftragung nach Arrhenius ($R = -0,91281$), 75 µM ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5. Einer von zwei repräsentativen Assays.

4.2.4.6 Zeitabhängigkeit

Die Zeitabhängigkeit war linear bis 15 min. Da die Reaktionszeit sonst 10 min betrug, lagen die Werte stets im linearen Bereich.

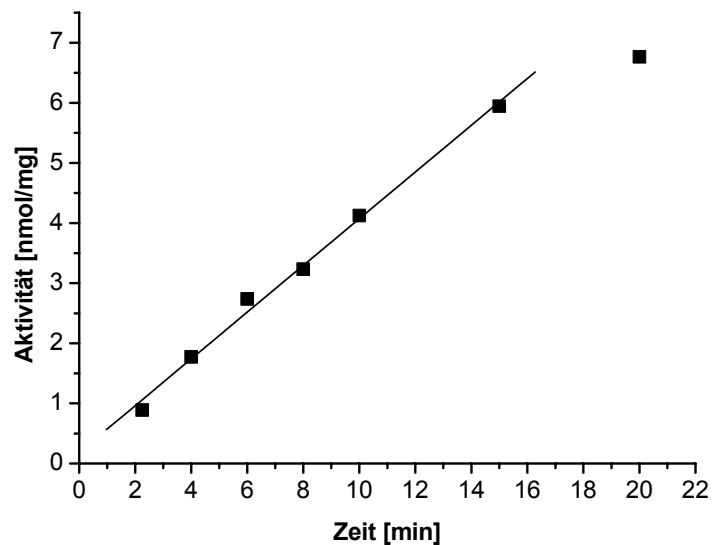


Abb. 4-40. Zeitabhängigkeit von Rv1319ckat ($R = 0,99715$), $n=1$.

4.2.4.7 Stabilität

Rv1319ckat war bei -20 °C mit 20 % Glycerol über 6 Monate gut lagerfähig (Abb. 4-41). Die Lagerung bei 4 °C mit 20 % Glycerol zeigte einen Anstieg der Aktivität über 2 Monate. Diese Lagerbedingungen begünstigen möglicherweise die Bildung von Dimeren.

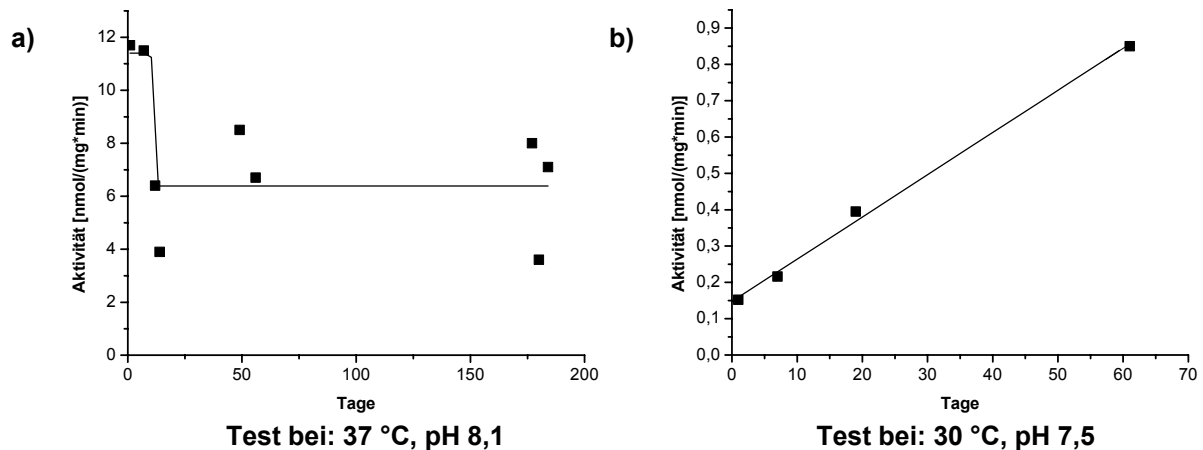


Abb. 4-41. Stabilität von Rv1319ckat.

a) Die -20 °C Lagerung wurde bei 37 °C , pH 8,1 getestet, b) die 4 °C Lagerung bei 30 °C und pH 7,5. Beide enthalten 20 % Glycerol.

4.2.4.8 Cofaktoren

Mit Mg^{2+} war Rv1319ckat inaktiv (0 bis 15 mM). Mit Mn^{2+} wurde mit 2 mM die Sättigung erreicht (Abb. 4-42).

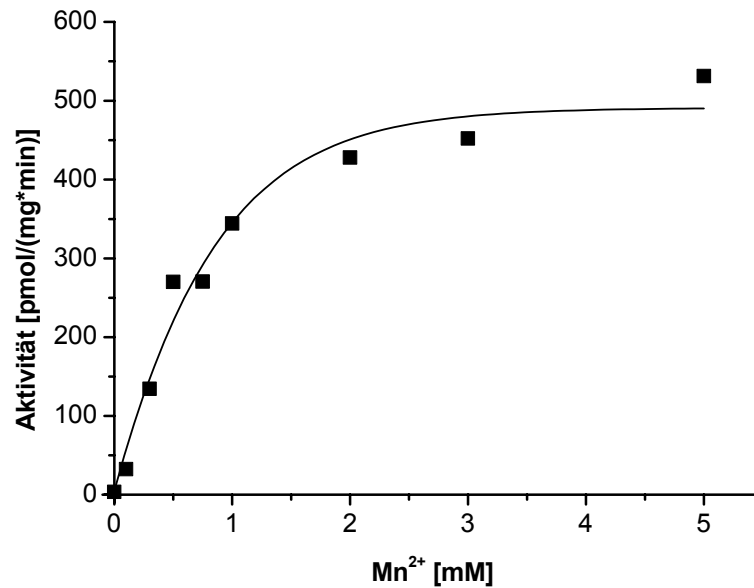


Abb. 4-42. Einfluß von Mn^{2+} auf Rv1319ckat (30 °C, pH 7,5, 4 µg Enzym).

Die Aktivierung durch Carbonat, die diesem Cyclasensubtyp aufgrund des D/T-Austausches eigentümlich ist, wurde für die mycobakteriellen Adenylatcyclasen hier nicht untersucht. In Kooperation mit Dr. Cann wurde jedoch für *cyaB* und Rv1319c eine solche Aktivierung gefunden⁴⁴.

4.2.4.9 Substratspezifität

Rv1319ckat zeigte Substratspezifität für ATP, GTP wurde nicht umgesetzt.

4.2.5 Einfluß der HAMP-Domänen

Neben dem katalytischen Zentrum besitzen die vier untersuchten mycobakteriellen Cyclasen eine HAMP Domäne.

Diese setzt sich aus zwei amphipathischen Helices (AH I und AH II) mit je 18 AAn und einen sie verbindenden 15 AAn langen Linker zusammen (Abb. 4-43). Der Übergang sowohl von der TM6 und in die Cyclase-Domäne ist fließend. In Anlehnung an die SMART-Ergebnisse wird der Bereich zwischen den Positionen M278 und R328 (SMART: M278-R330; Bezifferungen für Rv3645) festgelegt. Das nach Williams und Stewart³⁰ hochkonservierte P283 rückt durch den um eine AA verschobenen Start (nach SMART) von der 7. (Appleman und Stewart⁴⁵) auf die 6. Position in AH I, während das ebendort als essentiell für die Funktion der HAMP-

Domäne gefundene E310 vor AH II hier bei der Einteilung berücksichtigt wurde. Die Länge der beiden Helices wurde angeglichen.

Die Aminosäurekonservierungen der HAMP-Domäne sind, analog zu Tab. 4-1 und Tab. 4-2, bei Rv1318c-20c (>80 % Identität und Ähnlichkeit) größer als bei Rv3645 (>40 % Identität, >60 % Ähnlichkeit; Tab. 4-3, Abb. 4-43).

Zusammen mit späteren Ergebnissen (s.u.) weist dies auf eine Teilung der vier ACn in zwei Gruppen unterschiedlicher Eigenschaften hin, von der je eine AC untersucht wurde: Rv1319c, aufgrund ihres aktiven katalytischen Zentrums, und als einziges Enzym der zweiten Gruppe Rv3645, das als Holoenzym die größte Aktivität zeigte. Gestützt wird diese Einteilung durch die Lage der Gene im Genom, die durch die Namensgebung verdeutlicht wird.

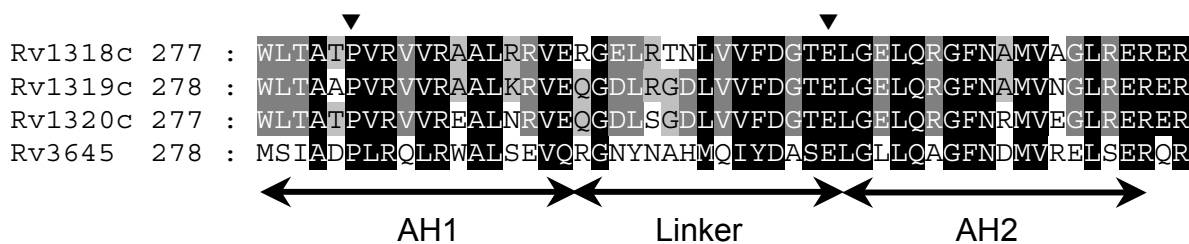


Abb. 4-43. HAMP-Domänen von Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c und Rv3645.

Der Alignmentausschnitt mit Konservierung. Die Doppelpfeile markieren die Unterteilung der Domäne; ▼markiert die im Text angesprochenen AAn P283 und E310.

%	Rv1318cHAMP	Rv1319cHAMP	Rv1320cHAMP	Rv3645HAMP
Rv1318cHAMP		86	82	44
Rv1319cHAMP	94		88	42
Rv1320cHAMP	88	88		42
Rv3645HAMP	60	60	64	

Tab. 4-3. Identische (fett) und ähnliche Konservierungen der AAn der HAMP-Domäne von Rv1318c-20c und Rv3645.

4.2.5.1 Wildtyp HAMP-Domäne

Nachdem die Holoenzyme und katalytischen Zentren von Rv1319c und Rv3645 unterschiedliche Ergebnisse lieferten, wurde die mögliche Regulation der katalytischen Aktivität durch die HAMP-Domäne untersucht. Dazu wurden lösliche „HAMPkat“-Konstrukte, bestehend aus HAMP-Domäne und katalytischem Zentrum, kloniert. Rv1319cHAMPkat und Rv3645HAMPkat begannen N-terminal jeweils bei Aminosäure 278 und endeten mit dem unveränderten Stop (Abb. 4-52).

Die Reinigung der Konstrukte war für Rv1319cHAMPkat möglich und ergab für Rv3645HAMPkat eine Anreicherung des Proteins (Abb. 4-44).

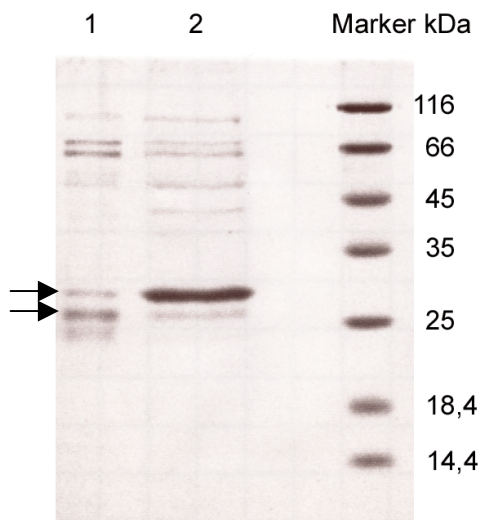


Abb. 4-44. SDS-PAGE-Gel (15 %) für Rv1319cHAMPkat und Rv3645HAMPkat.

Aufgetragene Proben mit erwarteter molekularer Masse:

1: Rv1319cHAMPkat 29 kDa

2: Rv3645HAMPkat 30 kDa

Rv1319cHAMPkat läuft mit knapp 25 kDa etwas zu niedrig.

Die Bestimmung der Proteinabhängigkeit wurde für die Konzentrationsbereiche 0,25-1,5 und 0,07-3,66 μM Protein getrennt durchgeführt (jeweils a) und b) in Abb. 4-45). Rv1319cKat zeigte ab 0,5 μM Protein eine lineare Aktivitätszunahme (vgl. Abb. 4-36), Rv1319cHAMPkat war nicht proteinabhängig.

Rv3645HAMPkat zeigte bis 1,5 μM Protein einen Anstieg, der mit dem gleichen Korrelationseffizienten von 0,97 sowohl als linear, als auch als sigmoidaler Kurvenanstieg gedeutet werden konnte. Bei weiter steigender Proteinkonzentration zeigten beide Konstrukte von Rv3645 eine sigmoide Kurve, bei der die Konzentration für die halbmaximale Aktivität von 1,7 μM Protein für Rv3645kat auf 1,1 μM für Rv3645HAMPkat linksverschoben war. Diese Linksverschiebung ergäbe sich auch bei einer linearen Steigung. Folglich scheint das aktive Zentrum von Rv3645 durch die HAMP-Domäne aktiviert, das von Rv1319c hingegen gehemmt zu werden.

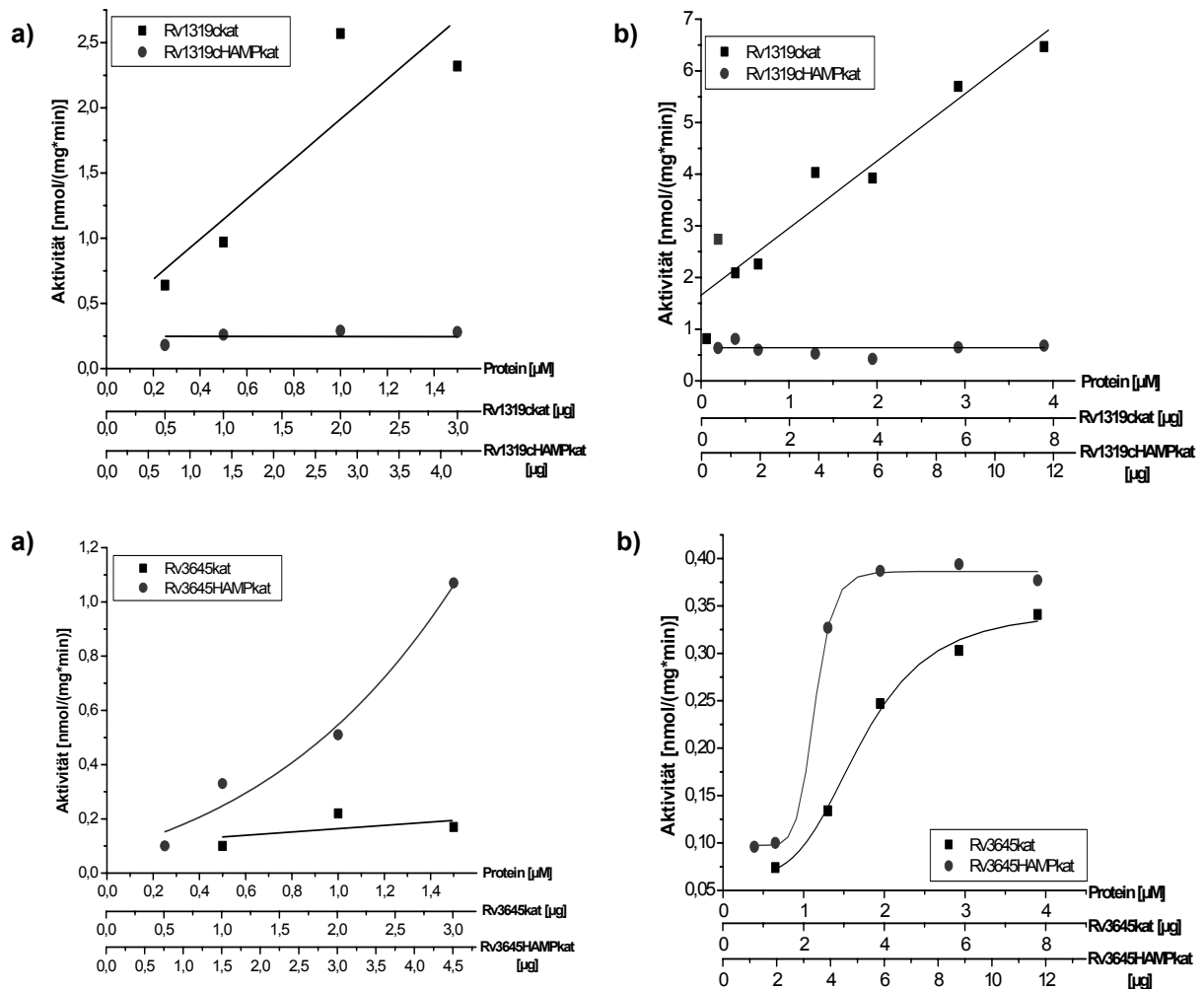


Abb. 4-45. Proteinabhängigkeit von Rv1319ckat und Rv1319cHAMPkat (oben) bzw. Rv3645kat und Rv3645HAMPkat (unten; je: 75 μM ATP, 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 8,1; je n=1).

Bereiche: a) von 0,25-1,5 μM Protein, b) bis 4 μM . Man beachte die unterschiedlichen Maßstäbe, die sich aus den unterschiedlichen Molekulargewichten ergeben.

Die Kinetiken der HAMP-Domänen Konstrukte zeigten Unterschiede (Übersicht: Abb. 4-46). Für Rv1319cHAMPkat und Rv3645kat wurden die Ergebnisse durch die Lineweaver-Burk Linearisierungen ermittelt. Für Rv3645HAMPkat mußte die Lineweaver-Burk Linearisierung für allosterische Proteine angewendet werden (Abb. 4-47), da die übliche Linearisierung die y-Achse unterhalb des Nullwerts schnitt. Deswegen wurde statt des K_M der K_M^* ermittelt (7.2.2).

