

**Rv1900c:**

**Eine unorthodoxe Klasse IIIc Adenylatcyclase**

**aus *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**

**Martina Wetterer**

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2004

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Heide

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde zwischen September 2001 und April 2004 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J.E. Schultz angefertigt.

Herrn Prof. Dr. J. E. Schultz danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für konstruktive Diskussionen, immer neue Ideen und für die Möglichkeit, diese Arbeit unter exzellenten Bedingungen in seiner Gruppe anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. L. Heide danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn PD Dr. J.U. Linder danke ich für seinen kompetenten Rat und seine Hilfe, sowie für zahlreiche Anregungen.

Herrn Dr. Heinz Schwarz vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen danke ich für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von *E.coli*-Zellen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen des Arbeitskreises für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Falk Ulrich und meiner Familie, die mich immer unterstützt haben.

# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Adenylatcyclasen .....	1
1.2	Mammalia Adenylatcyclasen .....	2
1.3	Mycobakterium tuberculosis .....	3
1.4	Aufgabenstellung .....	3
2	MATERIAL .....	5
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	5
2.2	Geräte .....	7
2.3	Oligonukleotide .....	10
2.3.1	Sequenzierprimer .....	10
2.3.2	Klonierungsprimer .....	10
2.4	Plasmide .....	12
2.5	Puffer und Lösungen .....	13
2.5.1	Molekularbiologie .....	13
2.5.1.1	Lösungen für Arbeiten mit DNA .....	13
2.5.1.2	Medien für <i>E. coli</i> .....	14
2.5.2	Proteinchemie .....	14
2.5.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	14
2.5.2.2	Westernblotting .....	15
2.5.2.3	Immunodetektion .....	15
2.5.2.4	Puffer zur Resuspendierung von Zellen .....	15
2.5.2.5	Lösungen zur Zellyse und nativen Ni <sup>2+</sup> -NTA-Reinigung .....	16
2.5.2.6	Lösungen zur denaturierenden Ni <sup>2+</sup> -NTA-Reinigung .....	16
2.5.3	Lösungen für AC- und GC-Test .....	17
2.5.4	Lösungen für Hydrolase-Tests .....	17
3	METHODEN .....	18
3.1	Gentechnologische Methoden .....	18
3.1.1	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	18
3.1.2	Trennung und Detektion von DNA mit Agarose-Gelelektrophorese .....	18
3.1.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	18

3.1.4	Reinigung und Entsalzung von DNA.....	18
3.1.5	Restriktionsverdau von DNA.....	19
3.1.6	Glätten von DNA-Überhängen.....	19
3.1.7	5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten.....	19
3.1.8	5'-Dephosphorylierung von Plasmid-Vektoren.....	19
3.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	20
3.1.10	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	20
3.1.11	DNA-Sequenzierung.....	21
3.2	Mikrobiologische Methoden.....	21
3.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	21
3.2.2	Standardtransformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	22
3.2.3	Schnelltransformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	22
3.2.4	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen.....	22
3.2.5	Blau-Weiß-Screen.....	23
3.3	Proteinchemische Methoden.....	23
3.3.1	Proteinbestimmung.....	23
3.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	23
3.3.3	Westernblot.....	24
3.3.4	Immunogoldmarkierung von <i>E. coli</i> .....	25
3.3.5	Plasmolyse und Glutaraldehydfixierung.....	25
3.4	Proteinexpression.....	25
3.5	Zellernte.....	26
3.6	Zelllyse.....	26
3.7	Native Ni <sup>2+</sup> -NTA-Affinitätsreinigung.....	26
3.8	Denaturierende Ni <sup>2+</sup> -NTA-Affinitätsreinigung.....	27
3.9	Membranpräparation.....	27
3.10	Enzym-Assays.....	28
3.10.1	Adenylatcyclase-Test.....	28
3.10.2	Guanylatcyclase-Test.....	29
3.10.3	Hydrolase-Tests.....	29
3.11	Klonierungen.....	31
3.11.1	Rv1900c <sub>291-462</sub> (Katalytische AC-Domäne).....	31
3.11.2	Rv1900c <sub>1-462</sub> in <i>pQE30</i> (Holoenzym).....	32
3.11.3	Lipj CLC.....	33

3.11.4	Holoenzym in <i>pET16b</i> .....	35
3.11.5	Konstrukte mit Punktmutationen .....	36
4	ERGEBNISSE.....	38
4.1	Biochemische Charakterisierung von Lipj <sub>291-462</sub> .....	39
4.1.1	Expression und Reinigung von Lipj <sub>291-462</sub> .....	39
4.1.2	Cofaktorerfordernis .....	40
4.1.3	Temperaturabhängigkeit und Aktivierungsenergie .....	41
4.1.4	pH-Optimum .....	42
4.1.5	Proteinabhängigkeit und Dimerisierung von Lipj <sub>291-453</sub> .....	42
4.1.6	Substratspezifität .....	44
4.1.7	Kinetische Messungen.....	44
4.1.8	Einfluss von 2',3'-AMP .....	45
4.1.9	Einfluss von Substratanaloga .....	46
4.2	Charakterisierung der Mutanten von Lipj <sub>291-462</sub> .....	46
4.2.1	Expression und Reinigung .....	46
4.3	Mutationsanalyse der kanonischen Aminosäuren .....	47
4.3.1	Lipj N342 / H402: Die veränderten Aminosäuren .....	47
4.3.2	pH-Optimum .....	47
4.3.3	Proteinabhängigkeit.....	48
4.3.4	Substratspezifität .....	49
4.3.5	Kinetische Messungen.....	50
4.3.6	Lipj D395 / R406 / D302 / D346: Die kanonischen Aminosäuren .....	54
4.3.7	Zwei weitere konservierte Aminosäuren: K442 und R377 .....	58
4.3.8	Rekonstitutionsversuch zweier inaktiver Mutanten .....	61
4.4	Mutationsanalyse aus Kristallisationsergebnissen .....	63
4.5	Zwei AC mit Linker: Lipj CLC.....	69
4.5.1	Proteinabhängigkeit.....	70
4.5.2	Substratspezifität .....	70
4.5.3	Kinetische Messungen.....	71
4.6	Charakterisierung des Holoenzym LipJ <sub>1-462</sub> .....	71
4.6.1	Das Holoenzym LipJ <sub>1-462</sub> ist ebenfalls AC-aktiv.....	71
4.6.2	Expression und Reinigung .....	72
4.6.2.1	Einfluss von Tensiden .....	73
4.6.3	Membranpräparation Holo Lipj <sub>1-462</sub> .....	74

4.6.4	Expression von <i>Lipj</i> <sub>1-462</sub> in pET16b / BL21(DE3)[pLysS].....	75
4.6.5	<i>Lipj</i> <sub>1-462</sub> – ein Ektoenzym? .....	77
4.6.6	pH-Optimum .....	79
4.6.7	Proteinabhängigkeit.....	79
4.6.8	Substratspezifität .....	80
4.6.9	Kinetische Messungen.....	80
4.6.10	Mögliche Aktivatoren .....	81
4.6.11	Test auf Esterase- und Hydrolase-Aktivität .....	83
4.6.12	Mutante des Holoenzym: <i>Lipj</i> <sub>1-462</sub> C15A .....	83
4.6.13	<i>lipj</i> ist auch in <i>BCG</i> nachweisbar .....	84
4.6.14	Der <i>Lipj</i> -Antikörper.....	85
4.6.15	Nachweisgrenze und Spezifität des Anti- <i>Lipj</i> -Antikörpers .....	86
4.6.16	Detektion von <i>Lipj</i> in <i>E. coli</i> .....	89
4.6.17	Detektion von <i>Lipj</i> in <i>M. smegmatis</i> und <i>BCG</i> .....	91
4.7	Die Kristallstruktur von <i>Lipj</i> .....	93
5	DISKUSSION .....	94
5.1	Charakterisierung der katalytischen Domäne von <i>Lipj</i> .....	94
5.2	Struktur und Katalysemechanismus in <i>Lipj</i> sind neuartig.....	96
5.3	Charakterisierung des Holoenzym <i>Lipj</i> <sub>1-462</sub> .....	102
5.4	Die Kristallstruktur von <i>Lipj</i> <sub>291-462</sub> .....	104
5.5	Modellvorstellung von Struktur und Mechanismus .....	107
5.6	Offene Fragen und Ausblick .....	108
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
7	ANHANG.....	110
7.1	DNA- und Proteinsequenz Rv1900c .....	110
7.2	Ergebnisse aus DNA-DNA BLAST Search.....	112
7.3	Vergleich Rv1900c <i>M. tuberculosis</i> / <i>M. smegmatis</i> .....	115
8	LITERATUR.....	116

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Adenylatcyclasen

Adenylatcyclasen katalysieren die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Das gebildete cAMP ist ein sekundärer Botenstoff und vermittelt intrazelluläre Antworten auf äußere Reize wie Hormone, Neurotransmitter, Kälte oder Licht. Adenylatcyclasen bewirken in einzigartiger Weise die Verstärkung und Weiterleitung eines Signals in den verschiedensten Organismen. cAMP nimmt somit eine Schlüsselrolle in der Regulation von Prozessen wie Stoffwechsel, Zelldifferenzierung, Gentranskription und Verhalten ein. Die Konzentration an cAMP in der Zelle wird über Regulation der Adenylatcyclaseaktivität und den Abbau des Botenstoffs durch Phosphodiesterasen kontrolliert. In Mammalia (Säugetern) überwiegen membranständige Adenylatcyclasen, in Bakterien findet man häufig lösliche Formen. Aufgrund von Strukturmerkmalen wurden Cyclasen in fünf Kategorien eingeteilt: Klasse I Adenylatcyclasen kommen in vielen gramnegativen Bakterien vor. In *E. coli* wurde beispielsweise ein direkter Zusammenhang zwischen der Glucosekonzentration im Medium und dem intrazellulären cAMP-Spiegel festgestellt (Barzu et al., 1994). Klasse II Adenylatcyclasen kommen in Pathogenen wie *Bacillus anthracis* oder *Bordetella pertussis* vor. Diese Enzyme stellen Toxine dar, die sezerniert werden und in Säugerzellen eindringen. Aktiviert durch Calmodulin verursachen sie eine unregulierte cAMP-Produktion in der Zielzelle. Klasse III Adenylatcyclasen kommen in Prokaryoten und Eukaryoten vor und sind in ihrer Struktur eng mit den Guanylatcyclasen verwandt. Sie sind gekennzeichnet durch eine konservierte Faltung des katalytischen Zentrums und wurden aufgrund von Sequenzanalysen kürzlich in vier weitere Subklassen, IIIa – IIId, unterteilt. Basis für die Zuordnung war unter anderem die unterschiedliche Länge der so genannten „Armregionen“. Dieser Region wurde eine wichtige Rolle beim Dimerisierungsprozess von Adenylatcyclasen zugeschrieben (Tesmer et al., 1997), sie schließt eine Sequenz zwischen einem konservierten Glycin und einer der substratspezifisierenden Aminosäuren ein, z.B. D1018 in der AC II der Ratte (Linder und Schultz, 2003). Bei den Klasse IIIa Adenylatcyclasen umfasst diese Sequenz 14 Aminosäuren. In der Klasse der IIIb Adenylatcyclasen findet man eine „Armregion“ von 15 Aminosäuren, sie sind weiterhin gekennzeichnet durch Ausbildung von Homodimeren und enthalten anstatt des substratspezifisierenden Aspartats an dieser Stelle einen Serin- oder Threoninrest. In Klasse IIIc Adenylatcyclasen findet man stark verkürzte oder fehlende Armregionen (Linder und Schultz, 2003). Zwischen dem konservierten Glycin und der

substratspezifisierenden Aminosäure liegen nur 11 Aminosäuren, Austausch in den sechs kanonischen Aminosäuren findet man hier häufig. In Klasse III d besteht die Armregion aus 13-14 Aminosäuren. In dieser Untergruppe ist Lysin zur Substraterkennung hoch konserviert (Linder und Schultz, 2003). Die zunehmende Zahl an abgeschlossenen Genomprojekten zeigt eindrucksvoll, dass Klasse III Adenylatcyclasen in einer Vielzahl von Organismen vorkommen und häufig an andere Domänen gebunden sind. Diese Kombination mit anderen Domänen innerhalb eines Proteins ermöglicht eine Feinregulierung der Aktivität (Linder und Schultz, 2003). Strukturvergleiche zeigen darüber hinaus eine große Ähnlichkeit in Aufbau und Katalysemechanismus zu den Guanylatcyclasen.

Adenylatcyclasen der Klassen IV und V wurden bisher nur in *Aeromonas hydrophila* (IV) und *Prevotella ruminicola* (V) gefunden. Verwandte Strukturelemente zu Adenylatcyclasen weisen auch DNA I Polymerasen aus Prokaryoten auf: Beide Enzymklassen weisen das so genannte „palm“-Motiv in der katalytischen Domäne auf und benötigen zur Katalyse einen metallischen Cofaktor. Dies deutet auf einen gemeinsamen Ausgangspunkt beider Klassen in der Evolution hin (Artymiuk et al., 1997; Tesmer et al., 1999).

### **1.2 Mammalia Adenylatcyclasen**

In Säugern sind neun membranständige und eine lösliche Adenylatcyclase bekannt. Die membranständigen Formen sind durch zwei transmembranspannende Regionen und zwei cytosolische Domänen gekennzeichnet. Diese Domänen sind sich in ihrer Struktur ähnlich und werden als C1- bzw. C2-Schleifen bezeichnet. Die Ausbildung eines Dimers zwischen beiden Schleifen ist Voraussetzung für die katalytische Aktivität als AC (Taussig und Gilman, 1995; Sunahara et al., 1996); es wird dadurch eine katalytische Tasche ausgebildet, in der das Substrat ATP zu cAMP und Pyrophosphat umgesetzt werden kann. Essentiell für diese Reaktion sind sechs kanonische Aminosäuren: Die C1-Schleife stellt zwei Asparatreste, die den metallischen Cofaktor binden, die Aminosäuren zur Substratbindung und der Stabilisierung des Übergangszustandes liegen dagegen auf der C2-Schleife. Die Substraterkennung und -bindung erfolgt über die Aminosäuren Lysin und Aspartat, an der Stabilisierung des Übergangszustands sind die Aminosäuren Asparagin und Arginin beteiligt (Dessauer et al., 1997; Tesmer et al., 1997; Zhang et al., 1997). Die Katalyse wird aktiviert über  $G_{\alpha}$  und Forskolin, hemmend wirken dagegen so genannte P-Site-Inhibitoren (Sunahara et al., 1996; Tesmer et al., 1997).

### 1.3 Mycobakterium tuberculosis

Auch heute noch ist Tuberkulose eine Erkrankung, die in allen Teilen der Welt verbreitet ist und nach wie vor nur unzureichend bekämpft werden kann. Bis heute steht kein Impfstoff zur Verfügung, der eine Infektion sicher verhindert. Arzneistoffe zur Behandlung erkrankter Patienten sind limitiert in Anzahl, Effektivität und Angriffspunkt. Mycobakterium tuberculosis, der Erreger der Tuberkulose, überlebt im Makrophagen der Wirtszelle, indem er erfolgreich die Umwandlung des Phagosoms zu einem sauren, lytischen Kompartiment verhindert. Die Zellwand dieser Bakterien ist durch komplexe Lipidoglykane verstärkt, es verwundert daher nicht, dass laut Genomprojekt ca. 30% der Gene an der Synthese oder dem Metabolismus von Lipiden beteiligt sind (Cole et al., 1998). Bei der Veröffentlichung der kompletten Sequenz des Genoms von *Mycobakterium tuberculosis* H37Rv wurden fünf Gene als Adenylatcyclasen annotiert, durch weiterführende Analysen wurden schließlich 15 mögliche AC-Gene entdeckt (McCue et al., 2000). Verschiedene Arbeiten beweisen für neun dieser Gene, dass die entsprechenden Proteine tatsächlich Adenylatcyclase-Aktivität besitzen: Rv1625c und Rv1264 (Guo et al., 2001; Reddy et al., 2001; Linder et al., 2002), Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c (Linder et al., 2004), Rv0386, Rv1900c (*lipj*), Rv2212, Rv3645 (unveröffentlichte Arbeiten Castro, Weber, Zeibig, Motaal).

### 1.4 Aufgabenstellung

Das Gen *Rv1900c* aus *M. tuberculosis* wurde zu Beginn als *lipj* annotiert, eine mögliche Esterase (Cole et al., 1998). Dies basierte auf der Annahme, dass die Aminosäuren 9-285 am N-terminalen Ende eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase darstellen. Bei näherer Betrachtung konnte C-terminal eine Cyclase-Domäne (cyclase homology domain CHD) identifiziert werden (Aminosäuren 291- 453; McCue et al., 2000), so dass das Model einer kombinierten Hydrolase-/ Cyclase-Domäne nahe lag. Die Adenylatcyclase-Domäne wurde als Klasse IIIc CHD klassifiziert (Linder und Schultz, 2003). In der Literatur wird beschrieben, dass für eine enzymatische Aktivität als Adenylatcyclase sechs kanonische Aminosäuren in bestimmter Reihenfolge nötig sind. In *Rv1900c* findet man jedoch anstelle des Adenin-bindenden Lysins ein Asparagin (N342), ein für die Katalyse essentielles Asparagin ist durch Histidin ersetzt (H402). Mutationsanalysen sollten

## **EINLEITUNG**

---

zeigen, welche Rolle die veränderten Aminosäuren bei der Katalyse spielen und welcher katalytische Mechanismus zugrunde liegt. Weiterhin wurde untersucht, ob für die N-terminale Domäne eine Hydrolasefunktion oder ein Einfluss auf die Adenylatcyclase-Aktivität nachgewiesen werden kann.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

**AGS, Heidelberg:** Restriktionsendonukleasen mit 10x Puffern

**Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg:** *ECL Plus Western Blot Detection System, Hyperfilm ECL, Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit, 2,8-<sup>3</sup>H-cAMP (1,29 TBq/mmol), 8-<sup>3</sup>H-cGMP (566 GBq/mmol), OnePhorAll-Buffer für Restriktionsendonukleasen*

**AppliChem, Darmstadt:** Acrylamid 4K-Lösung 30%  
(37,5 : 1 Acrylamid/Bisacrylamid Fertiglösung)

**Becton-Dickinson, Heidelberg:** *Falcon Tubes*

**BIO-RAD, München:** *BIO-RAD Protein Assay-Reagenz*

**BioGenes, Berlin:** Spezifische Antikörper *Anti-Lipj*

**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 konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase

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

**Greiner Labortechnik, Nürtingen:** Micro-Platten mit Abdeckplatte, TC, steril

**ICN, Eschwege:** Ethidiumbromid Tabletten

## MATERIAL

---

**Hartmann Analytik, Braunschweig:** Radionukleotide [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GTP

**Macherey-Nagel, Düren:** *Nucleotrap Kit*, Blotmembran *porablot PVDF*  
(0.25 x 3 m))

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

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

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

**Novagen, Darmstadt:** *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] und - [pRep4], Vektor *pET16b*

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

**PeqLab, Erlangen:** PeqGOLD Agarose, PeqGOLD Protein Marker

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

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

**Qiagen, Hilden:** *pQE30*-Expressionsvektor, *pREP4*, NiNTA-Agarose

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

**Roth, Karlsruhe:** Glycin, Brilliantblau R250, Ampicillin, Kanamycin

**Schleicher & Schuell, Dassel:** *PROTRAN*-Blotmembran, Whatmanpaper 3MM

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

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

**Stratagene, Heidelberg:** *pBlueskriptII SK(-)*, *E. coli* XL1 BlueMRF'-Zellen

## 2.2 Geräte

**American National Can (USA):** *PARAFILM M*

**Amersham Pharmacia, Freiburg:** Liquid Scintillation Counter Rackbeta 1209, Elektrophorese-Spannungsquelle *EPS 301*

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

**Bender & Hobein, Ulm:** *Vortex Genie 2*

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

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

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

**Christ, Osterode:** Gefriertrocknungsanlage *BETA*

## MATERIAL

---

**Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Werkstatt Pharmazie:**

Flachbett-Gelelektrophoresekammern

**Eppendorf, Hamburg:** Thermoblock *Thermostat 3401* und *5320*, Thermoschüttler *5436*, Tischzentrifugen *3200* und *mini spin*, Kühlzentrifuge *5402*, *BioPhotometer*, Pipetten *Varipette 4810* (0,2-10 µl), *Research* (10-100 µl, 100-1000 µl), *Reference* (10-100 µl, 100-1000 µl), *Multipette*