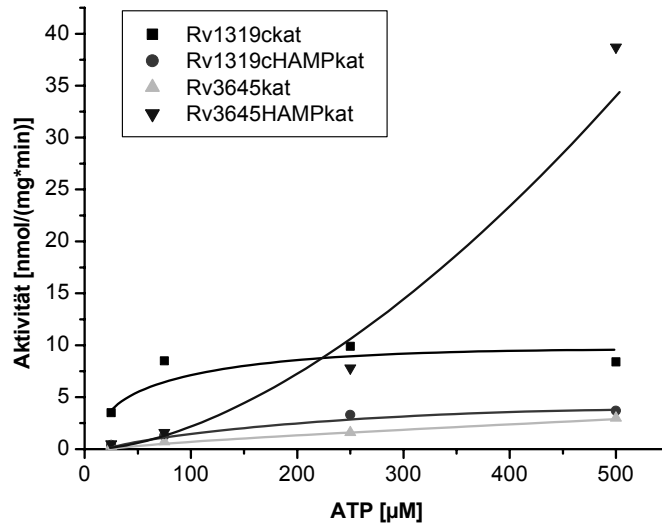
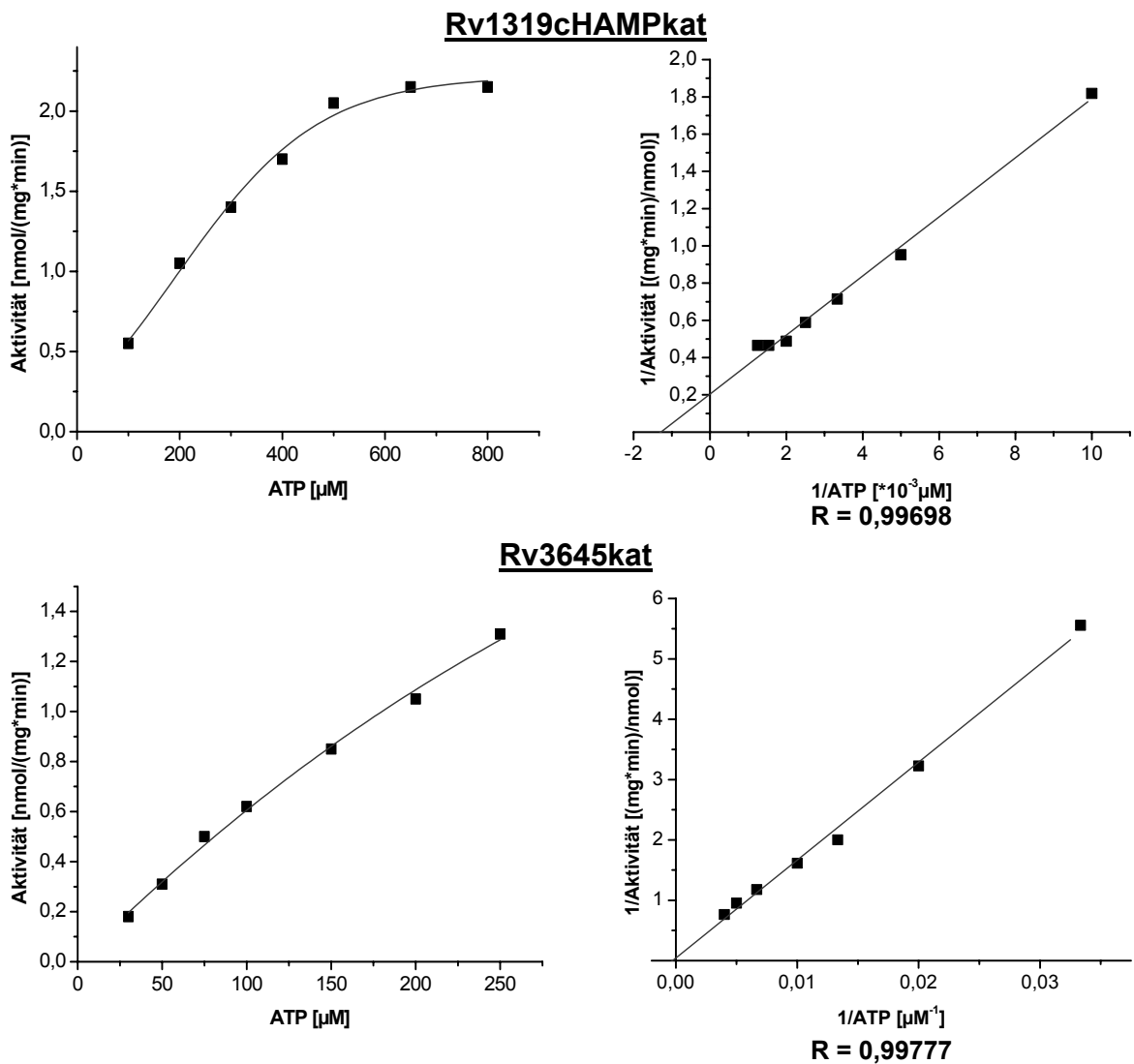


Abb. 4-46. zur Übersicht: Michaelis-Menten-Auftragung der katalytischen Zentren mit und ohne HAMP-Domäne von Rv1319c und Rv3645 (2 μM Protein, pH 8,1, 37 °C, n=1).



Rv3645HAMPkat

mit Lineweaver-Burk Auftragung für allosterische Proteine

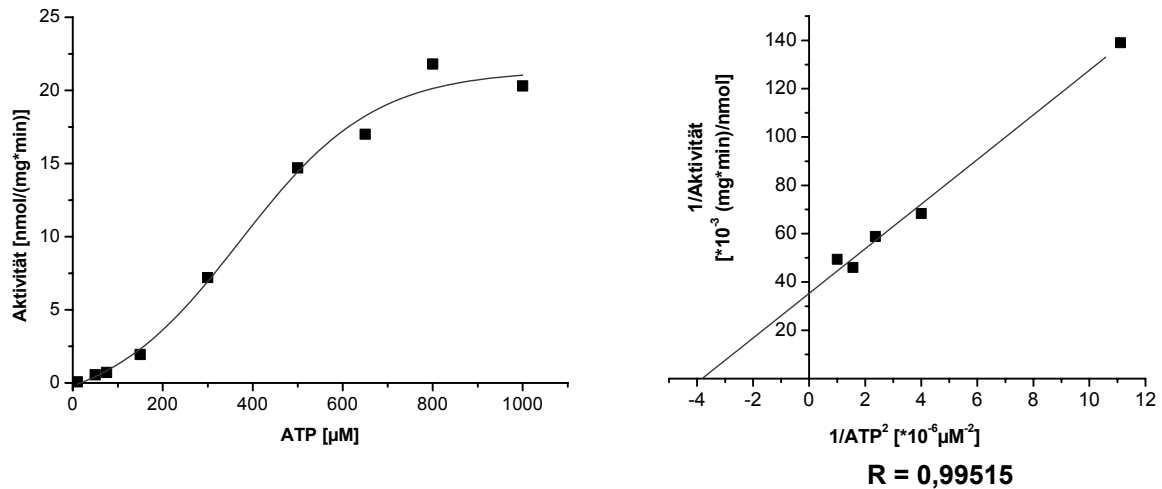
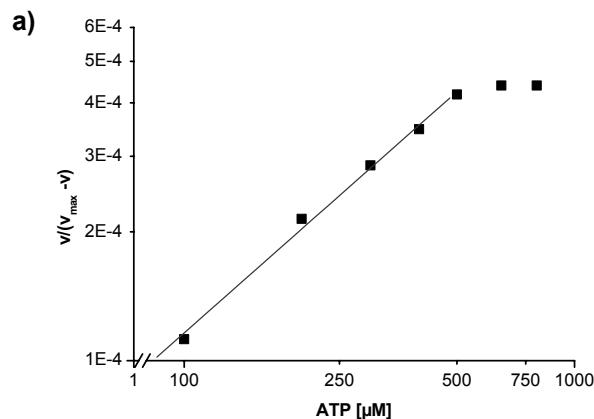


Abb. 4-47. mit Vorseite: Kinetiken von Rv1319cHAMPkat, Rv3645kat und Rv3645HAMPkat (2 µM Protein, 37 °C, pH 8,1; n = 2).

Rv3645HAMPkat: Michaelis-Menten-Kurve zusammengesetzt aus zwei AC-Tests (10-150 µM ATP, 2,2 µM Protein und 300-1000 µM ATP, 2 µM Protein, je n=1); die Auswertung wurde für Werte ab 300 µM ATP durchgeführt, da sie den Michaelis-Menten-Bedingungen gehorchen.

Der Hill-Plot von Rv1319cHAMPkat und Rv3645HAMPkat zeigte einen Kooperationswechsel der katalytischen Zentren (Abflachung der Kurven). Rv1319ckat war nicht kooperativ (4.2.4.4, Hill-Koeffizient: $Q_{\text{Hill}} \approx 1$). Für Rv3645HAMPkat wurde mit $Q_{\text{Hill}} = 2$ eine positive Kooperation gefunden. Rv1319cHAMPkat und Rv3645kat hatten einen Q_{Hill} von 0,8 bzw. 0,9 (Abb. 4-48).

Rv1319cHAMPkat

Steigung = 0,80646; R = 0,99761

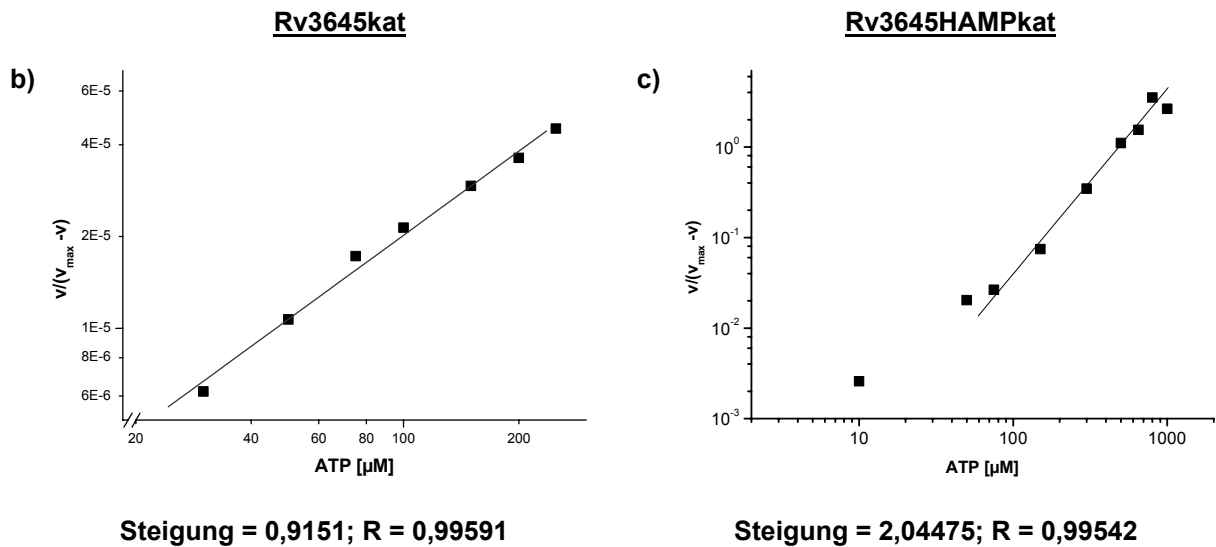


Abb. 4-48. mit Vorseite: Auftragungen nach Hill von Rv1319cHAMPkat, Rv3645kat und Rv3645HAMPkat (2 μM Protein, n = 2).

Konstrukt	v_{max} [nmol/(mg*min)]	K_M [μM ATP]	K_M^* [μM ATP]	k_{cat} [*10 ⁻³ s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]	Q_{Hill}
Rv1319ckat	10	50		1,2	24	1,1
Rv1319cHAMPkat	5	780		0,9	1,2	0,8
Rv3645kat	23	3750		2,8	0,7	0,9
Rv3645HAMPkat	28		500	5,1	10	2,0

Tab. 4-4. Zusammenfassung der kinetischen Daten.

Für Rv3645HAMPkat wurde der K_M^* -Wert für die Berechnung der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) herangezogen (7.2.2 und 7.4). Die Proteinkonzentration betrug jeweils 2 μM ; Q_{Hill} = Hill-Koeffizient.

Die Ergebnisse deuten an, daß die HAMP-Domänen einen gegenteiligen Effekt ausüben. Rv1319ckat wird durch seine HAMP-Domäne gehemmt. v_{max} wird auf die Hälfte erniedrigt, K_M steigt 16-fach. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) sinkt um 95 %. Bei Rv3645kat bleibt durch die HAMP-Domäne v_{max} etwa gleich, K_M wird um das 7,5-fache erniedrigt, die katalytische Effizienz um das 14-fache gesteigert. Der Hill-Koeffizient steigt um 1,1.

Detergenzien führten bei den Holoenzymen zu Aktivitätsänderungen (Abb. 4-28). Dadurch stellte sich die Frage, ob es sich bei diesem Effekt ausschließlich um eine

Denaturierung des Enzyms handelte, oder ob sich zusätzlich auch der Einfluß der HAMP-Domäne geändert hatte.

Die vier ACn Rv1319ckat, Rv1319cHAMPkat, Rv3645kat und Rv3645HAMPkat wurden mit Triton X 100 bzw. CHAPS getestet. Triton X 100 hatte keinen Einfluß (0, 1 und 2 %). Für CHAPS (0 bis 2 %) war Rv3645HAMPkat (10 % Restaktivität bei 1 % CHAPS) anfälliger als Rv3645kat (60 % Restaktivität, 1 % CHAPS; Abb. 4-49).

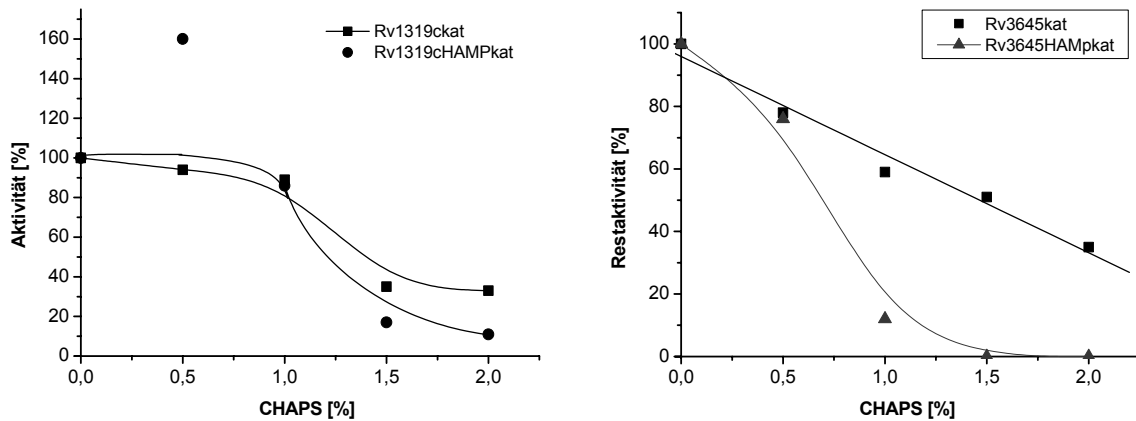


Abb. 4-49. Einfluß von CHAPS auf Rv1319ckat, Rv1319cHAMPkat, Rv3645kat und Rv3645HAMPkat (37 °C und pH 8,1; n=1).

Die pH-Optima waren für Rv3645HAMPkat pH 8,1 und für Rv1319cHAMPkat pH 8,4 (Abb. 4-50).

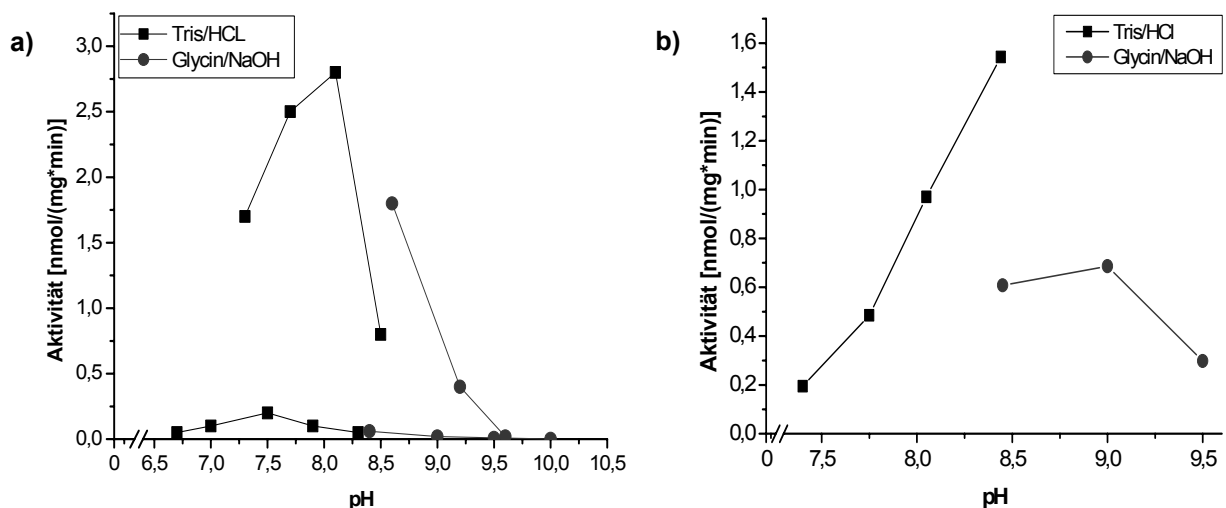


Abb. 4-50. pH-Abhängigkeit von a) Rv3645HAMPkat und b) Rv1319cHAMPkat.

Die Tris/HCl- und Glycin/NaOH-Werte für Rv3645HAMPkat wurden zweimal bei 37 °C gemessen. Die Kurven mit den geringen Aktivitäten stammen aus einer Reinigung ohne Waschen mit 400 mM NaCl. Die Werte für Tris/HCl sind temperaturkorrigiert, die pH-Werte wurden bei RT eingestellt.

Das Temperaturoptimum von Rv3645HAMPkat betrug 37 °C. Der Arrhenius-Plot ergab eine Aktivierungsenergie von $E_A = 83$ kJ/mol. Rv1319cHAMPkat war weniger temperaturempfindlich (breitere Kurve), und hatte ein Maximum bei 40 °C. Die Aktivierungsenergie betrug 36 kJ/mol (Abb. 4-51).

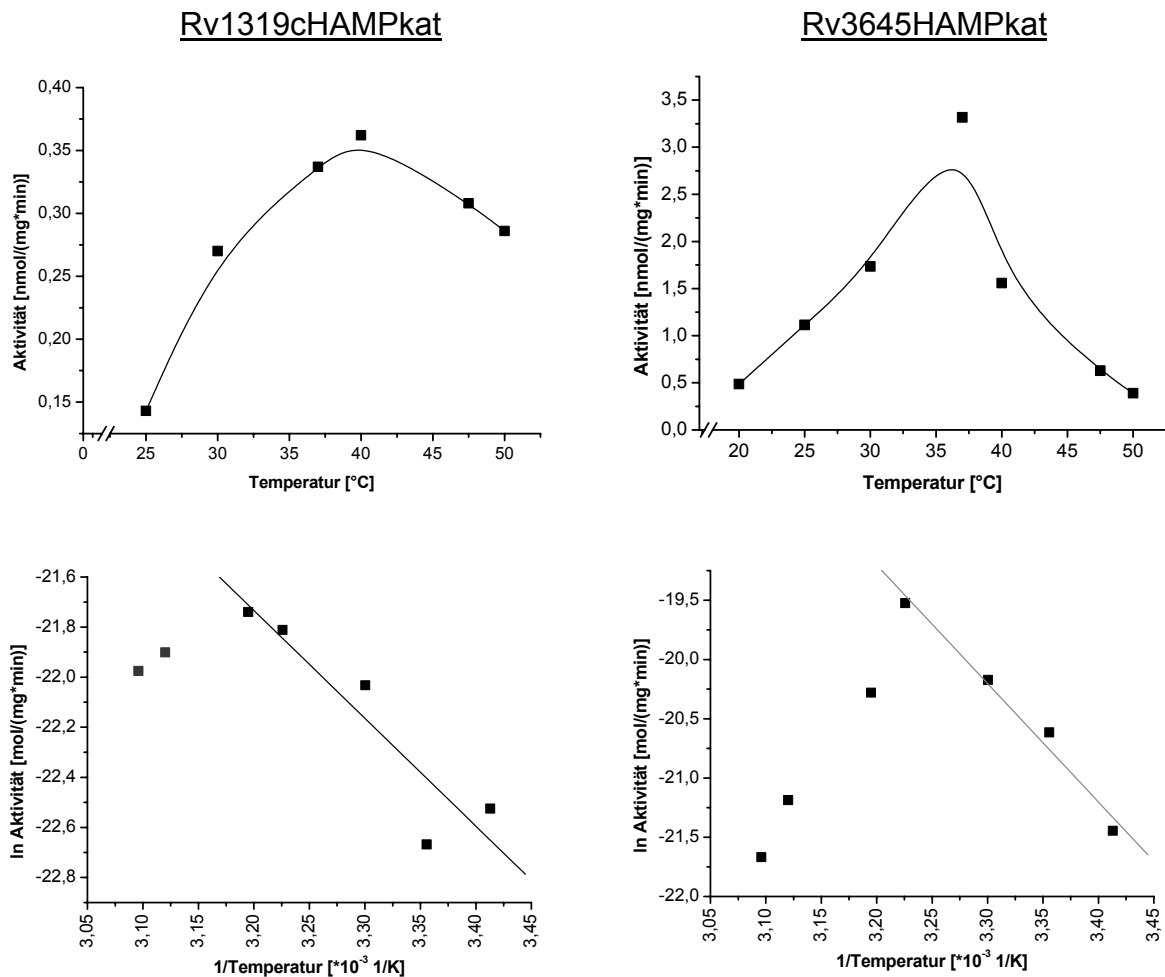


Abb. 4-51. mit Vorseite: Temperaturabhängigkeit der Aktivität (oben) und deren zugehörige Arrheniusauftragungen von Rv1319cHAMPkat und Rv3645HAMPkat.