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

**Gilson:** Pipette 1-20 µl

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

**Heidolph:** MR 2002 Laborrührer

**Heraeus, Osterode:** *Megafuge 1.0R (BS4402/A)*, *Varifuge 3.0*, Ölzentrifuge *4121*, Tischzentrifuge *Biofuge A*, *Laminair HLB2448*

**Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt :** *EM pipetus* Pipettierhilfe

**Hofer, San Francisco (USA) :** Gelgießapparat *Mighty Small SE245*, Gellaufkammer *SE250*

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

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

**KSG Sterilisatoren, Olching:** Hochdruck-Dampfsterilisator *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*

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

**Millipore, Eschborn:** Reinwasseranlage *Milli-Q UF Plus*, *Mill-Q Biocel* und *Elix 3*

**MWG, Ebersberg:** *LI-COR DNA sequencer model 4000*, *BaseImagIR version 4.0* Software

**Promega, Madison (USA):** *Vac-Man* (Vakuumschlüsse zur Plasmidpräparation), *Wizard Minicolumns* (zur Proteinreinigung)

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

**Sartorius, Göttingen:** Tischwaage *BP 2100 S*, Analysenwaage *handy*, Sterilfilter 0.2 µm

**Techne, Princeton (USA):** *DRI-BLOCK DB-2D*

**Vetter, Wiesloch:** UV-Kontaktlampe *Chroma 43*

**Wolf, Geislingen:** Tischaufoklav *Sanoclav*

**WTB Binder, Tuttlingen:** Kühlbrutschrank *KB 240*, Wärmeschränke

## 2.3 Oligonukleotide

### 2.3.1 Sequenzierprimer

Name	Richtung	T <sub>Annealing</sub>	Sequenz (5' → 3')	Plasmid
T3-Primer	s	56°C	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	pBluescript II SK(-)
T7-Primer	as	56°C	TAA TAC GAC GCA CTA TAG GG	pBluescript II SK(-)
U-pQE-IR	s	54°C	GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA	pQE-30
R-pQE-IR	as	54°C	CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG G	pQE-30
pIVEX as	as	56°C	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	pET16b

### 2.3.2 Klonierungsprimer

Name	Position	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
lipj1 s	1	AAA <b>GAT CTA</b> TGG CGC AGG CTC CCC ACA TTC	BglII
lipj1 as	1036	CAC <b>CGG CCG</b> TGT TCA CTT CGC	EagI
lipj2 s	871	AAA <b>GGA TCC</b> GCC GAG CGC ATG CTT GCC AC	BamHI
lipj2 as	1398	CAG <b>CCC GGG</b> ACA TTA GCG CGT G	XmaCI
lipj clc 1 as	1386	AAA <b>ACG CGT</b> GCG CGT GCG GGT GGC GTC GT	MluI
lipj clc 2 s	871	AAA <b>CTC GAG</b> GCC GAG CGC ATG CTT GCC AC	XhoI
lipj clc 2 as	1389	AAA <b>GAG CTC</b> TTA GCG CGT GCG GGT GGC GTC GT	SacI
lipj pET s	1	AAA <b>CAT ATG</b> GCG CAG GCT CCC CAC ATT C	NdeI
lipj pET as	1389	AAA <b>CTC GAG</b> TTA GCG CGT GCG GGT GGC GTC	XhoI

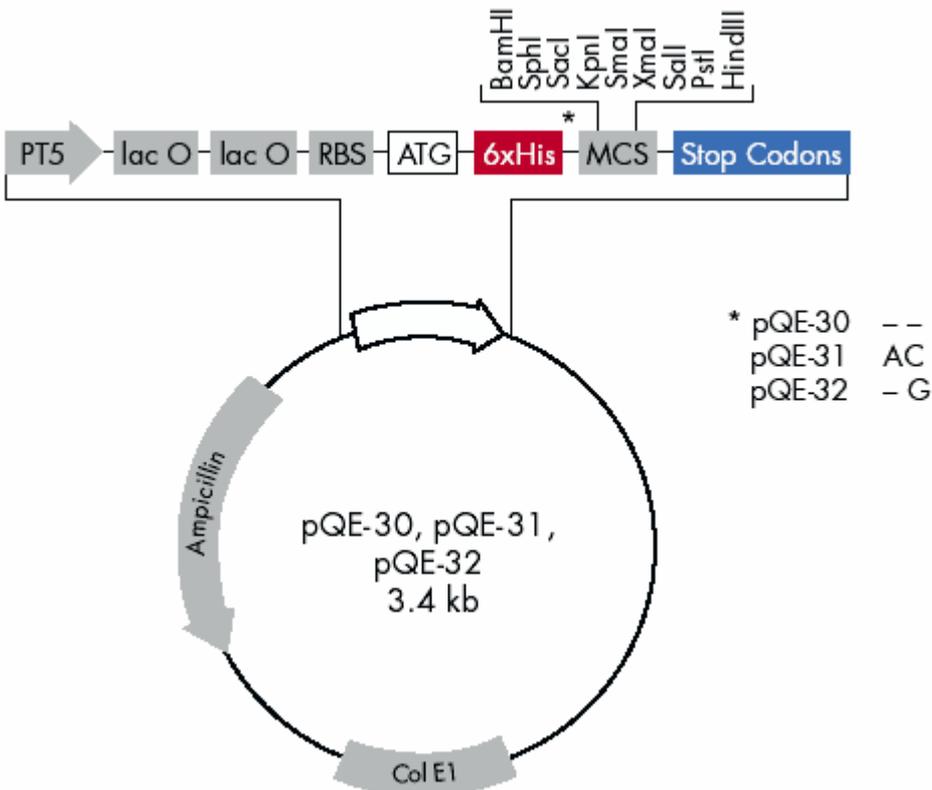
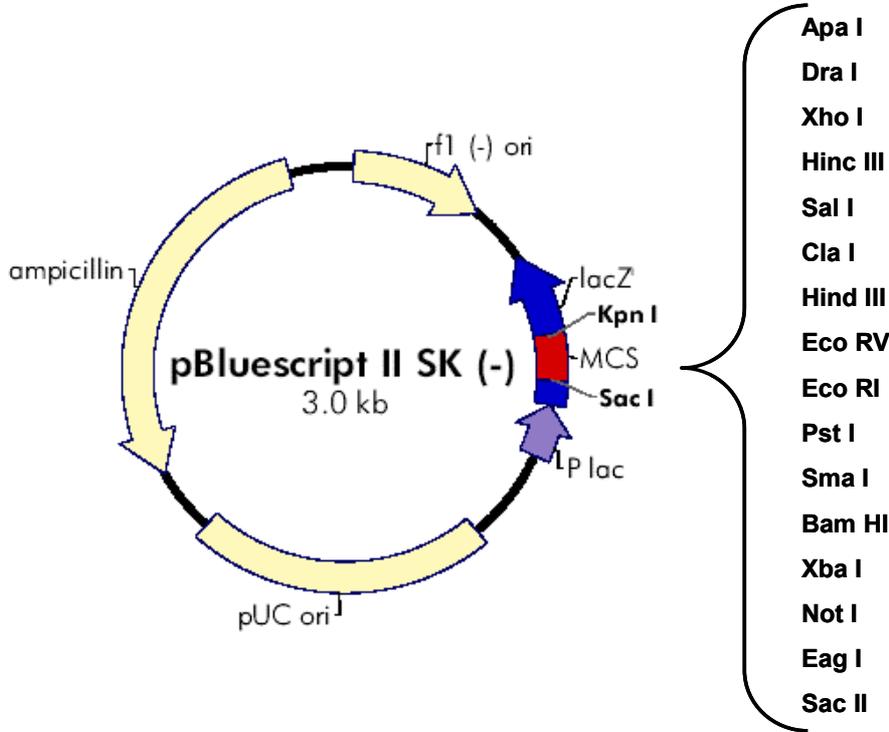
lipj N-K as	1036	CAC <b>CGG CCG</b> TTT TCA CTT CGC	EagI
lipj N-A as	1036	CAC <b>CGG CCG</b> TTG CCA CTT CGC	EagI
lipj N-E as	1036	CAC <b>CGG CCG</b> TTT CCA CTT CGC	EagI
lipj H-N s	1174	CAC <b>GGT ACC</b> GAC GTC GCC GGC GTG GCC GTG AAT ATC G	KpnI
lipj H-A s	1174	CAC <b>GGT ACC</b> GAC GTC GCC GGC GTG GCC GTG GCA ATC GGT GC	KpnI
lipjholo C15A	1	AAA <b>GAT CTA</b> TGG CGC AGG CTC CCC ACA TTC ACA GGA CCC GCT ACG CAA AAG CAG GCG ACA	BglII
lipj D-A s	1174	CAC <b>GGT ACC</b> GCC GTC GCC GGC GTG	KpnI
lipj D302A s	871	AAA <b>GGA TCC</b> GCC GAG CGC ATG CTT GCC ACC ATC ATG TTT ACC GCC ATC GTC G	BamHI
lipj D302E s	871	AAA <b>GGA TCC</b> GCC GAG CGC ATG CTT GCC ACC ATC ATG TTT ACC GAG ATC GTC G	BamHI
lipj D346A s	1025	ACA <b>CGG CCG</b> GTG CCG GTT TCG TC	EagI
lipj D346E s	1025	ACA <b>CGG CCG</b> GTG AGG GTT TCG TC	EagI
lipj R406A s	1174	CAC <b>GGT ACC</b> GAC GTC GCC GGC GTG GCC GTG CAT ATC GGT GCG GCC GTC TGC	KpnI
lipj E-A as	1036	CAC <b>CGG CCG</b> TGT TCA CTG CGC GAC CGC	EagI
lipj V-A as	1036	CAC <b>CGG CCG</b> TGT TCG CTT CGC GAC	EagI
lipj T-A as	1036	CAC <b>CGG CCG</b> CGT TCA CTT CG	EagI
lipj F-A s	1025	ACA <b>CGG CCG</b> GTG ACG GTG CCG TCG CGA C	EagI
lipj K442A s	1286	CAC GGC <b>ACC GGT</b> TCG CCG AGC GTG GTG AGC AGG AAC TCG CAG GCG TAC	PinAI
lipj R377A as	1188	GAC GTC <b>GGT ACC</b> GTG CGA GGC ATC GCG CAC CTC GAC CTC GCC CGC ATG AAT ACC GAT CGC GAC CTC	KpnI

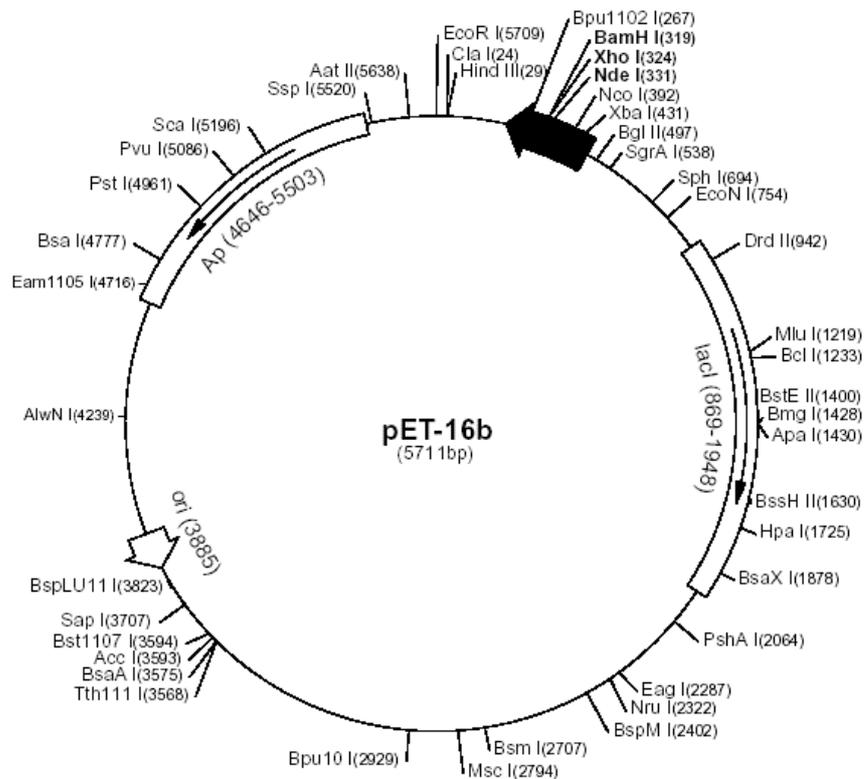
(vgl. DNA-Sequenz Rv1900c, 7.1; die angegebenen Positionsnummern beziehen sich jeweils auf die erste bindende Base des Primers)

**MATERIAL**

**2.4 Plasmide**

(Quelle: Homepages Fa. Stratagene/Qiagen/Novagen)





## 2.5 Puffer und Lösungen

### 2.5.1 Molekularbiologie

#### 2.5.1.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA

TAE

40 mM Tris/Acetate pH 8.0  
1mM EDTA

10x TBE-Puffer (LI-COR)

1.34 M Tris  
440 mM Borsäure  
25 mM EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 7.5  
1 mM EDTA

BX-Puffer für Agarosegele

1x TAE  
5 % Glycerol  
0.5% Bromphenolblau  
0.5% Xylencyanol

## MATERIAL

---

### 10x CM

100 mM CaCl<sub>2</sub>  
100 mM MgCl<sub>2</sub>

### 10x Dephosphorylierungspuffer

500 mM Tris/HCl pH 8.5  
1 mM EDTA

### dNTPs

20 mM pro dNTP

### 10x Klenowpuffer BSA-frei

200 mM Tris/HCl pH 7.9  
60 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Dithiothreitol  
frisch zuzugeben: 5% BSA

### 2.5.1.2 Medien für *E. coli*

#### LB-Medium

20 g/l LB Broth

#### LB-Medium mit Antibiotika

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

#### LB-Medium für Dauerkulturen

20 g/l LB Broth  
20% Glycerol

#### LB- Plattenagar mit Antibiotika

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

#### LB-Plattenagar

35g/l LB Agar

## 2.5.2 Proteinchemie

### 2.5.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

#### Trenngelpuffer

1.5 M Tris/HCl pH 8.8  
0.4% SDS

#### Sammelpuffer

500 mM Tris/HCl pH 6.8  
0.4% SDS

#### Hoefer-Laufpuffer

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0.1% SDS

#### 4x Probenpuffer

130 mM Tris/HCl pH 6.8  
10% SDS  
20% Glycerol  
10% β- Mercaptoethanol  
0.06% Bromphenolblau

**Coomassie Färbelösung**

0.2% Brilliant Blue R250  
40% Methanol  
1% Essigsäure

**Entfärber**

10% Essigsäure  
30% Ethanol

**2.5.2.2 Westernblotting****Towbin-Transferpuffer**

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20% Methanol

**M-TBS**

5% Milchpulver  
in TBS-Puffer

**TBS-Puffer**

20 mM Tris/HCl pH 7.6  
0.8% NaCl

**TBS-T**

0.1% Tween 20  
in TBS-Puffer

**2.5.2.3 Immunodetektion****PBS (pH 7.4)**

8 g NaCl  
0.2 g KCl  
1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

**PBG**

0.2% Gelatine  
0.5% BSA  
in PBS

**2.5.2.4 Puffer zur Resuspendierung von Zellen****Zellwaschpuffer**

50 mM Tris/HCl pH 8.0  
1 mM EDTA

## MATERIAL

---

### 2.5.2.5 Lösungen zur Zellyse und nativen Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung

#### Suspensionspuffer

50 mM Tris/HCl pH 8  
0.02%  $\alpha$ -Monothioglycerol

#### Lysozym-Lösung

40 mg/ml Lysozym (aus Hühnerei)  
10 mM Tris/HCl pH 7.5  
10 % Glycerol

#### DNase-Lösung

2mg/ml DNase I  
10 mM Tris/HCl pH 7.5  
10 % Glycerol

#### Hochsalzpuffer

250 mM NaCl  
15 mM Imidazol  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
in Suspensionspuffer

#### Niedrigsalzpuffer

15 mM Imidazol  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
in Suspensionspuffer

#### Elutionspuffer

250 mM Imidazol  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
in Suspensionspuffer

### 2.5.2.6 Lösungen zur denaturierenden Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung

#### Puffer A

50 mM Tris/HCl pH 8  
6 M Guanidiniumchlorid

#### Puffer E

50 mM Acetatpuffer pH 4.5  
8 M Harnstoff

#### Puffer B

50 mM Tris/HCl pH 8  
8 M Harnstoff

#### Dialysepuffer D

10 mM TES/NaOH pH 8. oder  
10 mM TRIS/HCl pH 7.5  
1 M Glycin  
3 mM MgCl<sub>2</sub>  
20% Glycerol  
0.02%  $\alpha$ -Monothioglycerol

#### Puffer C

50 mM HEPES/HCl pH 6.7  
8 M Harnstoff

### 2.5.3 Lösungen für AC- und GC-Test

#### 1.5x AC-Stoppuffer

3 mM cAMP  
3 mM ATP  
1.5% SDS

#### 2x AC-Cocktail

50% Glycerol  
100 mM TRIS/HCl bzw. TES/NaOH  
(pH 7.5 bzw. 8.1)  
4 mM cAMP inkl. 2-4 kBq/ml  
[2,8-<sup>3</sup>H-cAMP]  
30 mM MnCl<sub>2</sub>

#### 1.5x GC Stoppuffer

1.5 % SDS

#### 2x GC-Cocktail

analog 2x AC-Cocktail.  
entsprechend  
cGMP bzw.  
[8-<sup>3</sup>H-cGMP]

### 2.5.4 Lösungen für Hydrolase-Tests

#### Lipase-Testpuffer 1

Tris/HCl 10 mM pH 9.0  
CaCl<sub>2</sub> 10 mM  
Triton X100 0.1%

#### Lipase-Testpuffer 2

Tris/HCl 10 mM pH 7.5  
CaCl<sub>2</sub> 1 mM  
Triton X100 0.1%

### 3 METHODEN

#### 3.1 Gentechnologische Methoden

##### 3.1.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Bakterien wurden für 12-20 h bei 37°C in LB-Medium kultiviert und durch Zentrifugation geerntet. Isolierung und Reinigung der Plasmide erfolgte nach Herstellerprotokoll mittels *Wizard-Plus-Plasmid-Purification-Kit*, anschließend wurde die DNA mit 50 µl Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

##### 3.1.2 Trennung und Detektion von DNA mit Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte oder mit Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA wurde mit BX-Puffer versetzt (ca. 1:10) und auf ein Agarosegel aufgeladen; je nach erwarteter Fragmentgröße betrug die Agarosekonzentration zwischen 0.8 bis 2%. Elektrophorese erfolgte mit TAE-Puffer bei einer Spannung von 80-100 V für ca. 1h, anschließend wurde die DNA durch Einlegen in Ethidiumbromid (0.01 mg/ml) angefärbt. Nach weiteren 10 min Elektrophorese konnten die Banden auf dem Gel mittels UV-Licht detektiert und über ein Videoprintersystem dokumentiert werden.

*EcoRI/HindIII*-verdaute  $\lambda$ -DNA ( $\lambda$ -Marker) und *MspI/SspI*-verdautes Plasmid *pBluescript II SK(-)* ( $\pi$ -Marker) dienten als Standard zur Fragmentgrößenbestimmung.

##### 3.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und nach Herstellerangaben mittels *NucleoTrap-Kit* gereinigt. Eluiert wurde mit 25-40 µl Wasser.

##### 3.1.4 Reinigung und Entsalzung von DNA

Durchführung nach Vorschrift des Herstellers mit *NucleoTrap-Kit*, z.B bei Mehrfachverdauen, die nicht unter denselben Pufferbedingungen möglich waren. Eluiert wurde mit 25-40 µl Wasser.

### 3.1.5 Restriktionsverdau von DNA

DNA wurde entsprechend Herstellerangaben typischerweise in einem Volumen von 10  $\mu$ l verdaut. Die DNA-Menge betrug 200–500  $\mu$ g und wurde mindestens 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Konzentrationsabschätzung dienten die unter 3.1.2 beschriebenen Marker.