4.2.5.2 Austausch der HAMP-Domänen

Da die HAMP-Domänen die Aktivität ihres jeweiligen katalytischen Zentrums gegenteilig beeinflussten, wurden diese zwischen Rv3645kat und Rv1319ckat ausgetauscht. Die Spleißstelle (Abb. 4-52, Markierung für RvxHAMPykat) wurde in den hochkonservierten Übergangsbereich zwischen HAMP- und katalytischer Domäne gelegt.

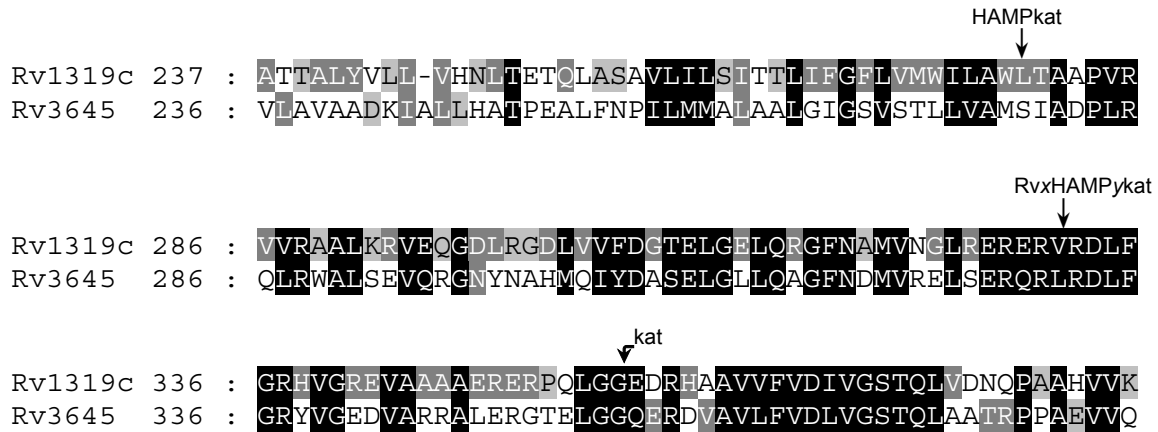
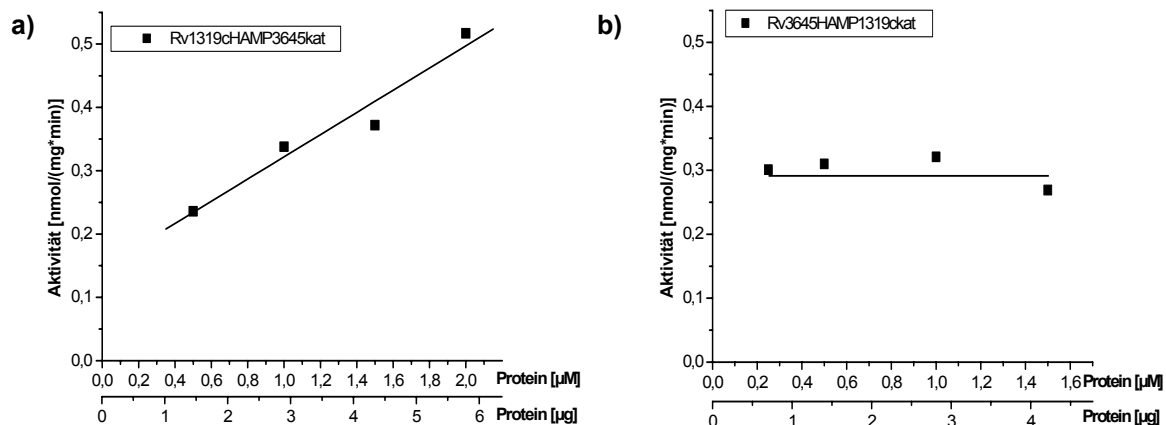


Abb. 4-52. Alignmentausschnitt der HAMP- und katalytischen Domäne von Rv1319c und Rv3645 mit den Starts der verschiedenen Konstrukte.

Pfeile über den Sequenzen bezeichnen den N-terminus des klonierten katalytischen Zentrums allein (kat), mit zusätzlicher HAMP-Domäne (HAMPkat) und die Spleißstelle ihres Austauschs (RvxHAMPykat mit x,y = Nr. der AC). Graustufungen analog zu Abb. 4-22.

Die Proteinabhängigkeit (0,05 bis 2 μM Protein), zeigte für Rv1319cHAMP3645kat einen linearen Anstieg der Aktivität (Abb. 4-53). Die Aktivität von Rv3645HAMP1319ckat (0,25 bis 1,5 μM Protein) ist nicht proteinabhängig. Die Aktivitäten liegen wie bei den wtHAMP-Domänen im Bereich unter 1 nmol/(mg*min). Rv3645HAMP1319ckat wurde deutlich sichtbar exprimiert, ließ sich aber nur schlecht reinigen.



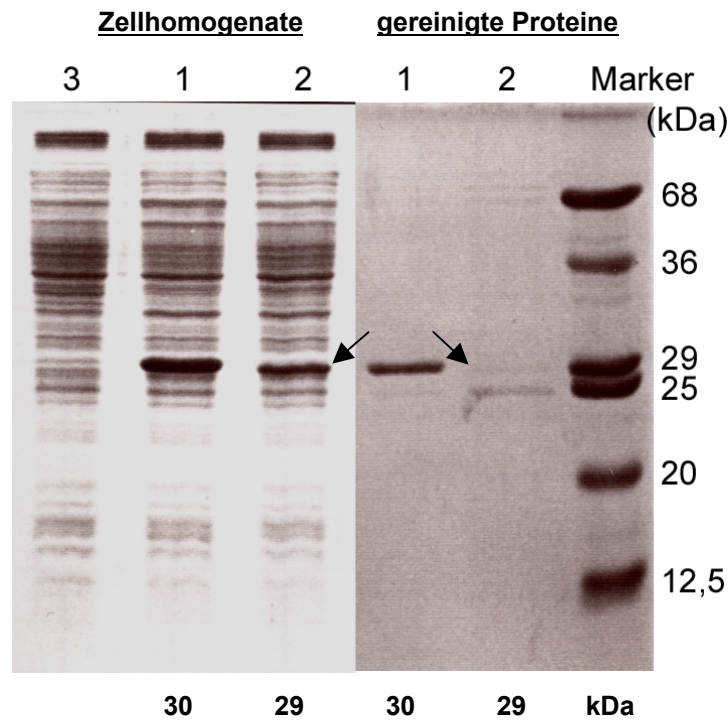


Abb. 4-53. mit Vorseite: Proteinabhängigkeit (oben) und SDS-PAGE-Gele (15 %) der gereinigten Proteine.

a) und 1 = Rv1319cHAMP3645kat, b) und 2 = Rv3645HAMP1319ckat (Pfeil), 3 = pQE

Die Proteine wurden mit nur einmal mit Puffer P5 gewaschen und mit 80 μ l Elutionspuffer eluiert. Die erwarteten Größen sind unter dem Gel genannt.

Die Michaelis-Menten Auftragung der Meßergebnisse von Rv1319cHAMP3645kat war durch die üblichen Linearisierungen nicht sinnvoll auswertbar (Abb. 4-54). Sie zeigten entweder eine negative Steigung bei steigender ATP-Konzentration (Hanes-Woolfe) oder schnitten nach Lineweaver-Burk die y-Achse unterhalb des Nullwerts.

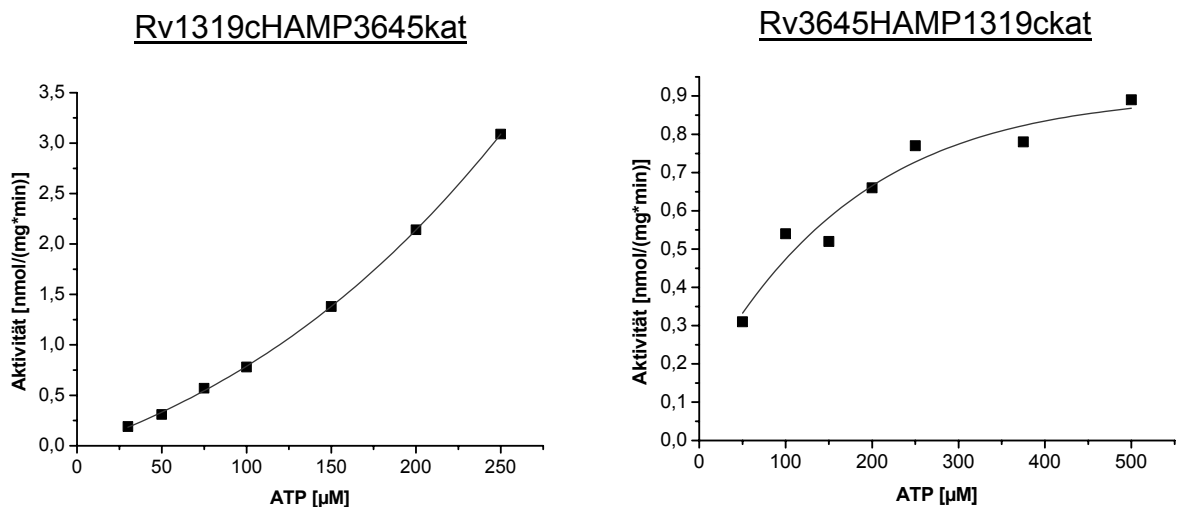


Abb. 4-54. Michaelis-Menten Diagramm für Rv1319cHAMP3645kat und Rv3645HAMP1319ckat (37°C, 6 μ g Protein, pH 8,1; n=2).

Die Michaelis-Menten Auftragung für Rv3645HAMP1319ckat (Abb. 4-54) ergab nach Linearisierung (Hanes-Woolfe) einen K_M von 130 μM ATP und eine $v_{\text{max}} = 1,1$ nmol/(mg*min) (Abb. 4-55). Der Hill-Koeffizient war 0,4.

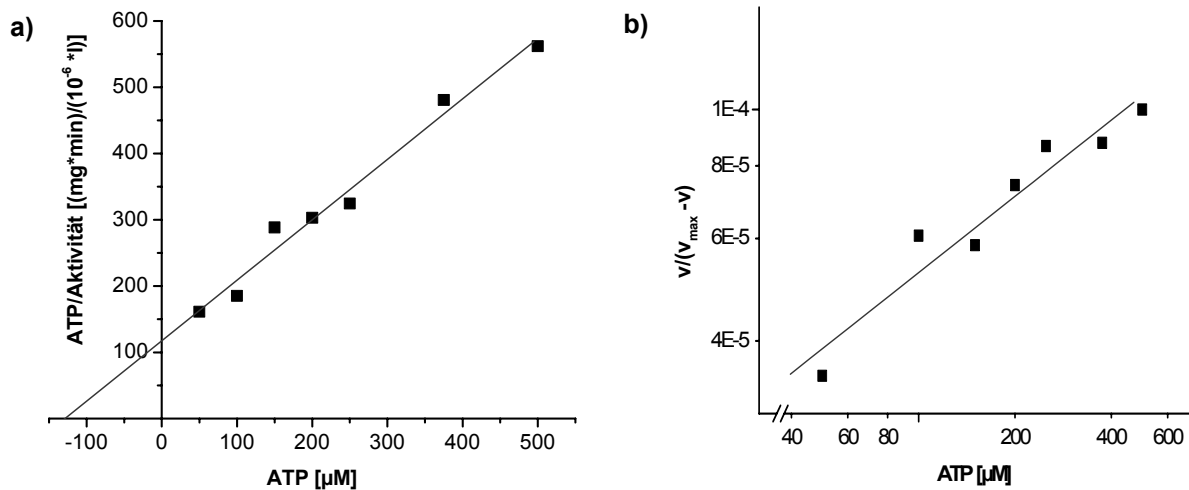


Abb. 4-55. a) Hanes-Woolfe Auftragung und b) Hill-Plot für Rv3645HAMP1319ckat.

$K_M = 130 \mu\text{M}$ und $v_{\text{max}} = 1,1 \text{ nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ ($R = 0,98921$); $Q_{\text{Hill}} = 0,4$ ($R = 0,96207$).

4.2.5.3 Mutationen der HAMP Domäne

Eine Auftragung der α -Helices der HAMP-Domäne als zweidimensionales Rad ergab eine amphipathische Oberfläche³⁰. Diese Eigenschaft faßte verschiedene Linker der methyl-akzeptierenden chemotaktischen Proteine, die ansonsten nur eine geringe Sequenzähnlichkeit aufwiesen, in der Gruppe der HAMP-Domäne zusammen. Die hydrophobe Seite der amphipathischen Helix II (AH II), sowie das Prolin zu Beginn der AH I waren hochkonserviert. Die hydrophobe Oberfläche wurde von sich in Siebenerschritten wiederholenden konservierten hydrophoben AAn gebildet.

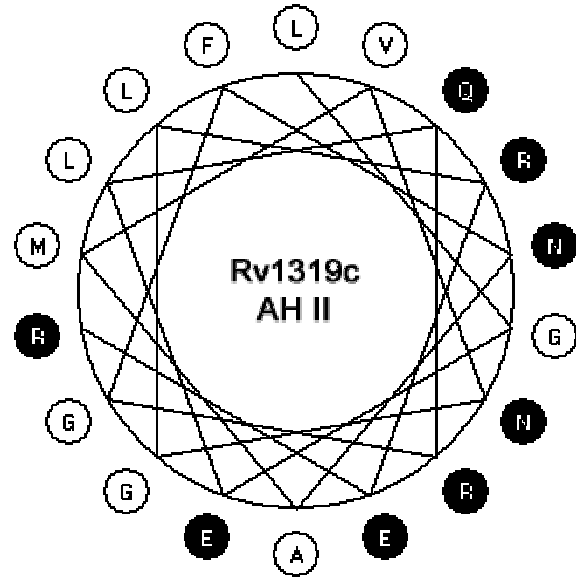
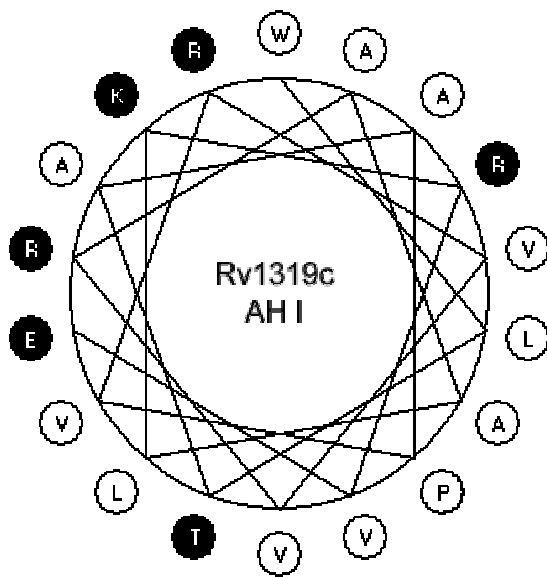
Die Untersuchung von Einzelmutationen ergab u.a. eine essentiell funktionelle Rolle für das Glutamat⁴⁵ kurz vor der AH II. Die Entfernung mehrerer aufeinanderfolgender AAn ergab für AH I und AH II unterschiedliche oft nicht mehr regulierbare Enzymaktivitäten.

Das vorgeschlagene Modell des Artikels³⁰ geht von einem extrazellulären Signal aus, das durch die vorausgehende Transmembranspanne auf die HAMP-Domäne übertragen wird, die dann durch eine Konformationsänderung das Signal an die ausführende Domäne (hier AC) weitergibt.

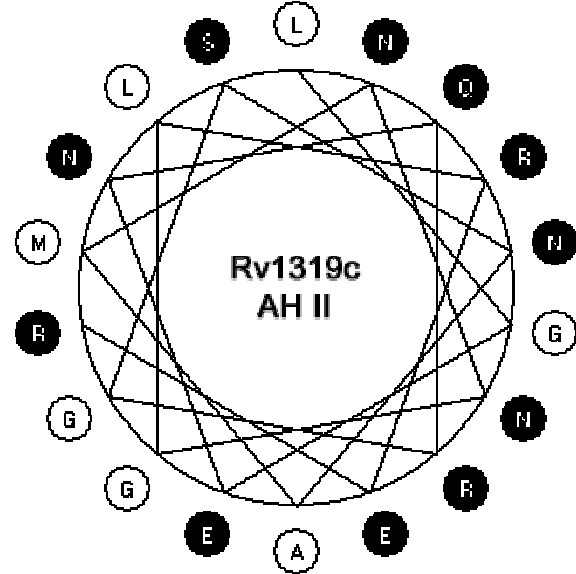
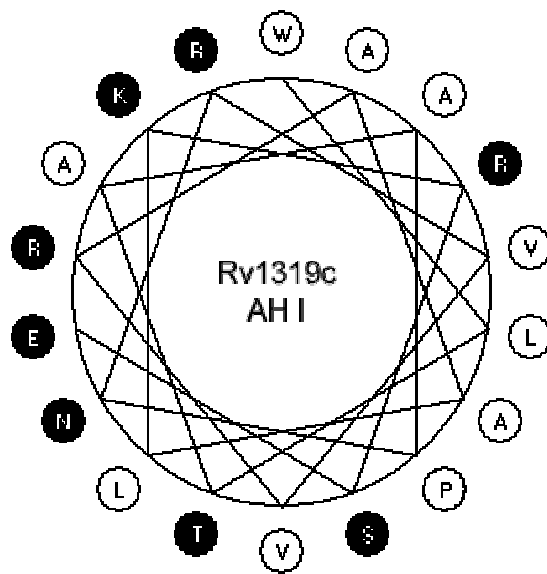
Die zweidimensionale Radauftragung der HAMP-Domänen ergibt für Rv1319c und Rv3645 ebenfalls eindeutig amphipathische Helices (Abb. 4-56), die die konservierten AAn Prolin (in AH I) und Glutamin (unmittelbar vor AH II) enthielten (vgl. Fig. 1 in²⁹ für Rv1318c). Der hydrophobe Bereich umfaßte jeweils sechs AAn (Abb. 4-56). Da die getesteten HAMP-Konstrukte löslich waren, konnten deren intramolekulare Wechselwirkungen durch den hydrophoben Bereich vermittelt werden. Es wurden je drei der sechs hydrophoben AAn gegen hydrophile ausgetauscht, um die hydrophobe Seite zu zerstören. Dabei wurden die polaren AAn berücksichtigt, die hauptsächlich in der Domäne von Rv1319c und Rv3645 vorkamen: N und S. Bei Rv1319c war die Position 280 schon mit einem Threonin besetzt, so daß diese Position in Rv3645 angeglichen wurde.