### 3.1.6 Glätten von DNA-Überhängen

Für Ligationen ohne überhängende Enden mussten gegebenenfalls einzelsträngige DNA-Überhänge von PCR-Produkten entfernt werden. Dazu wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I verwendet. Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt:

0.5-3  $\mu$ g DNA, 0.8 U Enzym, 5  $\mu$ g BSA und 1  $\mu$ l 10x Klenow-Puffer in einem Volumen von 10  $\mu$ l. Nach dem Mischen wurden die Ansätze für 10 min bei 37°C vorinkubiert (Abbau der Überhänge), im Anschluss wurden *dNTPs* auf eine Endkonzentration von 2.5 mM hinzugefügt (Auffüllen von überschüssig abgespaltenen Nukleotiden) und weitere 30 min inkubiert. Nach Reaktionsende erfolgte eine Hitzedenaturierung des Enzyms bei 70°C über 10 Minuten.

### 3.1.7 5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten

Geglättete Enden von PCR-Produkten besitzen keine freie 5'-Phosphatgruppe mehr, die Voraussetzung für eine Ligation ist. Diese wurden mit der *T4-Polynukleotidkinase* eingeführt. Dazu wurde dem *Klenow*-Ansatz 10 U Enzym, 2.5  $\mu$ l 10 mM ATP und 1.5  $\mu$ l Reaktionspuffer hinzugefügt. Die Reaktionszeit bei 37°C betrug 60 Minuten.

### 3.1.8 5'-Dephosphorylierung von Plasmid-Vektoren

Um Religation von linearisierten Plasmiden zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatreste mithilfe des Enzyms *Alkalische Phosphatase* entfernt. Dazu wurde nach erfolgtem Restriktionsverdau dem Ansatz 2  $\mu$ l Enzym sowie 3  $\mu$ l Puffer hinzugefügt und das Reaktionsvolumen mit Wasser auf 30  $\mu$ l ergänzt. Inkubation erfolgte über eine Stunde bei 37°C.

### 3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligationen erfolgten mit dem *Rapid DNA Ligation Kit* nach Angaben des Herstellers. Üblicherweise wurden 50 ng Vektor-DNA eingesetzt und das Insert in 2-fachem molarem Überschuss zugegeben. Der Ansatz wurde bei RT über 25 Minuten inkubiert.

### 3.1.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(Vgl. Mullis et al., 1987))

Die Anlagerungstemperatur  $T_{Annealing}$  eines Primers wurde näherungsweise über folgende Formel errechnet:  $T_{Annealing} [^{\circ}\text{C}] = 4 \cdot (\text{GC}) + 2 \cdot (\text{AT})$

- GC = Anzahl der bindenden GC-Basenpaare
- AT = Anzahl der bindenden AT-Basenpaare

Falls sich die Anlagerungstemperaturen gemeinsam eingesetzter Primer unterschieden, wurde mit der niedrigsten errechneten Temperatur gearbeitet. Die Amplifikation erfolgte in 0.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen im *TRIO-Thermoblock Thermocycler*.

Pro Ansatz (50 µl) waren enthalten:

*Template*-DNA

je 200 µM aller 4 dNTPs

je 500 nM beider Primer

1 U *Taq*-Polymerase

5% DMSO

PCR-Puffer

Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne *Template*-DNA.

**Tabelle 3-1: PCR-Programm**

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen (je nach template-DNA)
Denaturierung	95	5	
Denaturierung	95	1	40
Annealing	$T_{Annealing}$	1	(genomische DNA)
Elongation	72	1.5	bzw.
Elongation	72	10	30
Reaktionsende	4	∞	(Miniprep-DNA)

### 3.1.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Didesoxymethode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte mittels *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit*. In PCR-Cups wurden je 2 µl Reaktionslösung vorgelegt und anschließend 4 µl von folgendem Mix zugegeben:

- 10 µl Miniprep-DNA (1-2 pmol, ca. 130ng/ 1000 Basenpaare)
- 0.7 µl DMSO
- 2 pmol fluoreszenzmarkierter Primer

Wasser ad 18 µl

Die Reaktionsansätze wurden mit 10 µl *Chill Out 14 Liquid Wax* überschichtet und kurz zentrifugiert. Nachfolgende Tabelle zeigt das verwendete Temperaturprogramm.

**Tabelle 3-2: PCR-Programm zur DNA-Sequenzierung**

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Zyklen
Denaturierung	95	120	
Denaturierung	95	20	
Annealing	$T_{Annealing}$	20	30
Elongation	70	30	
Reaktionsende	4	∞	

Nach Reaktionsende wurden 6 µl Stopppuffer zur Denaturierung der DNA zugegeben. Je 1-1,2 µl der Proben wurden auf ein 6%-Polyacrylamidgel zur elektrophoretischen Auftrennung aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50°C, einer Leistung von 50 W, einer maximalen Spannung von 1500 V und einer Stromstärke von 37 mA im *LI-COR DNA sequencer*.

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.3-0.4 erfolgte eine Inkubation auf Eis für 10

Minuten, anschließend wurden die Zellen bei 4°C abzentrifugiert (1000xg, 15 min). Nach vorsichtigem Resuspendieren in 50 ml eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 50 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> mit 20% Glycerol aufgenommen, weitere 2 h auf Eis gestellt und zuletzt in 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

### 3.2.2 Standardtransformation von *E. coli*-Zellen

Ein Ligationsansatz mit zirkulärer-Plasmid DNA wurde mit 10 µl 10x CM-Puffer versetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe der Mischung zu 100 µl leicht angetauten kompetenten Zellen wurde der Ansatz 20 min auf Eis gelagert, dann für 60 sec bei 42°C hitzegeschockt und erneut für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Zur Ausbildung der nötigen Antibiotikaresistenz wurden die Bakterien mit 500 µl LB-Medium versetzt und unter Schütteln für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50-250 µl des Ansatzes auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen, mit dem restlichen Volumen wurden 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und bei 37°C für mindestens 12h weiter inkubiert.

### 3.2.3 Schnelltransformation von *E. coli*-Zellen

100 µl kompetente Bakterienzellen wurden mit 100-200 ng Plasmid-DNA gemischt und 10 min auf Eis inkubiert, dann für 60 sec bei 42°C hitzegeschockt und erneut für weitere 5 min auf Eis inkubiert. 20-100 µl des Ansatzes wurden auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen oder in 5 ml LB-Flüssigmedium überimpft. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für mindestens 12h bei 37°C.

### 3.2.4 *E. coli*-Dauerkulturen

Dauerkulturen wurden angelegt, um wichtige Plasmide aufzubewahren und zum Animpfen von Expressionskulturen. Dazu wurde 1 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert und vorsichtig in 750 µl *LB-Medium für Dauerkulturen* resuspendiert. Die Zellen wurden bei -80°C eingefroren.

### 3.2.5 Blau-Weiß-Screen

Der Blau-Weiß-Screen ist eine Methode um zu überprüfen, ob ein Bakterium ein rekombiniertes Plasmid aufgenommen hat. Dazu wurden die transformierten *E. coli* XL1 Blue auf Agarplatten mit 40 µl 100 mM IPTG und 40 µl 2% *X-Gal* ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht erschienen Klone mit rekombiniertem Plasmid weiß, Klone mit Plasmid ohne Insert dagegen blau.

## 3.3 Proteinchemische Methoden

### 3.3.1 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das *BIORAD PROTEIN ASSAY*-Reagenz nach Herstellerangaben verwendet. Die Proteinlösung wurde in 800 µl Wasser piettiert, anschließend wurden 200 µl des Reagenz zugegeben und durch Vortexen gut gemischt. Die Proben wurden bei 595 nm photometrisch vermessen. Als Standards dienten 0, 4, 8, 12, 15 und 20 µg BSA.

### 3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ist ein elektrophoretisches Verfahren zur Trennung von Proteinen nach Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Verwendet wurde eine Minigel-Apparatur der Firma Hoefer nach Herstellerangaben, die Elektrophorese erfolgte mit *Hoefer-Laufpuffer*. Je nach erwartetem Molekulargewicht wurden verschiedenprozentige Trenngele eingesetzt (bis ca. 30 kDa 15%ige, >30 kDa 12.5%ige Trenngele). Die angegebenen Rezepturen ergeben je zwei Minigele.

Sammelgel	4.5 %	Trenngel	12.5 %	15 %
Sammelgelpuffer	1 ml	Trenngelpuffer	3 ml	3 ml
Wasser	2.4 ml	Wasser	4 ml	3 ml
Acrylamid 4K-Lösung 30%	0.6 ml	Acrylamid 4K-Lösung 30%	5 ml	6 ml
10 % APS	40 µl	10 % APS	10 µl	10 µl
TEMED	10 µl	TEMED	80 µl	80 µl

Als Größenstandard wurde *peqGOLD*-Marker oder eine Mischung von Markerproteinen bekannter Größe mit auf das Gel aufgetragen. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit *4x Probenpuffer* gemischt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Elektrophorese wurde mit

maximal 20 mA/Gel und 200 V durchgeführt und war beendet, wenn die Bromphenolblau-Front das Gelende erreicht hatte. Proteinbanden wurden durch Einlegen in *Coomassie* und anschließend in *Entfärberlösung* sichtbar gemacht.

### 3.3.3 Westernblot

Beim Westernblot wurden Proteinbanden von einem SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, anschließend folgte eine Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern. In allen Westernblots wurde als primärer Antikörper *AntiLipj* verwendet (s. 4.6.14); Es handelt sich hierbei um einen spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen die katalytische Domäne von *Lipj*. Die IgG wurden von der Firma Biogenes hergestellt und affinitätsgereinigt.

Als sekundärer Antikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Fc-Antikörper eingesetzt, der mit POD konjugiert war. Die Antikörper wurden jeweils frisch in M-TBS mit 0.1% *Tween 20* verdünnt. Eine Blotmembran wurde auf Größe des Gels zugeschnitten und nacheinander für 10 min in Methanol, 10 min in Wasser und anschließend 15 min in *Towbin-Transferpuffer* eingelegt. In die Blotapparatur wurden erst 3 Lagen mit Towbinpuffer getränktes *Whatmanpapier* gelegt, die ebenfalls Gelgröße hatten. Es folgte die Membran, das Gel und zuletzt 3 weitere Lagen mit Puffer getränktes *Whatmanpapier*. Der Blotvorgang erfolgte über 2.5 h bei einer Spannung von 20 V und einer Stromstärke von 200 mA. Auf die Membran übertragene Proteinbanden ließen sich mit *Ponceau S* reversibel anfärben. Markerbanden wurden mit Bleistift markiert. Westernblots wurden mit 15% PAGE-Gelen durchgeführt.

#### Immunodetektion

Folgende Schritte zur Antikörperbindung wurden durchgeführt:

- Blockieren der Membran mit *M-TBS* (1 h)
- Waschen mit *TBS-T* (2x 2 min)
- Bindung des primären Antikörpers (1 h, Verdünnung 1:5000)
- Waschen mit *TBS-T* (1x 15 min, 2x 5 min)
- Bindung des sekundären Antikörpers (1 h, Verdünnung 1:5000)
- Waschen mit *TBS-T* (1x 15 min, 2x 5 min)

Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem *ECL Plus Western Blot Detection System* nach Herstellerangaben. Nach der vorgeschriebenen Inkubationszeit für die Lumineszenz-Reaktion wurden ECL Hyperfilme belichtet, die Expositionszeit wurde zwischen 2 sec und 5 min variiert.

### 3.3.4 Immunogoldmarkierung von *E. coli*

Durchführung mit Dr. H. Schwarz (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen)  
Um Proteine in Expressionskulturen von *E. coli* lokalisieren zu können, wurde eine Immunogoldmarkierung mit anschließender Elektronenmikroskopie durchgeführt. Ziel war es, die Zellen möglichst in natürlichem Zustand zu fixieren. Dazu wurden Bakterien durch Zentrifugation konzentriert, in Dialyseschläuche von 0.1 mm Durchmesser aufgenommen und anschließend nach einer Standardvorschrift des Labors kryofixiert. Nach Einbettung der Zellen in eine Kunststoffmatrix wurden Ultradünnschnitte hergestellt. Zur Immunodetektion wurde spezifischer *AntiLipj*-Antikörper (2 µg/ml in *PBG*) und ProteinA (konjugiert mit 15 nm-Gold) verwendet.

### 3.3.5 Plasmolyse und Glutaraldehydfixierung

Zur Plasmolyse von *E. coli*-Zellen wurde 1 ml Expressionskultur abzentrifugiert und in 900 µl *PBS* –Puffer mit 25% Sucrose zur Plasmolyse resuspendiert. Dabei bleibt die Zellwand starr, durch den osmotischen Druck wird die Membran nach innen gezogen. Vor der Durchführung muss die Plasmolysezeit der Zellen im voraus unter Phasenkontrast im Lichtmikroskop festgestellt werden: Die Zellen erscheinen im Phasenkontrast nach erfolgter Plasmolyse schwärzer und weniger beweglich. Für *E. coli* BL21(DE3)[pRep4] lag die optimale Plasmolysezeit bei 7-10 min. Anschließend werden sofort 100 µl Glutaraldehyd 25% zu einer Endkonzentration von 2.5% zugesetzt und durch vorsichtiges Pipettieren gemischt. Nach einigen Minuten Einwirkdauer werden die Proben auf Eis gelagert.

## 3.4 Proteinexpression

Aus Dauerkulturen von *E. coli*-Expressionszellen wurde eine LB-Vorkultur mit den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Als Expressionszellen kamen entweder BL21(DE3)[pRep4] –Zellen oder BL21(DE3)[pLysS]-Zellen zum Einsatz. Am Folgetag wurde ein Aliquot dieser Kultur im Verhältnis 1:40 in frisches, antibiotikahaltiges Medium überimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.4-0.5 bei 30°C geschüttelt. Um die Proteinexpression zu induzieren, wurde IPTG in einer Endkonzentration von 60 µM zugegeben und weiter inkubiert. Je nach Expressionstemperatur (20-25°C) wurden die Zeiten der Proteinexpression von 3-20 h variiert.

### 3.5 Zellernte

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (2600x g, *Kontron, A8.24-Rotor*,) geerntet und in 40 ml Zellwaschpuffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (*Heräus*) erfolgte ein Kälteschock mit flüssigen N<sub>2</sub> und Lagerung bei -80°C.

### 3.6 Zellyse

Sofern nicht weiter erwähnt, wurde die Zellyse mittels Ultraschallstab durchgeführt. Dazu wurden bei -80°C eingefrorene Kulturen langsam aufgetaut und die Zellen in 20 ml *Suspensionspuffer* resuspendiert, anschließend wurde der Lysevorgang durch 30 sec Behandlung mit dem Ultraschallstab eingeleitet. Zur Auflösung von Zellwänden folgte eine Inkubation mit 100 µl *Lysozym* (30 min auf Eis). Da die dabei freigesetzte DNA die Viskosität der Probe stark erhöhte, wurde im Anschluss noch mit 100 µl DNase-Lösung und 100 µl 1M MgCl<sub>2</sub> für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile schloss sich eine 30minütige Zentrifugation an (*31 000x g, Kontron, SS34-Rotor*).

### 3.7 Native Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätsreinigung

Alle untersuchten Proteine wurden mit einem Hexa- oder Deca-His-Tag exprimiert (Hexa-His-Tag kodiert in *pQE30*, Deca-His-Tag kodiert in *pET16b*). Die Reinigung wurde nach dem QIAexpressionist-Protokoll (Qiagen, Third Edition, 2001) durchgeführt. Zum Überstand der unter 3.6 beschriebenen Zentrifugation wurden 250 mM NaCl und 15 mM Imidazol (Endkonzentrationen) zugegeben, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose wurde voräquibriert, um den Ethanolgehalt der Stammlösung zu verdünnen. Dazu gab man typischerweise 250 µl der Agarose in 5 ml *Suspensionspuffer*, der zuvor mit 250 µl 5M NaCl, 75 µl 1 M Imidazol pH 8.0 und 25 µl MgCl<sub>2</sub> 1M versetzt wurde. Diese Harzsuspension wurde zu 20 ml Überstand zugefügt. Unter leichtem Schütteln auf Eis konnte das Protein über mindestens 1 h an das Harz binden.

Nachfolgend wurde das Harz für 7 min abzentrifugiert, mit 5 ml *Hochsalzpuffer* aufgenommen und auf eine *Wizard*-Minisäule aufgegeben. Das Waschen des Proteins erfolgte mit je 5 ml *Hoch-* und *Niedrigsalzpuffer*, abschließend wurde mit 400 µl *Elutionspuffer* eluiert. Als Frostschutz zur Lagerung bei -20°C diente ein Zusatz von 20% Glycerol.

### 3.8 Denaturierende Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätsreinigung

Proteine wurden mit einem His-Tag in BL21(DE3)[pRe4]-Zellen in einem Volumen von 200 ml exprimiert. Nach Zellernte wurde der Niederschlag in 10 ml *Puffer A* aufgenommen und mit 0.2% Tween 20 sowie 6 mM 2-Mercaptoethanol versetzt. Nach Resuspension der Zellen erfolgte Zelllyse durch 30 sec Ultraschallbehandlung, das Lysat wurde 60 min bei 37°C leicht geschüttelt. Durch Zentrifugation (5 min/Eppendorf Tischzentrifuge 320) wurden unlösliche Zellbestandteile abgetrennt, der Zentrifugationsüberstand wurde mit 200 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose versetzt und 60 min bei Raumtemperatur geschüttelt (Bindung des Proteins an das Harz). Nachfolgend wurde das Harz für 7 min abzentrifugiert, mit 4 ml *Puffer B* aufgenommen und auf eine Wizard-Minisäule aufgegeben. Das Waschen des Proteins erfolgte mit je 4 ml *Puffer B* und *Puffer C*, abschließend wurde mit 400 µl *Puffer E* eluiert. Zur Renaturierung des Proteins wurden 50 µl Reinigungseluat langsam zu 1 ml *Dialysepuffer D* bei 4°C zugetropft und 60 min auf Eis inkubiert.

### 3.9 Membranpräparation

Diese Methode wurde angewendet, um membranassoziierte Proteine zu lösen und damit eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung zu ermöglichen. Dazu wurden Zellen mit exprimiertem Protein (400 ml Expressionsvolumen) nach -80°C-Lagerung langsam angetaut und in einem Lysispuffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 50 mM NaCl) resuspendiert. Lyse erfolgte durch 3x10 sec Ultraschall und anschließenden French-Press-Aufschluss (3x 1200 PSI). Das erhaltene Zellhomogenat wurde für 30 min bei 4°C bei 3000xg zentrifugiert, um Zelltrümmer u.s.w. abzutrennen. Zur Abtrennung der Membranfraktion erfolgte anschließend eine Zentrifugation des erhaltenen Überstandes in der Ultrazentrifuge (100 000xg, 1h, 4°C). Der erhaltene Niederschlag wurde in 20 ml Suspensionspuffer in einem Glashomogenisator vorsichtig homogenisiert und anschließend unter Zusatz von 1% Polidocanol 1h auf Eis geschüttelt. Es folgte eine weitere Zentrifugation in der Ultrazentrifuge unter den gleichen Bedingungen, um das durch das Tensid gelöste Protein von Membranstücken abzutrennen.

Der erhaltene Überstand wurde einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung unterzogen, folgende Parameter des Standardprotokolls (s. 3.7) wurden geändert:

- Binden des Proteins an das Harz über Nacht
- Hoch- und Niedrigsalzpuffer enthielten zusätzlich 1% Polidocanol.

### 3.10 Enzym-Assays

#### 3.10.1 Adenylatcyclase-Test

Der Test auf Adenylatcyclase-Aktivität von gereinigtem Protein oder Zellhomogenaten erfolgte nach dem Verfahren von Salomon et al. (1974). Dabei wird das enzymatisch gebildete cAMP chromatographisch mit zwei hintereinander geschalteten Säulen von nicht umgesetzten ATP abgetrennt. Die erste der beiden Säulen ist mit 1.2g *Dowex-50w40-400* befüllt, welches ein Kationenaustauschmaterial ist, in der zweiten befindet sich 1g *Aluminiumoxid*.