Da die Sequenz der HAMP-Domäne zwischen Rv1318c-20c hochkonserviert ist, wird nur Rv1319c betrachtet (vgl. Abb. 4-43 und Tab. 4-3).

unverändert:

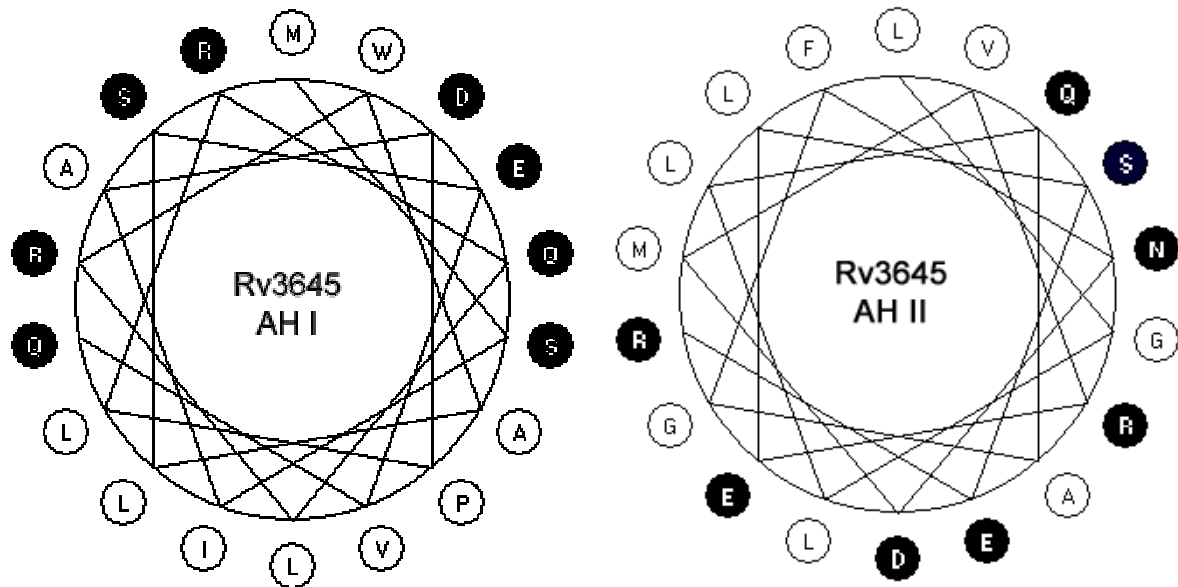


mutiert:



		N		S		N	S	N
		▼		▼		▼	▼	▼
Rv1319c	275	:	ILAWLTAAPVRRVRAALKRVEQGLRGLDVLVFDGTELGE	LRG	FNAMVNL	RLRERER		
Rv3645	275	:	LVAMSIADPLRQLRWALSEVQRGNNAHMQIYDASELGLL	QAGFND	MVELSERER			
		▲		▲		▲	▲	▲
		T	N	S		N	S	N

unverändert:



mutiert:

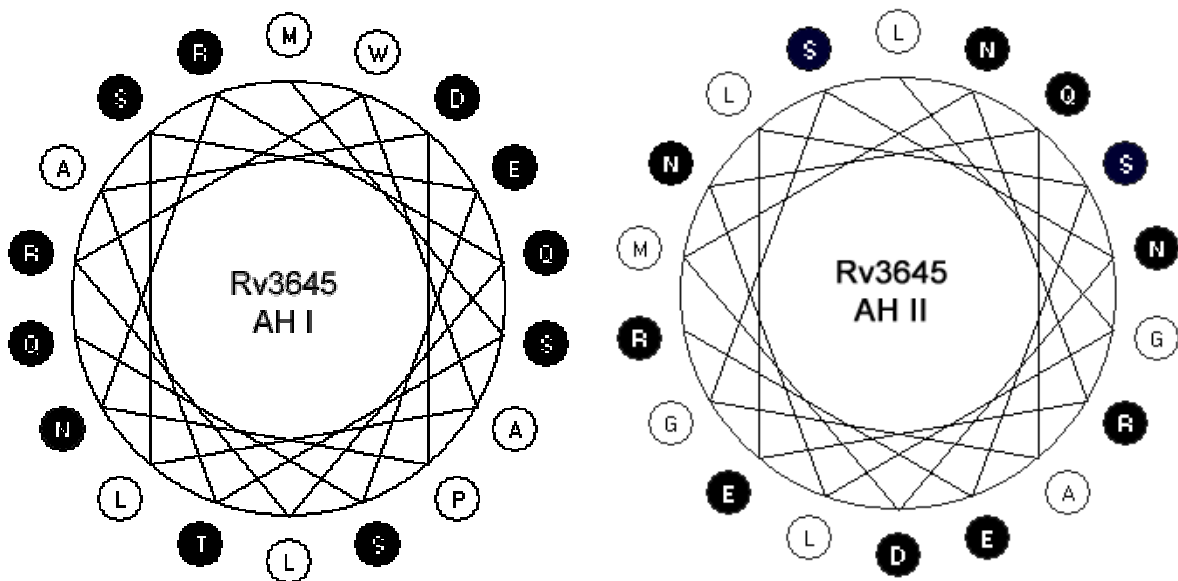


Abb. 4-56. mit Vorseite: Radprojektionen der amphipathischen Helices für Rv1319c und Rv3645.

weiß = hydrophob, invers = hydrophil.

Oben bzw. unten: Unveränderte (oberhalb) und mutierte Aminosäureanordnung von Rv1319c bzw. Rv3645. Die jeweils erste AA der Helix steht oben.

Mitte: Die Sequenz der HAMP Domänen für Rv1319c und Rv3645 zeigt sowohl die konservierten, als auch die ausgetauschten AAn darüber bzw. darunter. Die AAn der Projektionen sind unterstrichen.

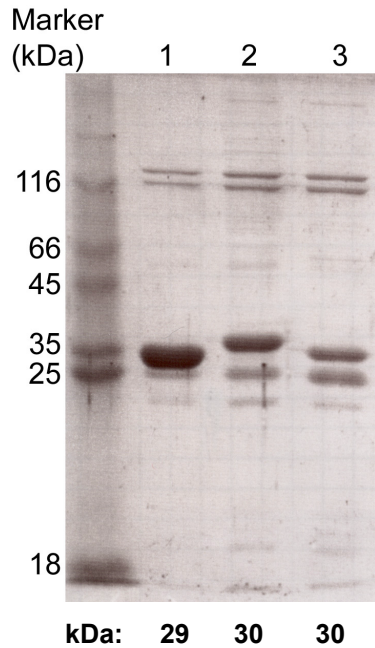


Abb. 4-57. SDS-PAGE-Gel (12,5 %) von Rv1319cmutHAMPkat (1), Rv3645mutHAMPkat (2) und Rv3645HAMPkat (3).

Erwartete Größen stehen unter dem Gel.

Die Konstrukte ließen sich löslich exprimieren und anreichern (Abb. 4-57).

Die mutierte HAMP Domäne steigerte in beiden Fällen die Aktivität im Vergleich mit der wtHAMP-Proteinen (Rv1319c: 2,5-fach, Rv3645HAMPkat: 4,5-fach). Rv3645mutHAMPkat stellte damit für diese AC das aktivste Konstrukt dar (Abb. 4-58).

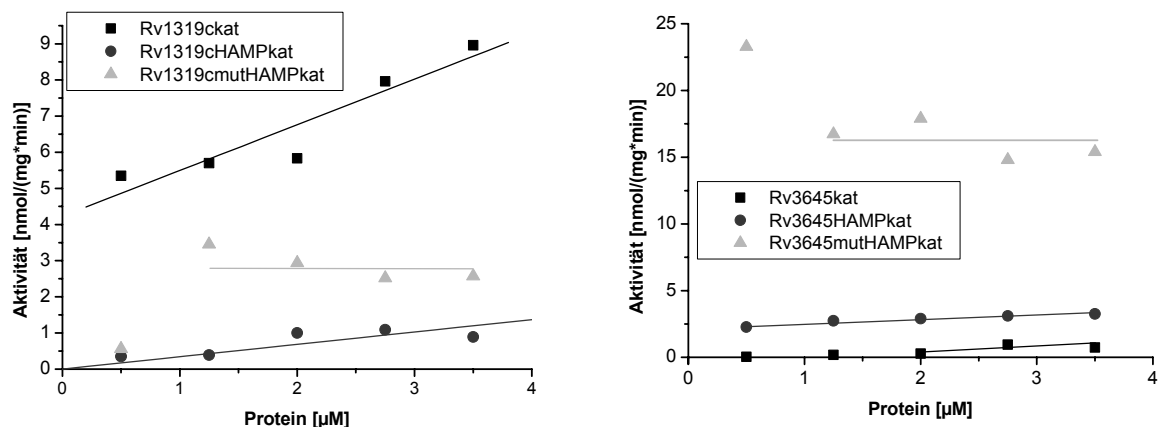


Abb. 4-58. Proteinabhängigkeit der HAMP-Konstrukte und katalytischen Zentren von Rv1319c und Rv3645 (n=2).

Links: Für Rv1319ckat zeigen sich lineare Kurven.

Rechts: Die sigmoiden Kurvenverläufe von Rv3645 (Abb. 4-45) sind hier linear, was sowohl am Maßstab, als auch an der langen Lagerung von 6 Monaten (-20 °C, 20 % Glycerol) liegen könnte.

Ergebnisse

Der aktivierende Effekt der mutierten HAMP Domäne sollte noch mit den Holoenzyme untersucht werden.

Dazu wurde die mutierte HAMP-Domäne mit dem katalytischen Zentrum hinter der 6. TM angefügt (vgl. Abb. 4-22). Dies führte zu den Konstrukten Rv1319cmutHAMPHolo und Rv3645mutHAMPHolo.

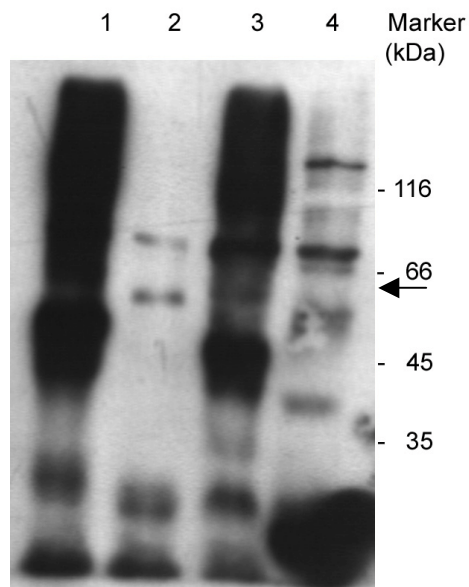


Abb. 4-59. Western Blot von Rv1319cmut HAMPHolo (1), Rv3645mutHAMPHolo (2), Rv1319c (3) und Rv3645 (4).

Primärer Antikörper: anti-Rv3645HAMPkat

Die erwartete Größe beträgt für alle ~60 kDa (Pfeil). Aufgetragen wurden je 40 µg Gesamtprotein der Membranpräparation.

Der Western-Blot der exprimierten Holoenzyme mit und ohne mutierter HAMP-Domäne zeigte nur für Rv3645 Banden, die auf der erwarteten Höhe von ca. 60 kDa liefen. Darüber hinaus waren noch einige Abbruchprodukte und für Rv3645 möglicherweise ein Dimer zu erkennen. Die Spuren für beide Rv1319c Konstrukte wurden wieder vollständig überstrahlt.

Die Membranpräparation erbrachte für Rv1319c und Rv1319cmutHAMPHolo die gleiche Aktivität von ca. 10 pmol/(mg*min).

Rv3645 wurde durch die mutierte HAMP-Domäne inaktiviert. Die Aktivität von Rv3645 (53 pmol/(mg*min)) sank für Rv3645mutHAMPkat um 98 % (0,9 pmol/(mg*min)).

4.2.6 Kristallisierung

Da die HAMP Domäne einen entscheidenden Einfluß auf die Funktion des katalytischen Zentrums von Rv3645 hatte, wurde das Konstrukt Rv3645HAMPkat zur Kristallisation ausgewählt. Nach der Reinigung wurde das Protein auf ca. 13 mg/ml konzentriert. Die Kristallisation wurde mit verschiedenen „Crystal Screen“ (CS) I + II Puffern versucht. Dabei wurden nach 35 Tagen bei 16 °C und weiteren 18 Tagen nach Umsetzung auf 12 °C kristallartige, sternförmig angeordnete, dünne, lange Nadeln mit Puffer „CS 19“ (30 % Isopropanol, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 0,2 M Ammoniumacetat) erhalten.

Zur Optimierung wurde die Kristallisation mit variierenden Pufferbestandteilen (bei pH 8,0) bei 12 bzw. 4 °C durchgeführt. Bis jetzt wurden aber nur dieselben nadelförmigen Kristalle erhalten. Es wurde u.a. versucht, einige der Kristalle zu resuspendieren und als Kristallisationskeime in neuen Ansätzen zu verwenden (Abb. 4-60). Die erhaltenen Kristalle sind noch zu klein für eine Röntgenbeugung.

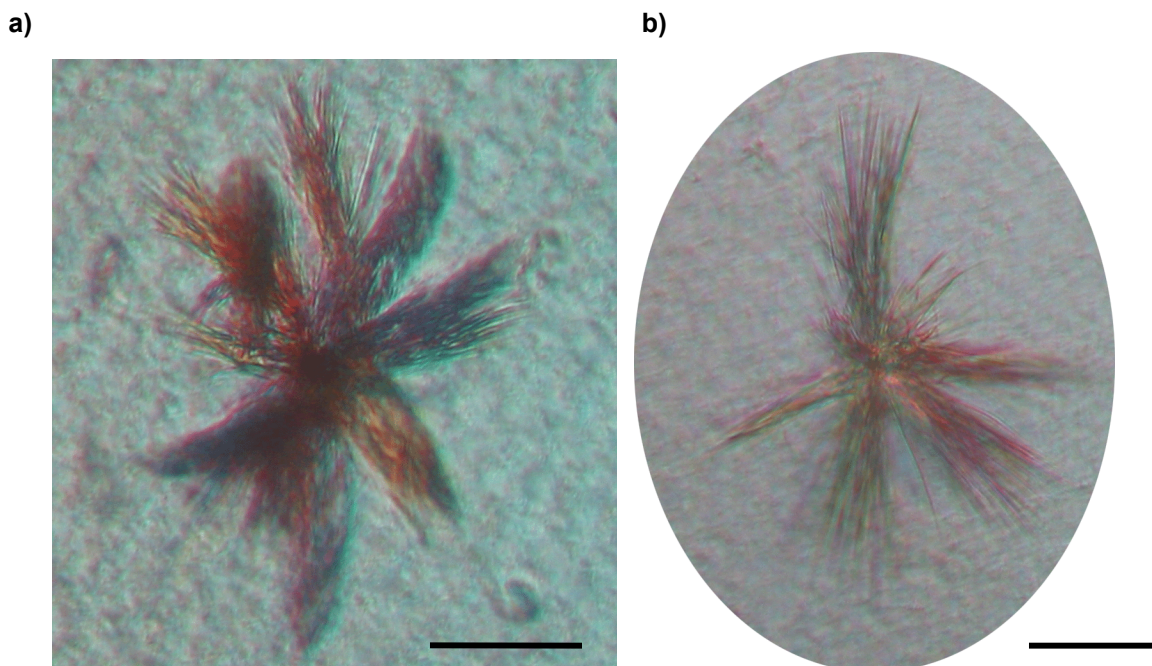


Abb. 4-60. Nadelförmige Kristalle (Balken: ca. 0,05 mm).

a) Platte: IX, Well: C1: 12 °C, 30 % Isopropanol, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,1, 0,1 M Ammoniumacetat, Protein mit homogenisierten Impfkristallen (Durchmesser ca. 0,15 mm; ca. 2 Monate; Vergrößerung: 20 x 10).

b) Platte: IX, Well: A1: 12 °C, CS 19: 30 % Isopropanol, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5, 0,2 M Ammoniumacetat, Protein mit homogenisierten Impfkristallen (ca. 0,125 x 0,2 mm; ca. 2 Monate; Vergrößerung: 20 x 10).

5 Diskussion

Ein Ziel der Arbeit war, die Adenylatcyclase *cyaB* von *Stigmatella aurantiaca* zu charakterisieren. Sie enthielt, wie die Paramecium-AC, eine Hydroxy-Aminosäure (*cyaB*: T293, *paraAC*: S683) anstelle eines Aspartats im katalytischen Zentrum (Abb. 1-2). Als Modell zur Ursachenforschung für die Inaktivität der Paramecium-AC sollten verschiedene chimäre Konstrukte dienen. Der Einfluß der Längenkonservierung im katalytischen Zentrum wurde durch die Entfernung einer Aminosäure überprüft. Die Auswirkungen des TPR wurden durch C-terminale Addition dieser Domäne sowohl von Paramecium als auch von Anabaena an *cyaB* untersucht. Schließlich wurde von PD Dr. J. Linder ein Austausch des N-terminus der katalytischen Domäne untersucht (5.1.4). Als dies aber keine positiven Ergebnisse lieferte, wurden nach der Charakterisierung des katalytischen Zentrums von *cyaB* (5.1.3) vier mycobakteriellen Adenylatcyclasen, die ebenfalls den D nach T Übergang aufwiesen, untersucht (5.2). Hierbei wurde dem regulatorischen Einfluß der HAMP-Domäne besondere Aufmerksamkeit geschenkt (5.2.4f).

5.1 *Stigmatella aurantiaca*

5.1.1 Holoenzyme

A. Danchin beschrieb die Klonierung von *cyaB*¹⁹ und bestimmte den Start (Abb. 4-2, VLQGGH...) über eine 11 Basen upstream liegende mögliche Ribosomenbindungsstelle. Er berichtete folgende Werte für zellfreie Extrakte: $Mn^{2+} = 25$ mM für maximale Aktivität, $K_M = 110$ μ M, Gesamtaktivität bzw. „ v_{max} “ = 320 pmol/(mg*min) und ein pH-Optimum von 6,5. 35 mM EDTA sorgten aber für eine Komplexierung fast aller Kationen, was wahrscheinlich den hohen Bedarf an Mn^{2+} erklärt.

Gegenüber der Genbanksequenz fand ich einen AA Austausch (P163R), wahrscheinlich ein Sequenzierfehler von Danchin (Abb. 4-2). Damit enthielt das Protein des in dieser Arbeit vorliegenden Gens das konservierte R163, das die untersuchten ACn von *M. tuberculosis* an derselben Position enthalten. Untersuchungen der weiteren Umgebung vor dem Start ergaben 142 AAn upstream jedoch zwei weitere mögliche Start-Triplets für V-142 und M-136. Sie wurden als *cyaBV1* und *cyaBM7* kloniert. Sowohl das Protein nach Danchin (*cyaB*), als auch die

verlängerten Holoenzyme waren inaktiv (4.1.1). Die N-terminale Verlängerungen ergaben anscheinend ebenso wie das Holoenzym keine korrekte Faltung.

5.1.2 Verkürzungen

Wegen des negativen Ergebnisses mit dem Holoenzym wurden die katalytischen Zentren in verschiedenen Längenvarianten exprimiert. Von den vier Konstrukten war *cyaB9* (165-352 AA) das kleinste. Es war unlöslich und inaktiv. Die im Vergleich zu *cyaB8* (160-352) entfernte Aminosäuresequenz „GEKRE“ scheint daher einen Einfluß auf die Faltung, Löslichkeit und Aktivität zu haben. *cyaB7* (154-352) war doppelt so aktiv wie *cyaB8*. Die sechs AAn „DTVVLT“ (*cyaB7*) vor „GEKRE“ (*cyaB8*) ermöglichen vielleicht eine bessere Faltung oder fördern die Dimerisierung (Abb. 4-2). Weitere 17 AAn N-terminal bei *cyaB6* (137-352) brachten keine höhere, sondern eine verschlechterte Aktivität (4.1.2).

5.1.3 Charakterisierung von *cyaB8*

Da sie das kürzeste noch aktive Konstrukt war, wurde die weitere Charakterisierung mit *cyaB8* durchgeführt. v_{\max} (19 [nmol/(mg*min)]) und K_M (27 μ M ATP) wichen stark von früher berichteten Werten ($K_M = 110 \mu$ M, „ v_{\max} “ = 320 pmol/(mg*min)) ab¹⁹, d.h. hier ist das katalytische Zentrum 60-fach aktiver, bei einem um 75 % niedrigeren K_M . Der Hill-Koeffizient von *cyaB8* war hier 0,8 und weist auf eine mögliche leichte negative Kooperation hin (4.1.3.1). Dieser Wert kann aber ebensowenig mit dem Holoenzym von Danchin verglichen werden, wie die katalytische Effizienz von *cyaB8* (93 s⁻¹M⁻¹).

Die optimale Temperatur war 45 °C, die Aktivierungsenergie 100 kJ/mol (Abb. 4-9). Diese Temperatur hat keinen Bezug zum natürlichen Lebensraum der Myxobakterien, die im Erdboden rund um die Welt beheimatet sind. Das gefundene pH-Optimum von 10 (Abb. 4-10) unterscheidet sich stark vom Literaturwert¹⁹ (pH-Optimum 6,5). Ähnliche pH-Optima wurden auch mit den katalytischen Zentren der Plasmodium-AC⁴⁶ und der Anabaena-AC⁴³ gefunden. Nur bei der Klasse IV AC von *Aeromonas hydrophila* (AC2)⁵ wurden ähnliche Werte für ein Holoenzym beobachtet (Temperaturoptimum 65 °C, pH-Optimum 9,5).

Die Sättigungskonzentrationen der Cofaktoren von *cyaB8* lagen bei Mg²⁺ (5 mM) rund 17 mal höher als für Mn²⁺ (0,3 mM) (Abb. 4-11). Die dabei mit Mn²⁺ erzielten Aktivitäten waren doppelt so hoch wie bei Mg²⁺. Dies liegt möglicherweise an der stärkeren Elektronegativität und dem größeren Ionenradius von Mn²⁺.

Die Proteinabhängigkeit veränderte sich mit der Lagerzeit. Frisch gereinigtes Enzym ohne Glycerolzusatz stieg hyperbol bis zu einer Proteinsättigung von 1,5 μM an. Nach zwei Wochen Lagerung bei 4 °C mit 20 % Glycerol zeigte *cyaB8* eine 10-fach höhere Aktivität, die beiderseits einer Konzentration von 0,5 μM stark abfiel (Abb. 4-12). Unterstützt durch den anscheinend stabilisierenden Einfluß des Glycerols deutet dies auf eine Dimerisierung des Enzym während der Lagerung und eine Hemmung durch Multimerisierung bei höheren Konzentrationen hin.

Die Zeitabhängigkeit war bis 15 min linear und stellte eine gute Basis für die 10 minütigen Tests dar (Abb. 4-13). *cyaB8* wies eine eindeutige Substratspezifität für ATP auf (Abb. 4-15).

5.1.4 andere Konstrukte

Das katalytische Zentrum der Paramecium-AC zwischen den beiden Mg^{2+} -bindenden Aspartaten war um eine AA kürzer als das von *cyaB* (Abb. 4-19). Die Entfernung eines Prolins in *cyaB8* Δ P183 zum Ausgleich der Längenvariation führte zu einer Halbierung der Aktivität (4.1.4). Die Sequenzlänge scheint hier eine wichtige Rolle für die Orientierung der Aspartate zu spielen.

Die Addition der TPRs von Paramecium (*cyaB8EparaTPR* und *cyaB8MparaTPR*) und Anabaena (*cyaB8anaTPR*) an *cyaB8* führte zur Unlöslichkeit der Expressionsprodukte. Aktivität konnte unter diesen Umständen nicht gemessen werden (4.1.4).

Ein von PD Dr. J. Linder durchgeführter Austausch des N-terminus des katalytischen Zentrums der Anabaena-AC₅₉₅₋₈₅₉ führte sowohl bei der Paramecium₅₃₄₋₅₉₄-Anabaena₆₅₇₋₈₅₉-Chimäre (PAX), als auch bei der Stigmatella₁₆₀₋₂₂₁-Anabaena₆₅₇₋₈₅₉-Chimäre (SAX) zur Inaktivität (4.1.4). Die Paramecium-Anabaena-Chimäre war unlöslich und daher einer biochemischen Charakterisierung unzugänglich.

Die Ergebnisse ergaben damit, daß sich *cyaB8* nicht als Modell eignete. Dies mag auch an weiteren Längenunterschieden der katalytischen Zentren liegen, da das katalytische Zentrum von *cyaB* (160-352) gegenüber dem der Paramecium-AC (534-745) insgesamt um 19 AA kürzer ist (Abb. 1-2).

5.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Die aus dem hochinfektösen *Mycobacterium tuberculosis* stammenden membrangebundenen ACn Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c und Rv3645 enthalten denselben D nach T Austausch wie *cyaB* in der katalytischen Domäne und wurden deswegen untersucht (Abb. 4-21).

5.2.1 Holoenzyme

Die Expression der vier ACn wurde mit einem Western-Blot nachgewiesen. Rv1319c war über einen weiten Bereich von 129 bis 44 kDa verschmiert, bei Rv1318c traten zwei Banden auf. Nur Rv1320c und Rv3645 waren als diskrete Banden zu erkennen (Abb. 4-24 und Abb. 4-25). Die erwarteten Banden bei 60 kDa waren in jedem Fall erkennbar.

Nur Rv3645 war aktiv (rund 1 [nmol/(mg*min)]). Für Rv1319c ließ sich eine geringe Aktivität nachweisen (75 [pmol/(mg*min)]); Abb. 4-23). In den verschmierten Banden von Rv1319c waren neben Abbauprodukten wahrscheinlich auch funktionsfähiges Holoenzym und eventuelle Dimere enthalten. Ebenso ist es möglich, daß eine kleine Fraktion der katalytischen Domäne für die Restaktivität verantwortlich war, die aber aufgrund des durch Abbau fehlenden N-terminalen HexaHis-Tags des Holoenzym auf dem Western-Blot nicht erkennbar wäre.

Die Auswirkung des T473D Austausches im Bereich der Adeninbindungsstelle wurde mit den Konstrukten Rv3645T473D und Rv3645T473A untersucht. Rv3645T473A war gut halb so aktiv wie der Wildtyp, Rv3645T473D zeigte nur noch $\frac{1}{5}$ der Aktivität (Abb. 4-29). Die evolutionäre Mutation zum Threonin entfernte die hier anscheinend hemmende negative Ladung eines kanonischen Aspartats. Dadurch wurde eine Regulation durch Carbonat ermöglicht, wie für die katalytische Domäne von Rv1319c gezeigt⁴⁴. Möglicherweise beteiligt sich aber auch das zwei AAn upstream liegende Glutamat an der ATP-Bindung. Das ausgetauschte Aspartat würde in beiden Fällen die ATP-Bindung stören und die Beobachtung erklären.

Die Anordnung der Cyclasen Rv1318c-20c im Genom gab Anlaß zur Annahme, sie könnten als mammaliaähnliche AC dargestellt werden. Die sie trennenden Stops wurden durch Punktmutationen entfernt (Stop nach Q, 4.2.3). Rv1319c1318c war mit der halben Aktivität von Rv1319c als einzige der beiden Konstrukte aktiv. Die korrekte Faltung zur aktiven AC schien durch die Hintereinanderklonierung nicht

möglich zu sein. Ebenso könnte die Länge des Linkers eine Rolle spielen, da Rv1319c1318c (aktiv) eine Linkerlänge von 18 AAn hatte, während sie bei Rv1320c1319c (inaktiv) nur 4 AAn betrug. Eine Linkerverlängerung könnte hier ebenso für eine mögliche höhere Aktivität sorgen, wie eine Coexpression.

5.2.2 Charakterisierung des katalytischen Zentrums von Rv1319c

Die Charakterisierung des katalytischen Zentrums wurde mit Rv1319ckat durchgeführt, da es als einziges konstant aktiv war (Abb. 4-35). Der Start entsprach dem von *cyaB8* (Abb. 4-21). Eine Verlängerung des katalytischen Zentrums entsprechend *cyaB7* würde wahrscheinlich keine höheren Aktivitäten für Rv1319ckat erbringen, da dieser Bereich gegen *cyaB* um 2 AAn kürzer und wenig konserviert ist (Abb. 5-1). Ob eine N-terminale Verlängerung der wenig bzw. inaktiven mycobakteriellen katalytischen Zentren, wie bei *cyaB6* hemmend oder im Gegenteil aktivierend wirkt, müsste überprüft werden, da aufgrund der geringen Konservierung gegenüber *cyaB* (und auch Rv3645) keine vergleichenden Vorhersagen möglich sind.

		<i>cyaB6</i>		<i>cyaB7</i>		<i>kat/cyaB8</i>
		↓		↓		▼
Rv1318c	334	:	FGRHVGREVA	AAAAERERSK--	LGGEERH	VAVVFIDIVGSTQ
Rv1319c	335	:	FGRHVGREVA	AAAAERERPQ--	LGGEDRHA	VAVVFVDIVGSTQ
Rv1320c	334	:	FGRHVGREVA	AAAAERERPK--	LGGEERH	VAVVFVDIVGSTQ
Rv3645	335	:	FGRYVGEDV	ARRALERGTE--	LGGOERD	VAVLFVDIVGSTQ
<i>cyaB</i>	137	:	EARYTSDAV	VEEILKSPD	TVVLTG	EKKREVTVLFADIRNFTG

Abb. 5-1. Alignmentausschnitt der mycobakteriellen ACn mit *cyaB*.

Eingezeichnet sind die Starts von *cyaB6-8* (↓), sowie die der mycobakteriellen katalytischen Zentren (▼, *kat*). Konservierungen: in 5 (invers), 4 (dunkelgrau) bzw. 3 (hellgrau) Sequenzen.

Die Proteinabhängigkeit war linear steigend, und zeigte gegen 20 µM Protein eine Sättigung (Abb. 4-36). Dies könnte ein Hinweis auf einen schnelleren Zerfall des aktiven Enzymdimers als dessen Bildung sein. Bei genügend hoher Proteinkonzentration (hier ab 16 µM Protein) entstünde ein steady-state Zustand. Ob ATP die Dimerisierungsrate beeinflusst, müsste aber noch untersucht werden.

Das pH-Optimum von 9,5 lag sehr hoch, ist aber konsistent mit denen der katalytischen Zentren von *cyaB* (4.1.3.3), der *Anabaena-AC*⁴³ und *Plasmodium-AC*⁴⁶. Über mögliche Einflüsse auf die kanonischen AAn oder andere Reaktionspartner lässt sich nur spekulieren.

Das Temperaturoptimum lag bei 37 °C, der Idealtemperatur des menschlichen Körpers, in dessen Makrophagen sich *M. tuberculosis* einnistet. Die Aktivierungsenergie war mit $E_A = 28$ kJ/mol sehr niedrig. Sie kann möglicherweise mit der Besonderheit von Rv1319ckat erklärt werden (5.2.3).

Als Maß für eine konzentrationsabhängige Beeinflussung des aktiven Zentrums ließ die lineare Zeitabhängigkeit keinen Schluß auf eine Aktivierung oder Hemmung durch Edukte oder Produkte zu (Abb. 4-40). Einflüsse hätten einen nichtlinearen Verlauf zu Folge, wie die Aktivierung durch der GAF-Domäne durch cAMP⁴³.

Rv1319ckat zeigte nur mit Mn^{2+} Aktivität (Abb. 4-42). Hierfür spielt wahrscheinlich die stärkere Elektronegativität (1,6) gegenüber der von Mg^{2+} (1,2) eine Rolle. Diese ermöglicht es dem Mn^{2+} das ATP und die es oktaedrisch¹⁶ koordinierenden Aminosäurereste stärker zu binden. Mg^{2+} ist hierzu möglicherweise auch aufgrund seines geringeren Ionenradius nicht in der Lage.

Rv1319ckat ist substratspezifisch für ATP. Dies wird durch die AAn K407 und T473 unterstrichen, die für die ATP-Selektivität verantwortlich sind⁴⁷. Das kanonische Aspartat ist hier zwar gegen ein Threonin ausgetauscht, dies scheint aber keinen Einfluß auf die Selektivität zu haben. Zudem kann die negative Ladung des Aspartats durch Carbonat ersetzt werden⁴⁴.

5.2.3 Besonderheit von Rv1319ckat

Sie besitzt als einzige der vier katalytischen Zentren eine hohe Aktivität (4.2.4.1). Dies könnte in einer Anomalie der α 4-Helix des katalytischen Zentrums begründet liegen. Da die Sekundärstruktur der katalytischen Zentren der mycobakteriellen ACn im wesentlichen mit denen von VC1 und IIC2⁴⁸ längenkonserviert ist (Abb. 5-2), kann angenommen werden, daß die Tertiär- und Quartärstrukturen ebenfalls ähnlich sind (Abb. 5-4). Ein Alignment mit den katalytischen Schleifen des VC1-IIC2 Heterodimers⁴⁸ zeigt weiterhin für den Bereich um die α 4-Helix identische kanonische AAn und eine Längenkonservierung mit den mycobakteriellen ACn. Deswegen kann angenommen werden, daß dieser Bereich ebenfalls als α -Helix vorliegt (Rechteck in Abb. 5-2).

Die Positionen D477 und E481 bei Rv3645 (und Rv1318c und 1320c) werden bei Rv1319c jeweils von K477 und Q481 besetzt. Rv1319c weist damit in der Umgebung der beiden an der Katalyse beteiligten Aminosäuren N480 und R484 statt zwei

saurer eine basische und eine polare AA auf (Abb. 5-3). Damit reihen sich K477, N480 und R484 entlang der α 4-Helix auf einer Seite (Sterne über der Sequenz in Abb. 5-3) und damit parallel der negativen Ladungen der drei Phosphate des ATP auf (vgl. Abb. 5-4). Dadurch kann das ATP vielleicht leichter gebunden werden, was eine mögliche Erklärung für die geringe Aktivierungsenergie (28 kJ/mol, 4.2.4.5) wäre. Ebenso könnte auch Mn^{2+} mit seiner größeren Elektronegativität und seinem größeren Ionenradius hier den besseren Cofaktor darstellen.

Q481 (\downarrow in Abb. 5-3) entfernt in Rv1319c gegenüber den anderen drei mycobakteriellen ACn die negative Ladung des E481. Diese saure Ladung fehlt auch in IIC2, *cyaB* und Rv1625c (vgl. Abb. 5-2 und Abb. 5-3). Das E481 stört möglicherweise die korrekte Faltung der katalytischen Domäne, da es sich auf der der katalytischen Spalte abgewandten Seite der α 4-Helix befindet. Daß Rv3645 als Holoenzym und katalytisches Zentrum mit HAMP-Domäne eine größere Aktivität als das katalytische Zentrum ohne HAMP-Domäne zeigt, könnte u.a. ein Hinweis auf die Beeinflussung der Wechselwirkung von E481 durch die HAMP-Domäne sein.

D477 (Rv3645), nur bei Rv1319c zu K477 ausgetauscht, ist zwar auch in *cyaB* (als D297) und Rv1625c⁴⁹ (D344) enthalten, allerdings ist die betrachtete Region der aktiven ACn ansonsten ungeladen bzw. schwach polar, d.h. die sauren Ladungen von E481 und E487 fehlen. Dies könnte ein Hinweis auf die Hemmung durch die negativen Ladungen in diesem Bereich sein, das ATP würde schlechter gebunden. Zwei weitere saure AAn, E353 und E356, sind in der Sequenz von Rv1625c leicht verschoben, und stehen damit auf der Gegenseite der Helix. Bei *cyaB* sind in dieser Schleife zwei Deletionen vorhanden, die das Prolin auf die Seite der geladenen AAn bringt und die Helix verkürzt (Abb. 5-3).

Die vier mycobakteriellen ACn enthalten zusätzlich noch ein P478 in der α 4-Helix (ähnlich wie *cyaB*), das deren Windung und Ladungsanordnung durch einen leichten Knick in der Sekundärstruktur zusätzlich beeinflusst. Dies bedürfte aber weiterer Untersuchungen.

K1065 in IIC2 ist bei den hier betrachteten mycobakteriellen ACn gegen R523 ausgetauscht. Diese AA dient als Deckel der katalytischen Tasche und bindet das γ -Phosphat des ATP (Abb. 5-4). Durch den Austausch wird in dieser Region eine etwas stärkere Basizität erzeugt (pK_a für K = 10,8, R = 12,5). Dies hat aber wahrscheinlich keinen Einfluß auf die Aktivität, da andere aktive mycobakteriellen ACn diesen Austausch ebenfalls besitzen (nicht gezeigt).