Ein Standardtest wurde über 10 min bei 37°C durchgeführt und hatte ein Reaktionsvolumen von 100 µl. Dazu wurde die zu untersuchende Proteinlösung in 40 µl vorgelegt, 50 µl 2x- AC-Cocktail zugegeben und die Reaktion mit 10 µl ATP-Lösung (0.2-5 mM) gestartet. Bei der Untersuchung von Zellhomogenaten diente ein Zusatz von 225 µg Kreatinkinase und 3mM Kreatinphosphat als ATP-regenerierendes System. Für spezielle Anforderungen, z.B. Untersuchung von kinetischen Parametern wurden die Volumina entsprechend angepasst. Die Startlösung enthielt  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-markiertes ATP als Tracer, so dass im Szintillationszähler das Reaktionsprodukt <sup>32</sup>P-cAMP detektiert werden konnte. Zur Bestimmung der jeweiligen Säulenausbeute war im Cocktail <sup>3</sup>H-cAMP als interner Standard zugesetzt. Um den Säulenhintergrund zu bestimmen wurden je 2 Proben ohne Protein eingesetzt (Leerwert). Alle Werte wurden doppelt gemessen. Nach Ablauf der 10 min Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl 1.5x AC-Stoppuffer und 750 µl Wasser beendet. Nach Aufgabe der Proben auf die *Dowex*-Säulen (Trennung von ATP und cAMP) folgte ein Waschschrift mit 3 ml Wasser, anschließend wurden die Ansätze mit 5 ml Wasser auf die *Aluminiumoxidsäulen* eluiert. Zuletzt wurde mit 4.2 ml Tris/HCl (0.1 M, pH 7.5) in mit 4 ml *Szintillator Ultima Gold XR* befüllte Szintillationsgefäße eluiert und die Proben im Liquid Scintillation Counter ausgezählt. Zur Bestimmung der eingesetzten Mengen von radioaktiv markiertem cAMP und ATP wurden sogenannte <sup>3</sup>H- und <sup>32</sup>P-Totals direkt in Elutionspuffer und Szintillator ausgezählt. Die enzymatische Aktivität (A) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned}
 & A \left[ \frac{\text{pmol [cAMP]}}{\text{mg [Protein] x min}} \right] = \frac{\text{Substrat } [\mu\text{M}]}{\text{Zeit [min]}} \times \frac{10^5}{\text{Protein } [\mu\text{g}]} \\
 & \times \frac{\text{cpm } [^{32}\text{P}] \text{ Probe} - \text{cpm } [^{32}\text{P}] \text{ Leerwert}}{\text{cpm } [^{32}\text{P}] \text{ Total}} \times \frac{\text{cpm } [^3\text{H}] \text{ Total}}{\text{cpm } [^3\text{H}] \text{ Probe} - 3 \% [^{32}\text{P}] \text{ Probe}}
 \end{aligned}$$

Als Negativkontrollen bei der Vermessung von ungereinigten Proteinen diente eine Probe mit leerem Expressionsvektor in derselben Zelllinie. Alle Messwerte wurden mindestens als Doppelwerte bestimmt, Standardabweichungen lagen gewöhnlich unter 10 %. Alle Werte, die nicht mindestens dem doppelten Leerwert entsprachen, wurden als Null gewertet.

Regeneration der *Dowex*-Säulen: 1x 5ml HCl 2N, 3x 5 ml Wasser

Regeneration der *Aluminiumoxid*-Säulen: 2x 5 ml Tris/HCl 0.1 M, pH 7.5

### 3.10.2 Guanylatcyclase-Test

Der GC-Test wurde bis auf folgende Änderungen analog zum AC-Test durchgeführt:

Es wurden die entsprechenden Guaninnukleotide eingesetzt; die *Dowex*-Säulen waren mit 4g Säulenmaterial beladen, die Aluminiumoxidsäulen mit 0.8 g. Die Elution von den *Dowex*-Säulen erfolgte mit nur 2 ml Wasser. Nach Ablauf der 10 min Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl 1.5x GC-Stoppuffer und 750 µl Wasser beendet.

### 3.10.3 Hydrolase-Tests

Gereinigte Proteine wurden auf Hydrolase-Aktivität mit Nitrophenyl-Estern als potentielle Substrate getestet. Für Esterase-Tests wurden p-Nitrophenylcaproat (4.5 mM) und p-Nitrophenylacetat (gesättigte Lösung) als Substrate eingesetzt, für Phosphatase-Tests p-Nitrophenyl-Phosphat (1.35 mM). Das Testprinzip beruht auf der Hydrolyse der verschiedenen farblosen Substrate zu gelblichem p-Nitrophenol (im Basischen). Dies kann photometrisch bei

## METHODEN

---

410 nm detektiert werden. Als Positivproben dienten für Esterase-Tests *Staphylococcus hyicus*-Lipase, für Phosphatase-Tests *Alkalische Phosphatase*. Als Negativkontrolle wurde das entsprechende Volumen des Puffers zugegeben, in dem das Protein gelagert wurde.

- Esterase-Test:

90 µl Reaktionslösung, bestehend aus Substratverdünnung in *Lipase-Testpuffer 1* oder *2*, wurden vorgelegt und zum Start der Reaktion 10 µl Proteinprobe (10-40 µg/ml) zugegeben. Alle Reaktionen wurden über 10-20 min in *Mikro-Platten* bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Phosphatase-Test:

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl p-Nitrophenyl-Phosphat zu folgendem Mix gestartet:

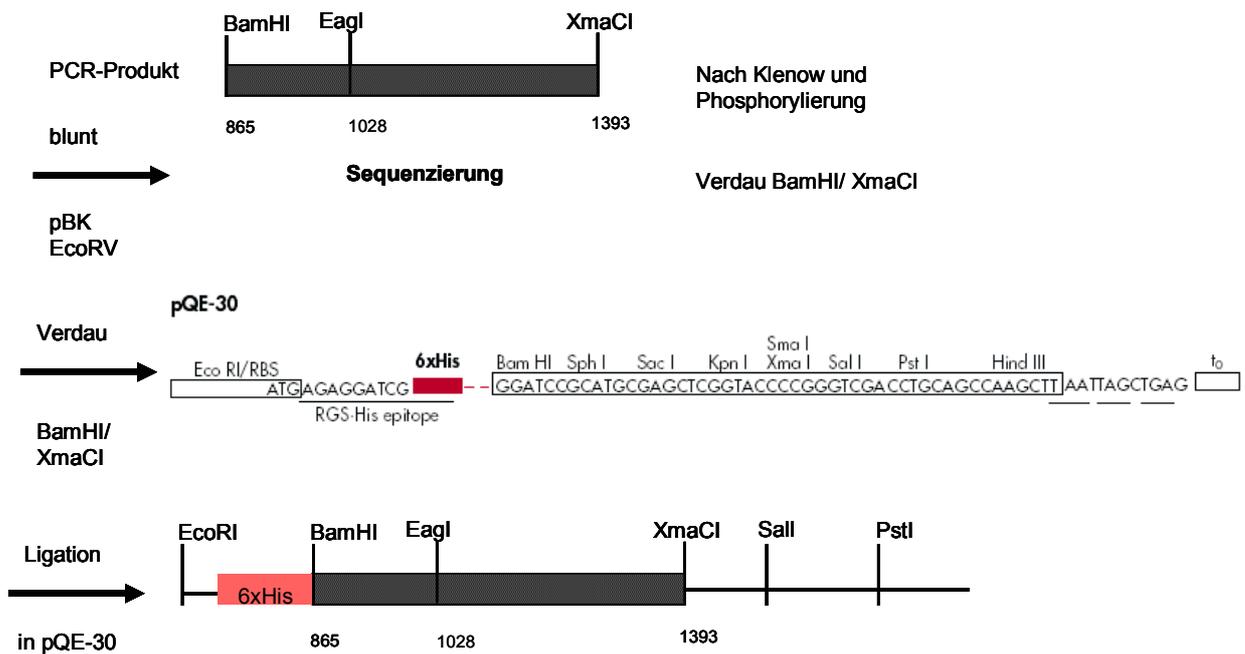
- 100 µl Pufferlösung 500 mM
- 10 µl Magnesiumacetat 100 mM
- 10 µl EGTA 10 mM
- Proteinprobe
- Wasser ad 950 µl

Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 100 µl  $K_2HPO_4$ -Lösung ( $\equiv$  13%). Eventuell gebildetes p-Nitrophenol wird so deprotoniert und kann detektiert werden. Tests galten als erfolgreich durchgeführt, wenn nach Ablauf der Reaktionszeit eine deutliche Farbänderung der Positivprobe bzw. keinerlei Farbänderung der Negativprobe feststellbar war.