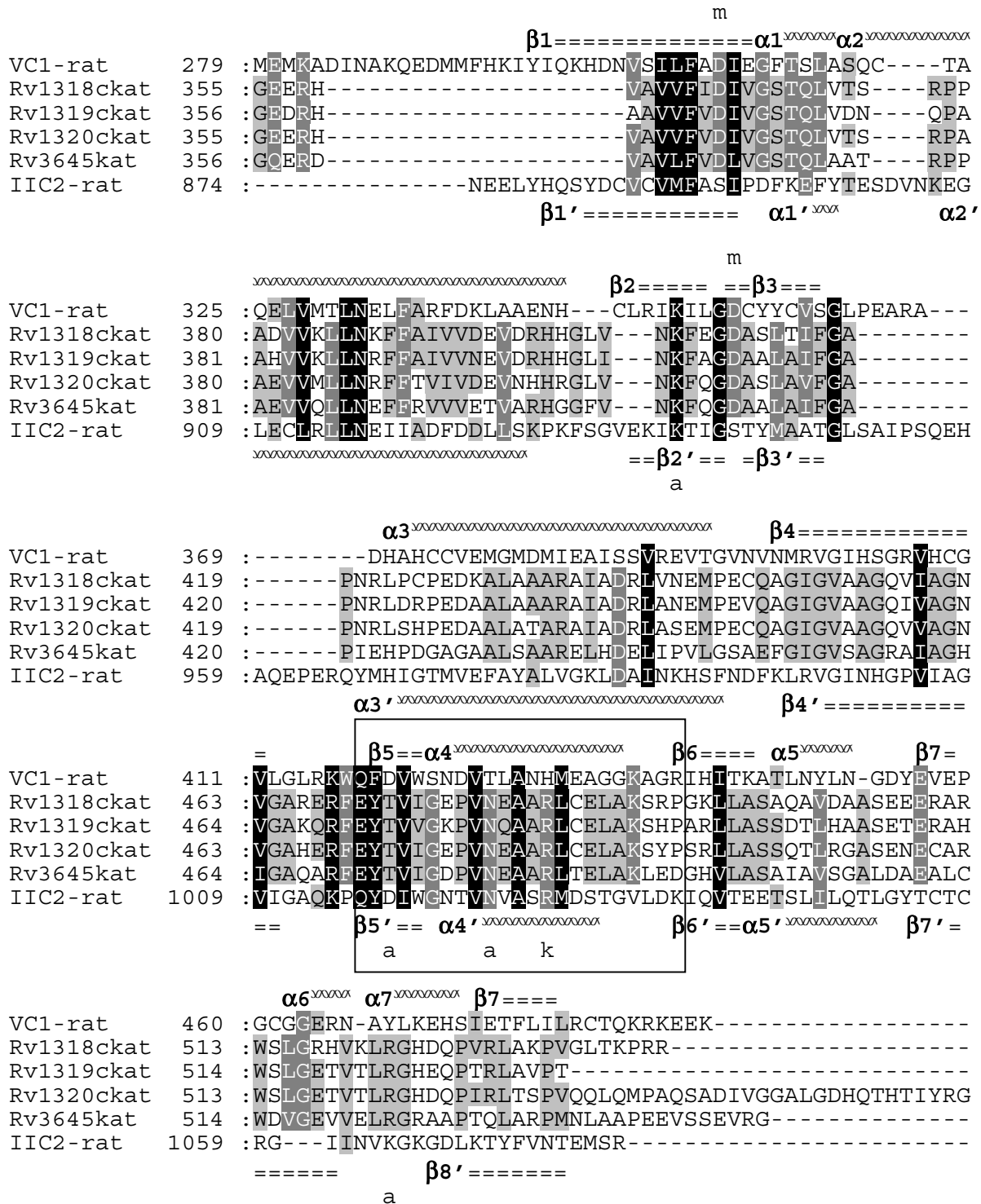


Abb. 5-2. Alignment der katalytischen Zentren VC1 und IIC2 und der von Rv1319c und Rv3645.

Die Sekundärstruktur von VC1 und IIC2⁴⁸ entstammt Figure 1. Die Namen der α -Helices (α^n) und β -Faltblätter (β^n) stehen jeweils am Bereichsbeginn (a = ATP-Bindung, m = Mg^{2+} -Bindung, k = Katalyse; oberhalb: C1, unterhalb: C2). Konservierungen analog Abb. 5-1. Das Rechteck bezeichnet die im Text besprochene $\beta 5$ - $\alpha 4$ -Region von IIC2 (vgl. Abb. 5-4 und Abb. 5-3).

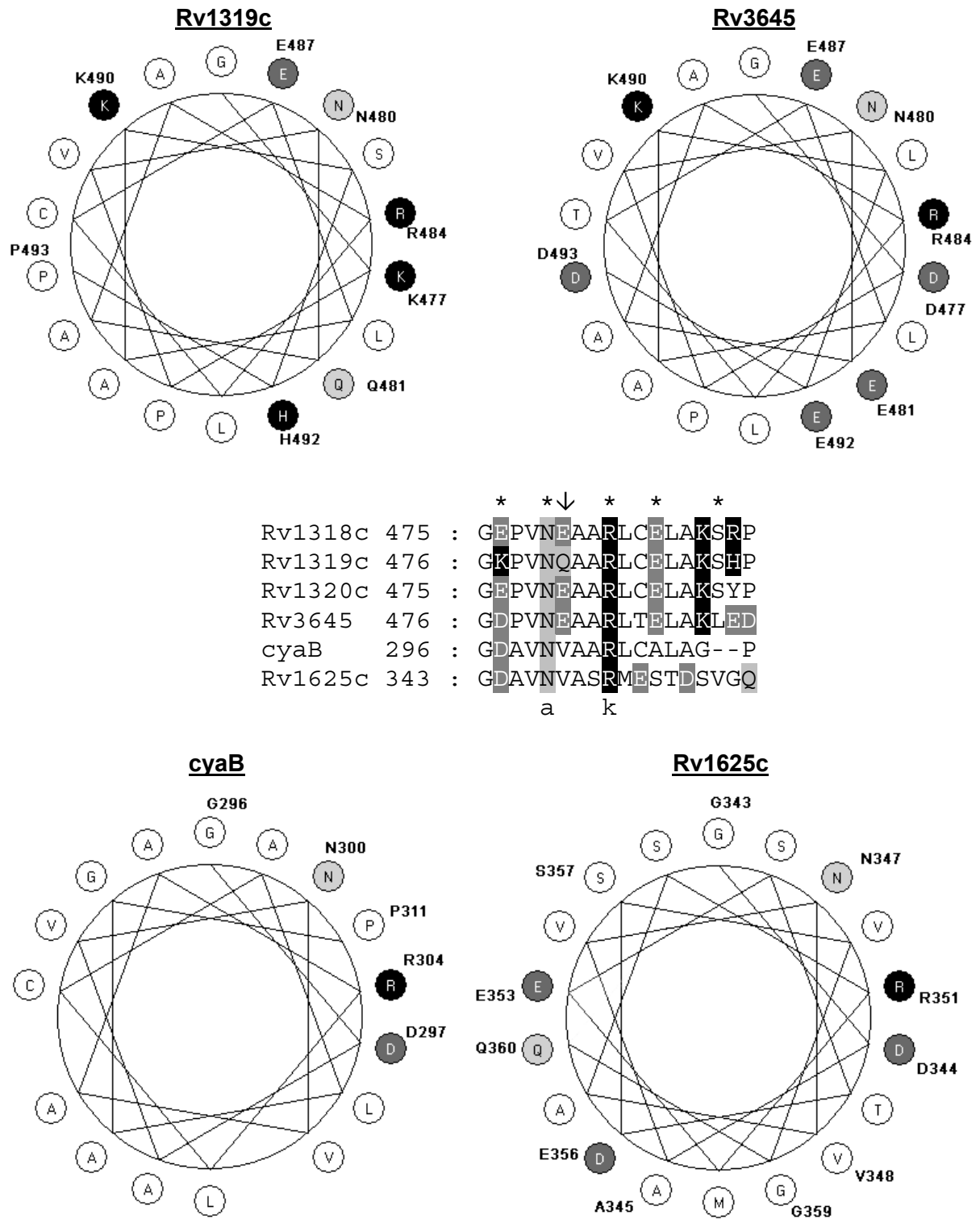


Abb. 5-3. α 4-Helices der katalytischen Zentren von Rv1319c, Rv3645, cyaB und Rv1625c, dazwischen der entsprechende Sequenzausschnitt.

Aminosäuren: invers = basisch, dunkelgrau = sauer, hellgrau = polar (nur N,Q). Auf Konservierungen wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet. Mit einem Stern (*) markierte AAn befinden sich auf derselben Helixseite (a=ATP-Bindung, k=Katalyse, ↓ wird im Text besprochen).

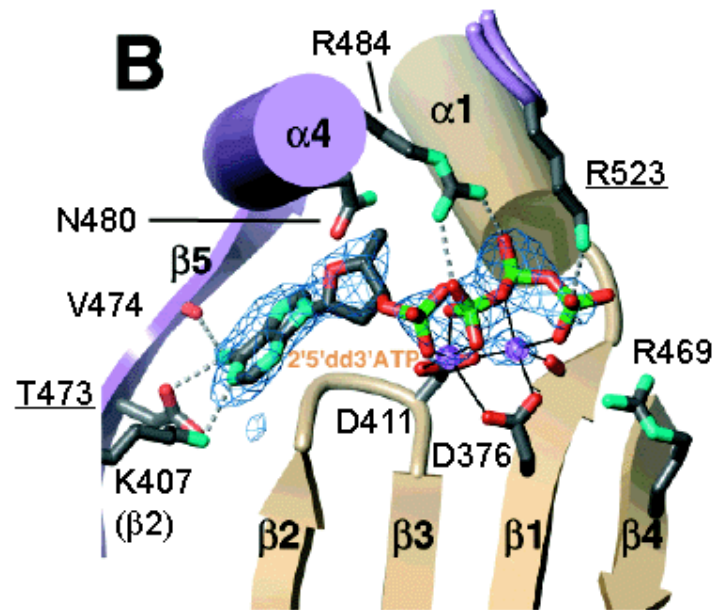


Abb. 5-4. Tertiärstruktur des katalytischen Zentrums von VC1/IIc2 (Tesmer et.al.⁵⁰, Figure 1B).

Aufgrund der Längenkonservierungen (Abb. 5-2) kann diese Kristallstruktur als mögliches Modell des katalytischen Zentrums der mycobakteriellen ACn angenommen werden. Die Abb. wurde mit den entsprechenden AAn von Rv1319c und Rv3645 versehen. In den mycobakteriellen ACn sind die Austausche T473D und R523K unterstrichen. Die Farben des Proteinrückgrades zeigen ihre Zugehörigkeit zur katalytischen Schleife (C1 beige, C2 blau). Als Substratanalogon ist 2',5'-dideoxy-3'-ATP (2'5'dd3'ATP) mit zwei Mg^{2+} und ihren Elektronendichteverteilungen abgebildet (grün = Stickstoff, rot = Sauerstoff, grau = Kohlenstoff). Näheres siehe im zitierten Artikel.

5.2.4 Einfluß der HAMP-Domäne

Rv3645 zeigte als einziges der untersuchten mycobakteriellen Holoenzyme deutliche Aktivität (950 [pmol/(mg*min)]); Rv1319c hatte nur 5 % davon; Abb. 4-23).

Die Aktivität der katalytischen Domäne mit der HAMP-Domäne stieg bei zunehmender Proteinkonzentration schneller an, als ohne (Abb. 4-45). Die HAMP-Domäne begünstigte in diesem Fall wahrscheinlich die Dimerisierung. Bei Rv1319c war das Gegenteil der Fall. Das Konstrukt mit der HAMP-Domäne zeigte keine Proteinabhängigkeit.

Der vermutete Einfluß der HAMP-Domäne auf das katalytische Zentrum wurde auch durch die Detergenzinstabilität angedeutet. Die Aktivität der katalytischen Domäne mit HAMP-Domäne fiel schneller ab, als die der katalytischen Domäne allein (Abb. 4-49). Da es sich bei der HAMP-Domäne um eine „Helix-Turn-Helix“-Struktur handelt, ist es sehr wahrscheinlich, daß die beiden Helices in engem Kontakt zueinander stehen (Abb. 5-9). Durch die Detergenzien wird vermutlich sowohl der Kontakt zwischen den Helices, als auch der damit verbundene Einfluß auf die katalytischen

Zentren gestört. Dadurch wird die Hemmung bei Rv1319c und die Aktivierung bei Rv3645 aufgehoben.

Die Wechselwirkungen der HAMP- mit der katalytischen Domäne beeinflusste auch die Reaktionskinetik (Tab. 4-4).

Die v_{\max} -Werte von Rv3645kat bzw. Rv3645HAMPkat unterschieden sich kaum (23 bzw. 28 [nmol(mg*min)]), die K_M -Werte deutlich (3,7 mM bzw. 500 μ M ATP). Daher wurde Rv3645kat, dessen Aktivität unter 1 mM ATP gemessen wurde, als vergleichsweise wenig aktiv eingestuft (Abb. 4-35 und Abb. 4-46). Für die katalytische Domäne mit der HAMP-Domäne (Rv3645HAMPkat) ließ sich der K_M aufgrund der positiven Kooperativität ($Q_{\text{Hill}} = 2$) nur durch eine Auftragung nach Lineweaver-Burk für allosterische Proteine zu $K_M^* = 500 \mu\text{M ATP}$ bestimmen. Der Hill-Koeffizient zeigte eine deutlich positive Interaktion der katalytischen Zentren (Anstieg von 0,9 auf 2). Hier scheint die HAMP-Domäne nicht nur die Dimerisierung zu fördern, sondern auch eine aktivierende Wechselwirkung der katalytischen Zentren zu vermitteln. Dadurch wurde es möglich, daß bei einer knappen Verdopplung der umgesetzten Moleküle pro Sekunde (k_{cat}) die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) durch die starke Senkung des K_M -Werts um gut eine Zehnerpotenz anstieg (Tab. 4-4). Für Rv3645 läßt sich offensichtlich sagen, daß die HAMP-Domäne das katalytische Zentrum aktiviert.

Rv1319c verhielt sich in dieser Hinsicht umgekehrt. Die HAMP-Domäne beeinflusste weder das pH- noch das Temperaturoptimum. Ebenso hatten Detergenzien keinen Einfluß. Die Aktivierungsenergien unterschieden sich deutlich (Rv1319c: 28 kJ/mol, Rv1319cHAMPkat: 36 kJ/mol und Rv3645HAMPkat: 83 kJ/mol), was den hemmenden Effekt der HAMP-Domäne bei Rv1319c andeutet. Der Energieunterschied zu Rv3645HAMPkat könnte mit der Besonderheit des katalytischen Zentrums von Rv1319c zusammenhängen.

Im Vergleich zu Rv3645 unterband bei Rv1319c die HAMP-Domäne die Proteinabhängigkeit (Rv1319cHAMPkat: konstant bei 0,5 nmol/(mg*min), Rv1319ckat: linear steigend bis 6,5 nmol/(mg*min) für 0,5 bis 4 μ M Protein Abb. 4-45). Die HAMP-Domäne scheint hier die Faltung des katalytischen Zentrums negativ zu beeinflussen, so daß eine Dimerisierung behindert wird.

Die HAMP-Domäne halbierte nicht nur v_{\max} , sondern steigerte auch den K_M -Wert des katalytischen Zentrums von Rv1319c (Rv1319ckat: $v_{\max} = 10 \text{ nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, $K_M = 50 \text{ }\mu\text{M}$; Rv1319cHAMPkat: $v_{\max} = 5 \text{ nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, $K_M = 780 \text{ }\mu\text{M}$; Tab. 4-4). Die katalytische Effizienz wurde damit um 95 % gesenkt, die Wechselzahl dagegen nur um 25 %, der Hill-Koeffizient änderte sich dagegen fast nicht (1,1 zu 0,8). Die Auswirkungen der Hemmung durch die HAMP-Domäne gleichen damit der einer gemischten Hemmung. Hier scheinen die Mechanismen der kompetitiven Hemmung (Erhöhung des K_M -Werts) und die der nicht-kompetitiven Hemmung (Verringerung der Enzymmenge und damit des v_{\max}) zu wirken. Da kein Hemmstoff zugegeben wurde, läßt sich vermuten, daß das ATP zwar gebunden, aber sehr langsam oder nur bei bestimmten intermolekularen Zusammenstößen umgesetzt wird. Das würde bei kurzzeitiger Betrachtung die Enzymmenge und damit v_{\max} senken, bei steigender ATP-Konzentration aber die Wahrscheinlichkeit der Umsetzung erhöhen. Denkbar wäre auch eine allosterisch aktivierende Anlagerung des ATPs an das Protein, was den gestiegenen K_M -Wert erklären würde.

5.2.5 Mechanismen der HAMP Wechselwirkungen?

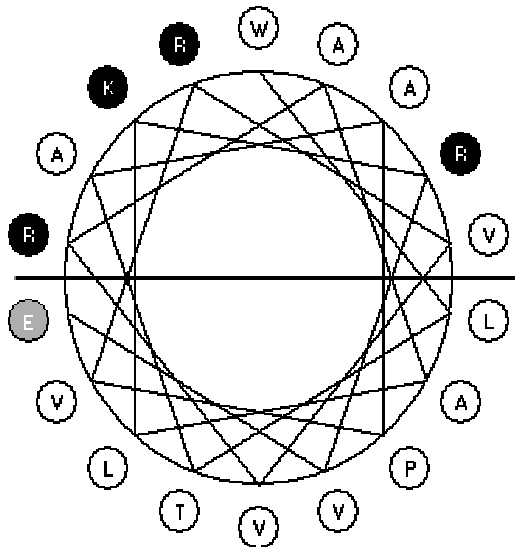
In 4.2.5.3 wurde die amphipathische Helixoberfläche in einen hydrophilen und einen hydrophoben Bereich unterteilt. Durch Mutation von hydrophoben in hydrophile AAn wurde versucht, diese Wechselwirkung zu stören (Abb. 4-56).

Die Konstrukte der katalytischen Zentren mit mutierter HAMP-Domäne hatten bei Rv1319c und Rv3645 eine dreifache Aktivität gegenüber den Konstrukten der Wildtyp-HAMP-Domäne (Abb. 4-58). Dieser für beide ACn gleiche Effekt deutet einerseits auf eine Beteiligung der HAMP-Domäne an der Regulation der AC-Aktivität, erklärt andererseits aber nicht die gegenteilige Regulation.

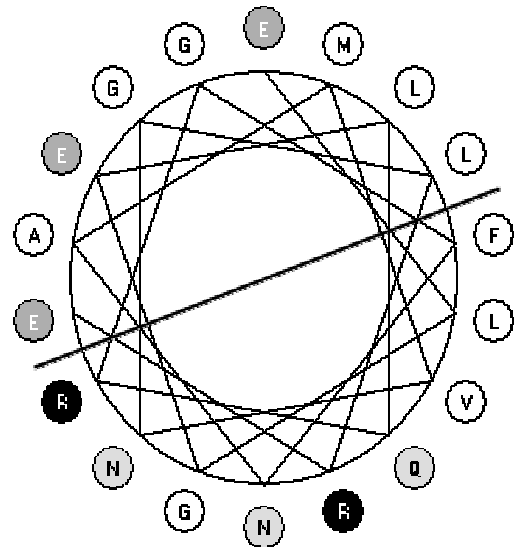
Eine wahrscheinliche Erklärung ergibt sich aus einer anderen Analyse. Die Helices können durch eine Ebene nach ihrer Ladung und starken Polarität in eine vorwiegend positiv und eine vorwiegend negativ geladene Hälfte geteilt werden (Abb. 5-5). Bei Rv1319c überwiegen dabei die basischen Ladungen in der AH I, während sie bei Rv3645 ausgeglichen sind; bei AH II ist das Gegenteil der Fall. Hierzu wird E310 als erste AA in die AH II aufgenommen. Dies steht im Gegensatz zu Appleman und Stewart⁴⁵, die das für die HAMP-Funktion essentielle Glutamat als letzte AA des helixverbindenden Linkers definierten. Nach deren Angaben erfolgte die Einteilung aber auch aus praktischen Gründen, da sie die Zählung in der AH II darauf stützten.

Letztendlich kann aber nur eine zukünftige Strukturaufklärung die wirkliche Position bestimmen, wofür sich bis jetzt jedoch noch keine geeigneten Kristalle gewinnen ließen.

Rv1319c AH I



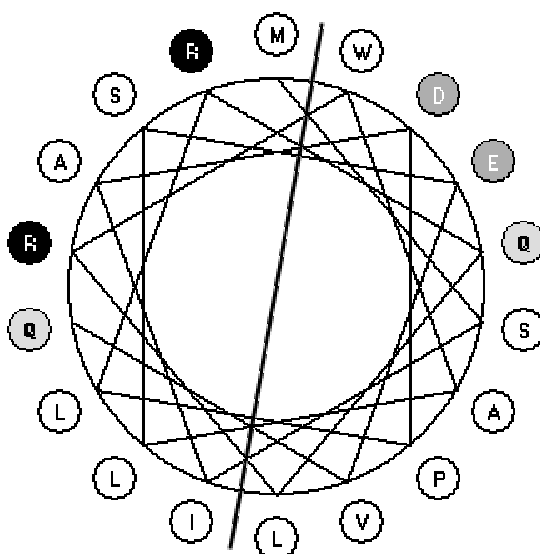
Rv1319c AH II



Rv1318c 277 : WLTAAPVRRVRAALRRVRRGELRTNLVVFDGTELGEELORGFNAMVAGLRE
 Rv1319c 278 : WLTAAPVRRVRAALKRVEQDRLRGDLVVFDGTELGEELORGFNAMVNGLRE
 Rv1320c 277 : WLTAAPVRRVREALNRVEQDLSGDLVVFDGTELGEELORGFNRMVVGLRE
 Rv3645 278 : MSIAADPLRQLRWALSEVORGNYNAMQIYDASELGLLQAGFNDMVRRLSE



Rv3645 AH I



Rv3645 AH II

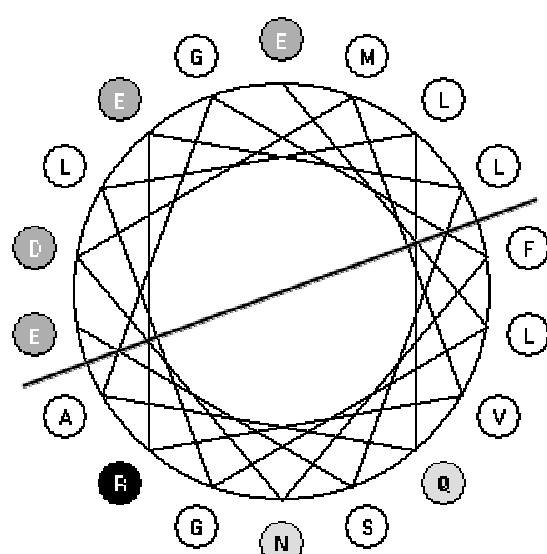


Abb. 5-5. Vorseite: Ladungsunterteilung der amphipathischen Helices von Rv3645 und Rv1319c.

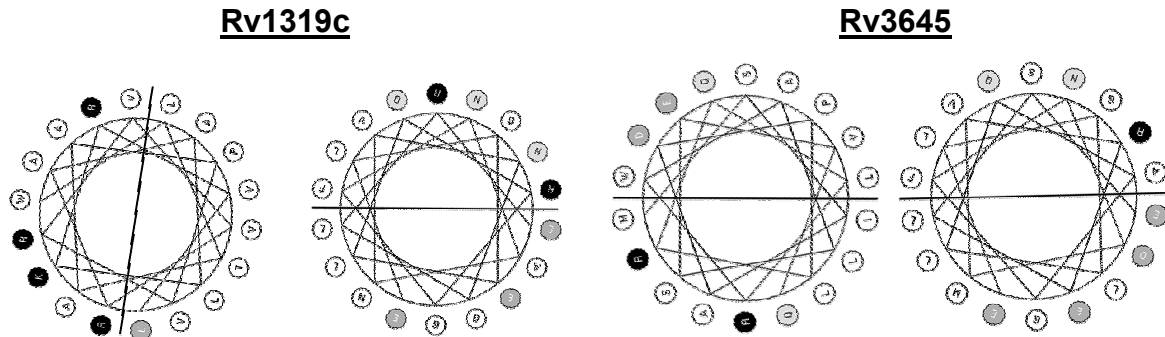
Die eingezeichneten Linien stellen die Ladungstrennungsebene der Helices dar. In der Mitte sind die HAMP-Sequenzen angegeben. Die Doppelpfeile markieren die Helices. Aminosäurecharakter: dunkelgrau = sauer, invers = basisch, hellgrau = polar (N,Q; nur für die Helices). Auf Konservierungen wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet. Die erste AA steht jeweils oben.

In den löslichen Konstrukten der katalytischen Domäne mit der HAMP-Domäne wenden sich höchstwahrscheinlich die lipophilen Bereiche gegeneinander (Abb. 5-6a)). Dabei stünden die beiden Ladungstrennungsebenen bei Rv1319c senkrecht zueinander, bei Rv3645 bildeten sie eine Linie. Diese Anordnung könnte auch im Holoenzym vorliegen, wenn die hierbei polaren Außenseiten der Helices entsprechende Wechselwirkungspartner im Protein oder der Membran finden. Bei beiden Anordnungen ist der lipophile Bereich weit genug, um eine gegenseitige Drehung oder Verschiebung der Helices ohne Änderung des Wechselwirkungscharakters (hydrophil/hydrophob) zu ermöglichen.

Als zweite Möglichkeit könnten die hydrophilen Regionen der Helices zueinander weisen, wobei die hydrophoben Bereiche Bindungspartner im Protein oder im Bilayer der Membran fänden. Betrachtet man diese Anordnung (Abb. 5-6b)), so kommen jeweils zwei Zustände infrage, bei der die basischen bzw. sauren AAn in eine „Ladungslücke“ der gegenüberliegenden Helix passen. Interessanterweise bestehen diese Ladungslücken meist aus kleinen, wenig polaren AAn (Alanin und Glycin), so daß die Helices nahe aneinander anliegen können. Auch hier ist eine gegenseitige Drehung oder Verschiebung ohne Charakterwechsel möglich, zumal die geladenen AAn und die Ladungslücken der gegenüberliegenden Helices fast zahnradartig ineinander greifen können. Dabei werden die „Zähne“ des Zahnrades abwechselnd von der jeweils entgegengesetzten Ladung gebildet, die Zahnlücken von den kleinen AAn. Der maximale Drehwinkel würde durch Charakterwechsel, voluminöse oder gleichgeladene gegenüberliegende AAn bestimmt. Aufgrund der Steighöhe von 1,5 Å kann dieses Modell aber nur für einzelne (oder deren ungerade Vielfache: 3, 5, ...) geladene AAn, die in gegenüberliegende Lücke zweier gegenteilig geladener AAn greifen, angewendet werden. Zwei nebeneinanderliegenden AAn haben bei dieser Auftragung einen größeren Abstand, als die sie einschließenden AAn der gegenüberliegenden Helix. Dies verkleinert die Anzahl möglicher Anordnungen. Interessanterweise kommen hier für Rv3645 zwei Möglichkeiten in Betracht, bei denen die Ladungstrennungsebenen entweder eine Linie bilden, oder im 90° Winkel

zueinander stehen (Abb. 5-6). Für Rv1319c ist die senkrechte Position zueinander wahrscheinlicher, wenn auch nicht so deutlich zu erkennen.

a)



b)

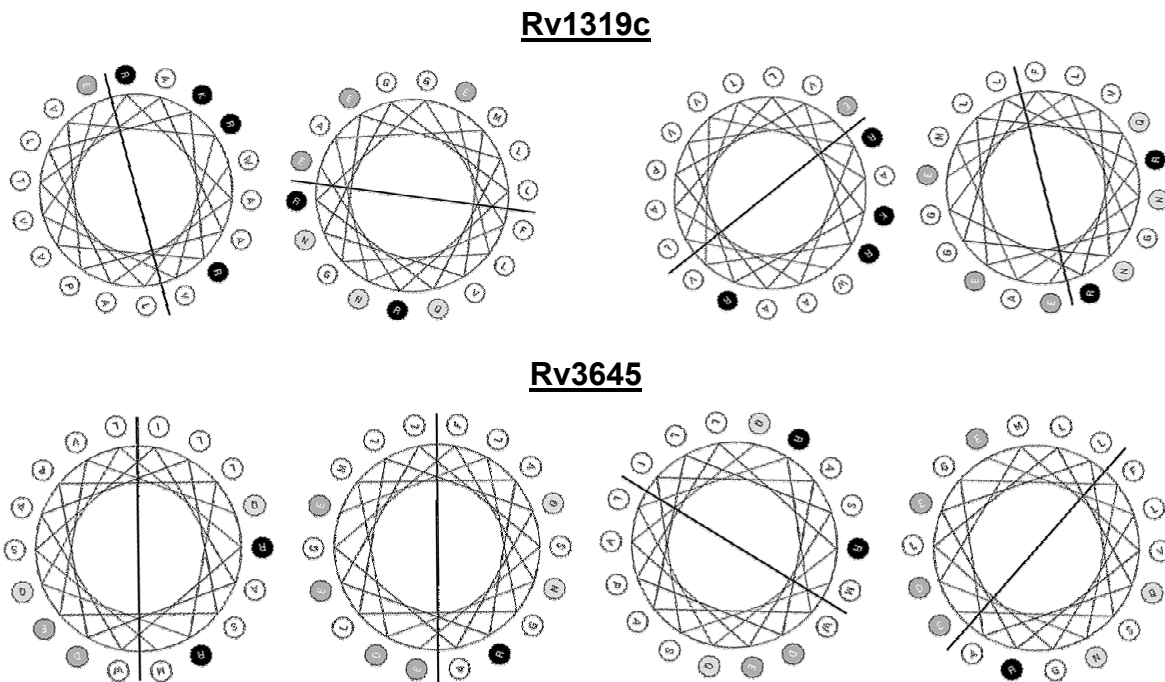


Abb. 5-6. Interaktionsmöglichkeiten von AH I (jeweils linke Seite der Helixpaare) mit AH II über die a) lipophilen oder b) geladenen Regionen. Markierungen wie in Abb. 5-5.

Positioniert man E310 außerhalb der AH II, so ergibt sich keine Ladungstrennungsebene für diese Helix, und der saure Charakter bleibt auf einen kleinen Bereich beschränkt. Die hydrophoben Wechselwirkungen sind hiervon nicht betroffen, aber für das mögliche Zusammenspiel der Ladungen bestehen weniger gute Möglichkeiten (Abb. 5-7). Die Lage des E310 könnte also die Ladungsverteilung bestimmen, und ist vielleicht deshalb bestimmend für die Funktion der HAMP-Domäne.

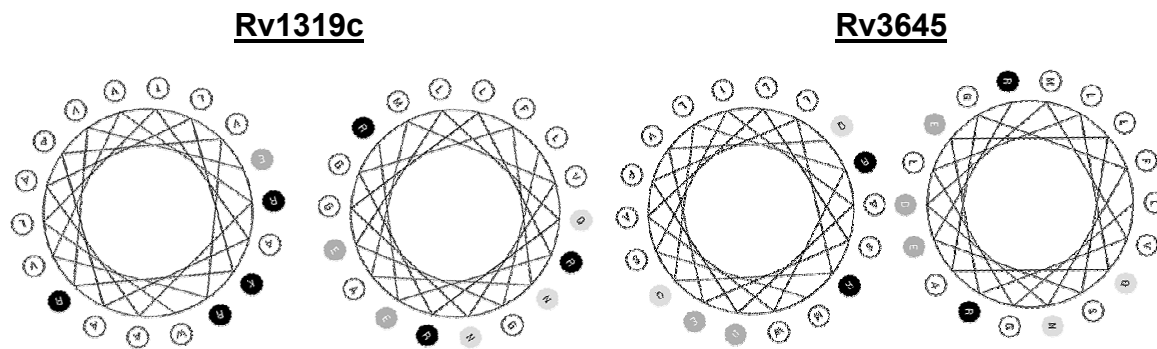


Abb. 5-7. Interaktionsmöglichkeiten ohne E310 in AH II. Eine Ladungstrennungsebene ergibt sich nicht. Markierungen wie in Abb. 5-5.

Dieses Modell gäbe auch eine mögliche Erklärung für die Eigenschaften der Konstrukte mit den ausgetauschten HAMP-Domänen von Rv1319c bzw. Rv3645. Nach dem Austausch der Wildtyp-HAMP-Domäne von Rv3645 gegen die von Rv1319c, konnten für das entstandene Konstrukt mit dem katalytischen Zentrum von Rv3645 (Rv1319cHAMP3645kat) keine kinetischen Parameter bestimmt werden (4.2.5.2).

Beim entsprechenden Konstrukt der katalytischen Domäne von Rv1319c (Rv3645HAMP1319ckat) hatte die ausgetauschte HAMP-Domäne einen ähnlich hemmenden, wenn auch anders gewichteten Effekt wie die Wildtyp-HAMP-Domäne. Die Maximalgeschwindigkeit und die katalytische Effizienz sanken um ca. 90 %, K_M verdoppelte sich. Der Hill-Koeffizient wies auf eine negative Kooperation hin und die katalytische Effizienz betrug nur noch 4 % (Tab. 5-1).

	K_M [μM]	v_{max} [nmol/(mg*min)]	k_{cat} [* 10^{-3} s^{-1}]	k_{cat}/K_M	Q_{Hill}
Rv1319ckat	50	10	1,2	24	1,1
Rv1319cHAMPkat	780	5	0,9	1,2	0,8
Rv3645HAMP1319ckat	130	1,1	0,2	1,5	0,4

Tab. 5-1. Kinetische Parameter des Einflusses der HAMP-Domänen auf das katalytische Zentrum von Rv1319c (vgl. 4.2.5.2 und Tab. 4-4).

Der Austausch der HAMP-Domänen könnte hier durch eine unterschiedliche Verdrillung der Helices von Rv1319c bzw. Rv3645 zu einer strukturellen Umordnung im katalytischen Zentrum des anderen Enzyms führen. Je nach Wechselwirkung ergeben sich andere Eigenschaften der Chimäre. Vielleicht kann die HAMP-Domäne von Rv3645 eine Konfiguration der HAMP-Domäne von Rv1319c nachahmen,

andersherum jedoch nicht? Eine bestimmte der möglichen obigen HAMP-Anordnung herauszugreifen und für die Änderungen verantwortlich zu machen, würde aber die Spekulation zu weit überdehnen.

Die Mutation der HAMP-Domäne im Holoenzym führte bei Rv3645 zu einer vollständigen Inaktivierung, während Rv1319c in seiner Aktivität nicht beeinflusst wurde (Abschluß von 4.2.5.3). Durch die wahrscheinliche Verdrillung der Helices scheint im Enzym eine funktionelle Struktur aufrecht erhalten zu werden, die durch die Mutation in Rv3645 zusammengebrochen ist. Hier zeigt die Aufhebung Amphipathizität der Helices deren Bedeutung für die richtige Faltung bzw. Orientierung der katalytischen Domäne. Bei Rv1319c bleibt nach der Mutation noch ein hydrophober Bereich von 7 AAn, nur durch ein R unterbrochen, in AH I bestehen (Abb. 4-56), was eine Aktivitätsänderung zu verhindern scheint.

Die intrazellulären Schleifen zwischen den Transmembrandurchgängen sind im Gegensatz zu den extrazellulären etwa doppelt so lang (intrazellulär: 26-33 AAn, extrazellulär: 3-15 AAn) und die Ladungsverteilung zwischen diesen ist unterschiedlich für Rv3645 und Rv1319c (Abb. 5-8 und Abb. 4-22). Hier könnten sowohl intramolekulare Angriffspunkte für Wechselwirkungen mit der HAMP-Domäne, als auch intermolekulare mit anderen möglicherweise regulierenden Proteinen oder Substraten liegen.

Der ebenfalls unterschiedliche N-terminus von Rv3645 gegenüber den anderen drei mycobakteriellen ACn könnte als Signalsequenz für andere Ziele in der Zelle kodieren. Dies würde mit der unterschiedlichen Regulation der AC im Einklang stehen.

Extrazellulär könnte bei den mycobakteriellen ACn ein eventueller Rezeptor nur von den zwei Schleifen mit je 15 AAn gebildet werden, da der Übergang zwischen Transmembrandurchgang 3 und 4 gerade die für eine Umkehr erforderlichen 3 AAn besitzt. Diese Theorie kann allerdings nur mit Hilfe einer Strukturanalyse überprüft werden.

N-terminus (51 bzw. 43 AAn):

```
Rv1319c 1 : MPAK-----KTMAQRILGOALETMTROCGOLPETPAYGSWLLGRVSESPS
Rv3645 1 : MDAEAFVGFROVPAARYGGLMATTAAALPRRIH---AFVRWVV-----R
```

1. intrazelluläre Schleife (zwischen TM2 & TM3; 26 bzw. 33 AAn):

```
Rv1319c 114 : IVRASIRWA-----IEERAPSQAD--GRNTLLLPF
Rv3645 106 : LLMPVFRWRDNLLETPDPAATELARSALRMPL
```

2. intrazelluläre Schleife (zwischen TM4 & TM5; 31 AAn):

```
Rv1319c 191 : FTEFALRPVAAKALEAGRPFRFAPGIMGR
Rv3645 190 : QSERVLRPVAVAALRSQVPEENVNAPGVILRL
```

Abb. 5-8. Intrazelluläre Verbindungen der TMe von Rv1319c und Rv3645.

Aminosäuren: invers = basisch, dunkelgrau = sauer, hellgrau = polar (nur N,Q). Auf Konservierungen wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet.

In der Literatur wird die Regulation durch die HAMP-Domänen berichtet⁵¹. Die unterschiedlichen Aufgaben der amphipathischen Helices I & II wurde schon beim Nitrat Sensor NarX erkannt⁴⁵. Die Ergebnisse der Sequenzdeletionen in der HAMP-Domäne in der Länge von 6 und mehr AAn (Fig. 2 des Artikels) können mit dem hier gefundenen Modell möglicherweise erklärt werden. Die Entfernungen in der AH I und dem Linker führten dort zu konstitutionell hohen Aktivitäten. In der amphipathischen Helix 2 ergaben alle Deletionen (bis auf eine am C-terminus) nur Basalaktivität. Zwei der Mutationen führten sogar zur umgekehrten Antwort. Diese Ergebnisse zeigen, daß die AH II bei NarX für die Aktivität eine Rolle spielt, während die AH I anscheinend eine regulierende Wirkung besitzt. Dies konnte für die mycobakteriellen ACn nicht gezeigt werden, da die Mutation der HAMP-Domäne nicht zwischen AH I und AH II unterschied. Es ist auch fraglich, ob die beiden Helices bei der Untersuchung der HAMP-Domäne getrennt voneinander betrachtet werden dürfen. Die Annahme, daß die HAMP-Domäne generell hemme, kann mit der Aktivierung von Rv3645 nicht unterstützt werden.

Als wichtig bleibt festzuhalten, daß die beiden amphipathischen Helices wahrscheinlich nur im gegenseitigen Zusammenspiel ihre regulatorische Aufgabe erfüllen können.

5.2.6 Modellvorschläge für die mycobakteriellen ACn

In der Literatur wird für die Funktion der HAMP-Domäne ein Klappmechanismus vorgeschlagen, der die amphipathischen Helices ähnlich einem Scharnier bei Signalübermittlung zusammen- oder auseinanderklappen lassen sollte³⁰. Die folgende katalytische Domäne würde so sterisch aktiviert oder gehemmt. Eine weite Entfernung wäre für die hydrophoben Bereiche der amphipathischen Helices allerdings energetisch ungünstig.

Wahrscheinlicher ist, daß die Helices ständig in engem Kontakt zueinander stehen, und sich während der Signalübermittlung gegeneinander drehen oder verschieben. Dieses Modell würde auch durch die gedrehten Trennungsebenen der amphipathischen Helices gestützt.

Das in allen HAMP-Domänen hochkonservierte N-terminale Prolin bewirkt einen Knick im Übergang von der Transmembranregion, der es zumindest der AH I erlaubt, an der Membran anzuliegen. Da sich aber wahrscheinlich ein flacher Winkel bildet, stünden die Transmembrandomänen diagonal in der Membran. In Abb. 5-9 wurde versucht, dies zu berücksichtigen (vgl. Abb. 1-3).

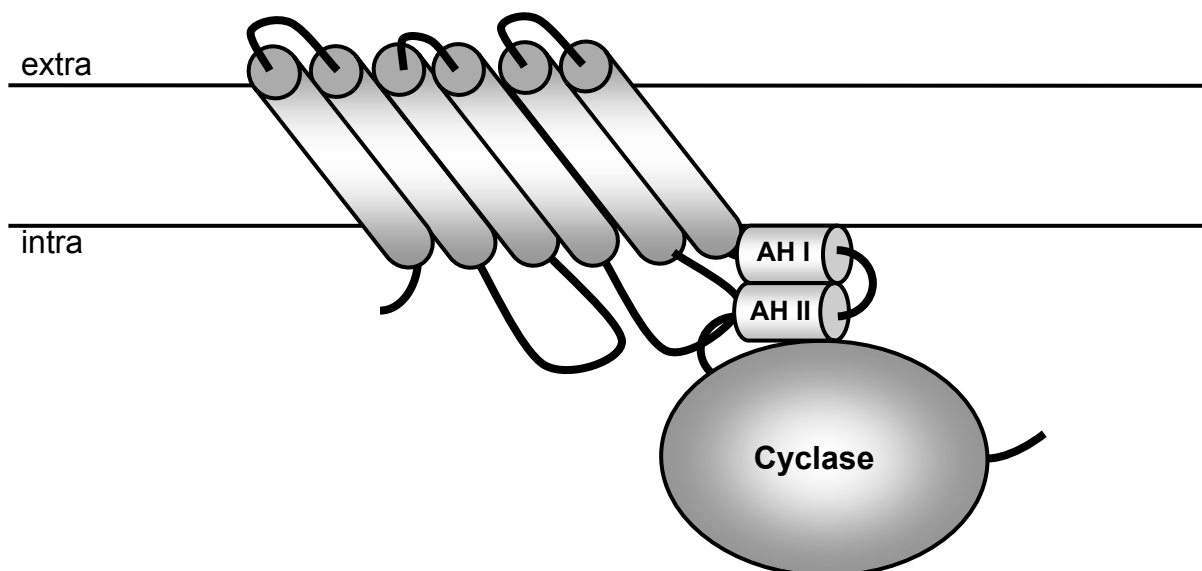


Abb. 5-9. Modellvorschlag für die Anordnung der HAMP-Domäne mit dem katalytischen Zentrum der mycobakteriellen ACn.

6 Zusammenfassung

Es wurden fünf Adenylatcyclasen untersucht, die viele Gemeinsamkeiten besitzen, u.a. einen D/T-Austausch im aktiven Zentrum. Sie gehören alle in die AC-Klasse IIIb, die durch diesen D/T-Austausch charakterisiert ist.

cyaB erwies sich als ungeeignetes Modell für die Untersuchung der Wechselwirkungen mit fremden Enzymdomänen. Die Aktivität des Holoenzym, die in der Literatur¹⁹ beschrieben wurde, konnte in dieser Arbeit aber nicht bestätigt werden. Statt dessen wurden die Charakteristika des katalytischen Zentrums bestimmt.

Unter den im Genom von *M. tuberculosis* identifizierten 15 Adenylatcyclasen befanden sich vier mit dem obigen D/T-Austausch, Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c und Rv3645, deren HAMP-Domäne sie gleichzeitig zu einer Gruppe zusammenfaßte. Das isolierte katalytische Zentrum von Rv1319c war als einziges der mycobakteriellen Adenylatcyclasen robust aktiv. Rv3645 stellte das einzige aktive Holoenzym dar. Für beide Beobachtungen konnte eine mögliche Erklärung aufgrund der HAMP-Domäne gefunden werden.

Die Annahme, die HAMP-Domäne würde auf alle Adenylatcyclasen den gleichen Effekt ausüben, stellte sich als irrtümlich heraus. Aufgrund von Aminosäureaustauschen in der Sequenz der HAMP-Domäne und des katalytischen Zentrums konnten die mycobakteriellen Adenylatcyclasen in zwei Gruppen mit gegensätzlicher Regulation unterteilt werden. Für die Regulation der HAMP-Domäne spielt die sterische Verteilung der Aminosäurecharakteristika zwischen den beiden amphipathischen Helices eine entscheidende Rolle.

7 Anhang

7.1 Berechnung der Aktivität

$$A \left[\frac{\text{pmol (cAMP)}}{\text{mg (Protein) * min}} \right] = \frac{\text{ATP } [\mu\text{M}] * 10^2}{\text{Protein [mg] * Zeit [min]}} * \frac{{}^{32}\text{P}_{\text{Probe}} [\text{cpm}] - {}^{32}\text{P}_{\text{Leerwert}} [\text{cpm}]}{{}^{32}\text{P}_{\text{total}} [\text{cpm}]}$$

$$* \frac{{}^3\text{H}_{\text{total}} [\text{cpm}]}{{}^3\text{P}_{\text{Probe}} [\text{cpm}] - 3\% {}^{32}\text{P}_{\text{Probe}} [\text{cpm}]}$$

7.2 Berechnungen der kinetischen Parameter K_M und v_{\max}

7.2.1 ... nach Hanes-Woolfe:

Die Berechnung der y-Achseneneinheit erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

$$\frac{\text{eingesetztes ATP}}{\text{spezif. Aktivität}} = \frac{\mu\text{M}_{\text{ATP}}}{\text{pmol}_{\text{ATP umgesetzt}} / (\text{mg} * \text{min})} = \frac{\mu\text{mol}_{\text{ATP}} * \text{mg} * \text{min}}{\text{l} * \mu\text{mol}_{\text{ATP umgesetzt}} * 10^{-6}} = \frac{\text{mg} * \text{min}}{10^{-6} * \text{l}}$$

Die kinetischen Parameter können aus der Gleichung der Ausgleichsgeraden ($y = A + B * x$) berechnet werden.

$$K_M = -\frac{A}{B} \quad \text{und} \quad v_{\max} = \frac{1}{B}$$

$$\text{mit } B = y - \text{Achsenabschnitt} * \frac{1}{x - \text{Achsenabschnitt}}$$

Der Faktor 10^{-6} im Nenner des Achsenabschnitts multiplizierte sich bei der Steigungsbestimmung für v_{\max} mit dem $\mu\text{mol/l}$ des eingesetzten ATPs wieder in pmol zurück:

$$\frac{1}{v_{\max}} = \frac{\text{mg} * \text{min}}{10^{-6} * \text{l}} * \frac{\text{l}}{\mu\text{mol}} = \frac{\text{mg} * \text{min}}{\text{pmol}}$$

7.2.2 ... für allosterische Proteine nach Lineweaver-Burk

Handelt es bei dem betrachteten Enzym sich um ein allosterisches Protein, so weisen die Auftragungen nach Michaelis-Menten einen deutlich sigmoiden Verlauf statt des hyperbolen Verlaufs, den dieses Modell fordert, auf. Die Bestimmung der

kinetischen Daten ist hierbei nicht ohne weiteres aus den üblichen Linearisierungen möglich. Man kann sich aber durch eine Auftragung nach Lineweaver-Burk für allosterische Enzyme behelfen. Hierbei wird der Kehrwert der Aktivität nicht gegen den einfachen Kehrwert der Substratkonzentration, sondern gegen sein exponentielles Vielfaches (hier z.B. $1/[\text{ATP}]^2$) aufgetragen. Der Exponent wird empirisch nach dem besten Korrelationseffizienten der Ausgleichsgeraden gewählt. Die „normale“ Lineweaver-Burk Darstellung entspricht hierbei dem Sonderfall von $1/[\text{ATP}]^1$.

Der Unterschied bei der Parameterauswertung besteht darin, daß kein K_M , sondern nur die Konzentration halbmaximaler Aktivität (hier K_M^* genannt) abgelesen werden kann, da die Michaelis-Menten Konstante nur für den Sonderfall ($1/[\text{ATP}]^1$) definiert ist. Die allgemeine Umrechnung erfolgt entsprechend der üblichen Berechnung nach:

$$K' = [S]_{0,5}^n$$

$$[S]_{0,5} = \sqrt[n]{K'} = K_M^*$$

Dabei ergibt sich K' aus dem abgelesenen y – Achsenabschnitt $-1/K'$.

7.3 Berechnung der Standardabweichungen

$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$ ist die Standardabweichung und

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad \text{ist der Standardfehler des Mittelwertes}$$

(mit n = Anzahl der Versuche; jeder Versuchswert (n) setzt sich aus gemittelten Doppelwerten zusammen).

7.4 Katalytische Effizienz

Die katalytische Effizienz ist als k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$] mit $k_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/[E]_T$ definiert⁵² (dortiger Abschn. 8.4.1f). Die (spezifische/maximale) AC-Aktivität ist aber bereits auf die

Enzymmenge (in mg) standardisiert (v_{\max} [nmol ATP/(mg*min)]), so daß sich v_{\max} und

k_{cat} nach Umrechnung der Einheiten entsprechen $\left(k_{\text{cat}} = \frac{\text{Substrat [M]}}{\text{Enzym [M]} * \text{Zeit [s]}} \right)$.

7.5 Accession Numbers

7.5.1 *Stigmatella aurantiaca*

cyaB P40138 SWISSPROT

7.5.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Rv1318c Q10631 SWISSPROT

Rv1319c Q10632 SWISSPROT

Rv1320c Q10633 SWISSPROT

Rv3645 O06362 SWISSPROT

7.6 Internetadressen

DNA Silent Restriction Sites

http://www.dwalab.com/DNAProject/bin/DNA_Analysis_Frame.html

EMBL <http://www.embl-heidelberg.de/>

EXPASY <http://us.expasy.org/>

GENBANK <http://ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NCBI BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Sanger Zentrum (Projekt *Mycobacterium tuberculosis*)

http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/

SMART <http://smart.embl-heidelberg.de/>

SWISSPROT <http://www.expasy.org/sprot/>

TubercuList <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>

8 Literaturverzeichnis

1. Bairoch, A. & Apweiler, R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TREMBL. *Nucleic Acids Res.* **25**, 31-36 (1997).
2. Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Rapp, B. A. & Wheeler, D. L. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **30**, 17-20 (2002).
3. Soderbom, F., Anjard, C., Iranfar, N., Fuller, D. & Loomis, W. F. An adenylyl cyclase that functions during late development of Dictyostelium. *Development* **126**, 5463-5471 (1999).
4. Barzu, O. & Danchin, A. Adenylyl cyclases: a heterogeneous class of ATP-utilizing enzymes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Bio.* **49**, 241-283 (1994).
5. Sismeiro, O., Trotot, P., Biville, F., Vivares, C. & Danchin, A. *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 (1998).
6. Cotta, M. A., Whitehead, T. R. & Wheeler, M. B. Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, *Prevotella ruminicola* D31d. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**, 257-260 (1998).
7. Tellez-Sosa, J., Soberon, N., Vega-Segura, A., Torres-Marquez, M. E. & Cevallos, M. A. The *Rhizobium etli* cyaC product: characterization of a novel adenylate cyclase class. *J. Bacteriol.* **184**, 3560-3568 (2002).
8. Buck, J., Sinclair, M. L., Schapal, L., Cann, M. J. & Levin, L. R. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 79-84 (1999).
9. Sinclair, M. L., Wang, X. Y., Mattia, M., Conti, M., Buck, J., Wolgemuth, D. J. & Levin, L. R. Specific expression of soluble adenylyl cyclase in male germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* **56**, 6-11 (2000).
10. Dessauer, C. W. & Gilman, A. G. Purification and characterization of a soluble form of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **271**, 16967-16974 (1996).
11. Whisnant, R. E., Gilman, A. G. & Dessauer, C. W. Interaction of the two cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6621-6625 (1996).
12. Dessauer, C. W. & Gilman, A. G. The catalytic mechanism of mammalian adenylyl cyclase. Equilibrium binding and kinetic analysis of P-site inhibition. *J. Biol. Chem.* **272**, 27787-27795 (1997).
13. Zhang, G., Liu, Y., Ruoho, A. E. & Hurley, J. H. Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* **386**, 247-253 (1997).

14. Hurley, J. H. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **274**, 7599-7602 (1999).
15. Zimmermann, G., Zhou, D. & Taussig, R. Mutations uncover a role for two magnesium ions in the catalytic mechanism of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **273**, 19650-19655 (1998).
16. Tesmer, J. J. G., Sunahara, R. K., Johnson, R. A., Gosselin, G., Gilman, A. G. & Sprang, S. R. Two-Metal-Ion Catalysis in Adenylyl Cyclase. *Science* **285**, 756-760 (1999).
17. Linder, J. U. & Schultz, J. E. The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell. Signal.* **15**, 1081-1089 (2003).
18. Hambach, K. Klonierung einer Adenylcyclase aus *Paramecium tetraurelia*. (Dissertation, Tübingen, 2002).
19. Coudart-Cavalli, M. P., Sismeiro, O. & Danchin, A. Bifunctional structure of two adenylyl cyclases from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Biochimie* **79**, 757-767 (1997).
20. Dawid, W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 403-427 (2000).
21. Kaiser, D. How and why myxobacteria talk to each other. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 663-668 (1998).
22. Koch, A. L. & White, D. The social lifestyle of myxobacteria. *Bioessays* **20**, 1030-1338 (1998).
23. Plaga, W. & Ulrich, S. H. Intercellular signalling in *Stigmatella aurantiaca*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 593-597 (1999).
24. Velicer, G. J. & Yu, Y. T. Evolution of novel cooperative swarming in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Nature* **425**, 75-78 (2003).
25. Camus, J.-C., Pryor, M. J., Medigue, C. & Cole, S. T. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* **148**, 2967-2973 (2002).
26. Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B. G. & et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544 (1998).
27. Hatfull, G. F. The molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Top. Microbiol.* **215**, 29-47 (1996).
28. Butler, S. L. & Falke, J. J. Cysteine and disulfide scanning reveals two amphiphilic helices in the linker region of the aspartate chemoreceptor. *Biochemistry* **37**, 10746-10756 (1998).

29. Aravind, L. & Ponting, C. P. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**, 111-116 (1999).
30. Williams, S. B. & Stewart, V. Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction. *Mol. Microbiol.* **33**, 1093-1102 (1999).
31. Russel, D. G. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 569-577 (2001).
32. Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D. & Cole, S. T. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 3684-3689 (2002).
33. Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. & Lindenmann, J. in *Medizinische Mikrobiologie* (Thieme, 1993).
34. Kanacher, T., Schultz, A., Linder, J. U. & Schultz, J. E. A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from Anabaena is a self-activating cAMP switch. *EMBO J.* **21**, 3672-3680 (2002).
35. Salomon, Y., Londos, C. & Rodbell, M. A highly sensitive adenylyl cyclase assay. *Anal. Biochem.* **58**, 541-548 (1974).
36. Letunic, I., Goodstadt, L., Dickens, N. J., Doerks, T., Schultz, J., Mott, R., Ciccarelli, F., Copley, R. R., Ponting, C. P. & Bork, P. Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **30**, 242-244 (2002).
37. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5857-5864 (1998).
38. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E. W. & Lipman, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410 (1990).
39. Gish, W. & States, D. J. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* **3**, 266-272 (1993).
40. Engel, P. Klonierung und Expression einer Guanylatcyclase aus Paramecium tetraurelia. (Dissertation, Tübingen, 1999).
41. Lamb, J. R., Tugendreich, S. & Hieter, P. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem. Sci.* **20**, 257-259 (1995).
42. Blatch, G. L. & Lassle, M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**, 932-939 (1999).

43. Kanacher, T. Die Adenylatcyclase aus *Anabaena* sp. PCC 7120 ist ein cAMP-sensitives Protein. (Dissertation, Tübingen, 2003).
44. Cann, M. J., Hammer, A., Zhou, J. & Kanacher, T. A defined subset of adenylyl cyclases is regulated by bicarbonate ion. *J. Biol. Chem.* **278**, 35033-35038 (2003).
45. Appleman, J. A. & Stewart, V. Mutational analysis of a conserved signal-transducing element: The HAMP linker of the *Escherichia coli* nitrate sensor NarX. *J. Bacteriol.* **185**, 89-97 (2003).
46. Weber, J. H. Klonierung und Charakterisierung einer Adenylatcyclase aus *Plasmodium falciparum*. (Dissertation, Tübingen, 2003).
47. Tucker, C. L., Hurley, J. H., Miller, T. R. & Hurley, J. B. Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5993-5997 (1998).
48. Tesmer, J. J., Sunahara, R. K., Gilman, A. G. & Sprang, S. R. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G(s alpha).GTP gamma S. *Science* **278**, 1907-1916 (1997).
49. Guo, Y. L., Seebacher, T., Kurz, U., Linder, J. U. & Schultz, J. E. Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: A progenitor of mammalian adenylyl cyclases. *EMBO J.* **20**, 3667-3675 (2001).
50. Tesmer, J. J. G., Dessauer, C. W., Sunahara, R. K., Murray, L. D., Johnson, R. A., Gilman, A. G. & Sprang, S. R. Molecular Basis for P-Site Inhibition of Adenylyl Cyclase. *Biochemistry* **2000**, 14464-14471 (2000).
51. Mehan, R. S., White, N. C. & Falke, J. J. Mapping out regions on the surface of the aspartate receptor that are essential for kinase activation. *Biochemistry* **42**, 2952-2959 (2003).
52. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Biochemistry* (W.H. Freeman, New York, 2001).

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren
Privatdozenten/innen und Professoren/innen:

Bremeker, K.-D.	Pharm. Technologie
Dilg, P.	Pharm. Geschichte
Fahr, A.	Pharm. Technologie
Feuser, B.	Physik
Gillman, T.	Pharm. Chemie
Haake, M.	Pharm. Chemie
Häberlein, H.	Pharm. Biologie
Hanefeld, W.	Pharm. Chemie
Hölzl, J.	Pharm. Biologie
Imming, P.	Pharm. Chemie
Kissel, T.	Pharm. Technologie
Klumpp, S.	Pharm. Chemie
Kriegelstein, J.	Pharmakologie und Toxikologie
Kuschinsky, K.	Pharmakologie und Toxikologie
Lohöfer, H.	Mathematik
Matusch, R.	Pharm. Chemie
Matern, U.	Pharm. Biologie
Radsak, K.	Mikrobiologie
Seitz, G.	Pharm. Chemie

Lebenslauf:

Name:	Arne Hammer	
Geburtsdatum:	21. Mai 1970	
Geburtsort:	Nordhorn	
Schulbesuch:	1976 – 1980 1980 – 1982 1982 – 1990 8. Mai 1990	Waldschule Nordhorn Orientierungsstufe in Nordhorn Gymnasium Nordhorn Abitur
Studium:	10/1990 – 9/1993 10/1993 – 1/1998 5. September 1995 15. Januar 1998	Studium der Chemie an der Universität Bremen Studium der Pharmazie an der Phillips-Universität Marburg Erstes Staatsexamen Zweites Staatsexamen
Pharmazeut. Praktikum:	1/1998 – 7/1998 8/1998 – 5/1999 17. Mai 1999 19. Mai 1999	Einhorn-Apotheke, Marburg Pharmazeutische Biochemie, Universität Tübingen Drittes Staatsexamen Approbation als Apotheker
Promotion:	5/1999 – 7/2003	Durchführung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit „Klonierung und Charakterisierung von fünf Adenylatcyclasen aus <i>Stigmatella aurantiaca</i> und <i>Mycobakterium tuberculosis</i> “ am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, unter Anleitung von Prof. Dr. J.E. Schultz