### 3.11 Klonierungen

#### 3.11.1 Rv1900c<sub>291-462</sub> (Katalytische AC-Domäne)

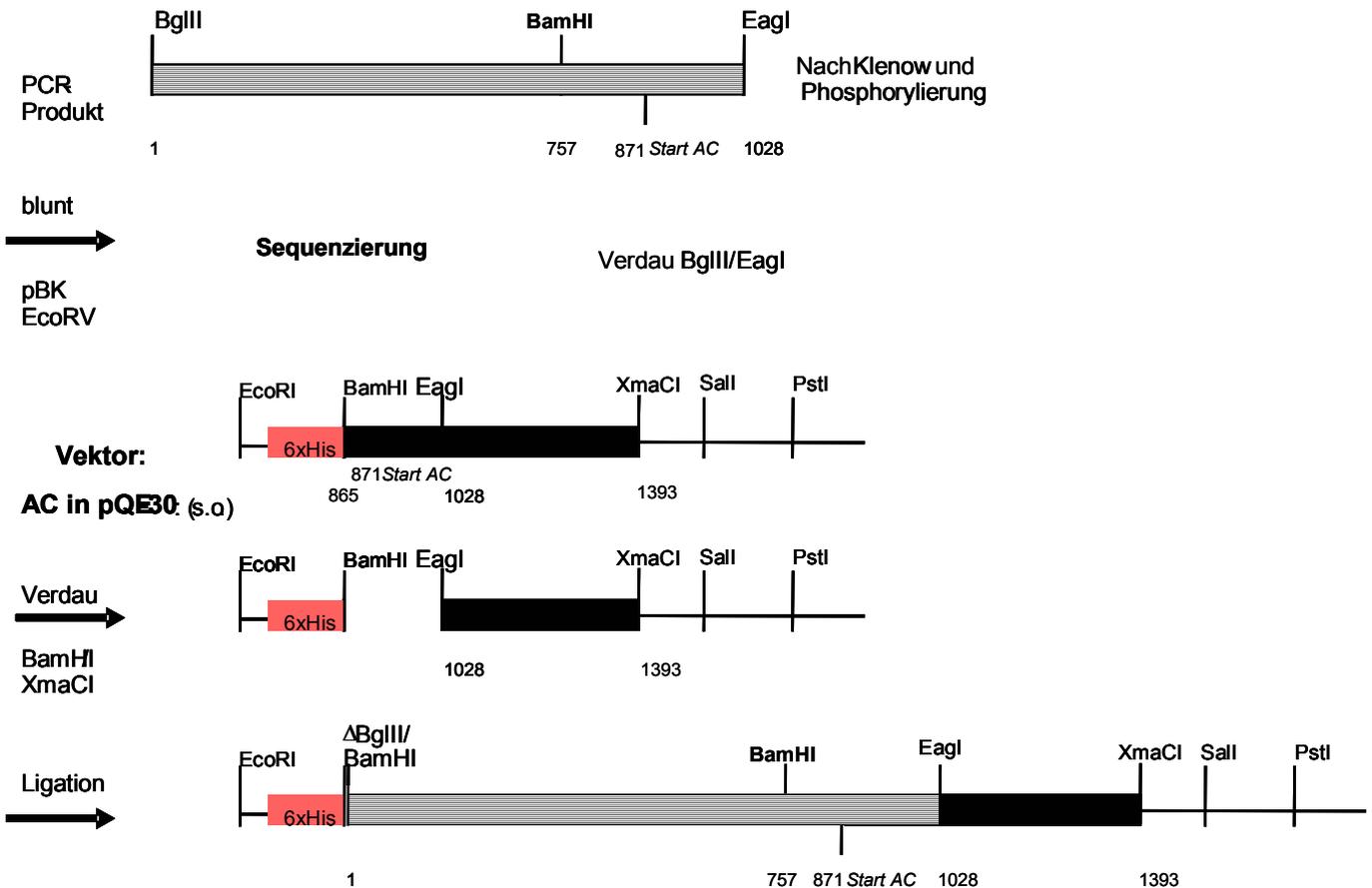
Verwendete Primer: - lipj2 s  
- lipj2 as



Das erhaltene PCR-Produkt (Primer lipj2 s und lipj2 as) wurde nach Glätten der Enden in den Klonierungsvektor *pBlueskript SK(-)* eingesetzt und sequenziert. Der Klonierungsvektor wurde zuvor mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* aufgeschnitten, die Enden ebenfalls geglättet. Nach Überprüfen der Sequenz wurde das DNA-Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* (N-terminal) und *XmaCI* (C-terminal, durch Primer eingeführt) wieder ausgeschnitten und in den mit denselben Restriktionsendonukleasen aufgeschnittenen Expressionsvektor *pQE30* ligiert. Das Startcodon ATG liegt auf dem Vektor, N-terminal wird vor der Sequenz für *lipj* ein Hexa-His-Tag codiert. Das Stopcodon liegt innerhalb der Sequenz für *lipj*<sub>291-462</sub>, direkt vor der *XmaCI*-Schnittstelle.

### 3.11.2 Rv1900c<sub>1-462</sub> in pQE30 (Holoenzym)

Verwendete Primer: - lipj1 s  
 - lipj1 as



Das erhaltene PCR-Produkt (Primer lipj1 s und lipj1 as) wurde nach Glätten der Enden in den Klonierungsvektor *pBlueskript SK(-)* eingesetzt und sequenziert. Der Klonierungsvektor wurde zuvor mit *EcoRV* aufgeschnitten, die Enden ebenfalls geglättet. Nach Überprüfen der Sequenz wurde das DNA-Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *BglIII* (N-terminal) und *EagI* (C-terminal, durch Primer eingeführt) wieder ausgeschnitten und in den Expressionsvektor ligiert. Als Expressionsvektor diente die katalytische AC-Domäne in *pQE30* (*lipj*<sub>291-462</sub>, s. 3.11.1). Da ein Teil der Sequenz sowohl im PCR-Produkt für *lipj*<sub>1-462</sub>, als auch im Expressionvektor codiert war, wurde dieses doppelt vorhandene Fragment zuerst aus dem Expressionsvektor ausgeschnitten. Dieses DNA-Stück von Base 871 bis 1028 wurde durch Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *EagI* entfernt. Anschliessend wurde das *BglIII*- und *EagI*-geschnittene PCR-Produkt in den Vektor kloniert, wobei die *BamHI*- und *BglIII*-geschnittene

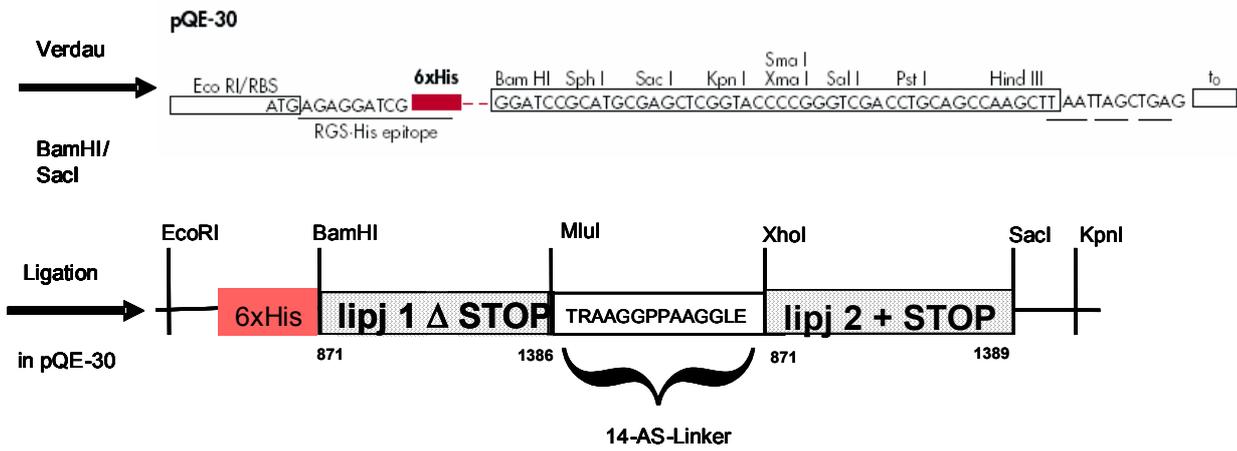
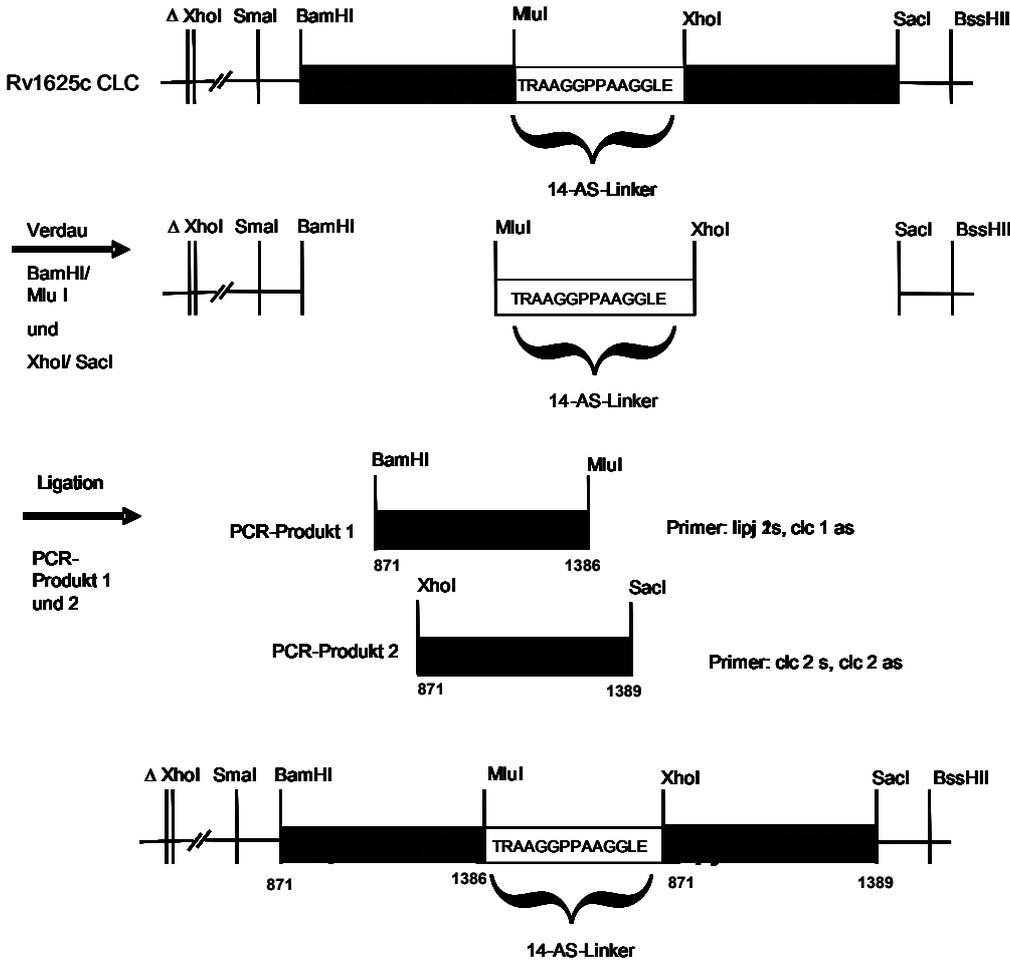
Enden zusammenligiert wurden (Ligation von *BamHI*- und *BglII*- geschnittenen Fragmenten ist möglich, die Schnittstelle wird dabei zerstört =  $\Delta$  *BglII* / *BamHI*).

Wie bei der katalytischen Domäne liegt das Startcodon auf dem Vektor *pQE30*, N-terminal wird vor der eigentlichen Proteinsequenz von *lipj*<sub>1-462</sub> ein Hexa-His-Tag zu Reinigungszwecken codiert. Das Stopcodon liegt innerhalb der Sequenz für *lipj*<sub>1-462</sub>, direkt vor der *XmaCI*-Schnittstelle.

### 3.11.3 Lipj CLC

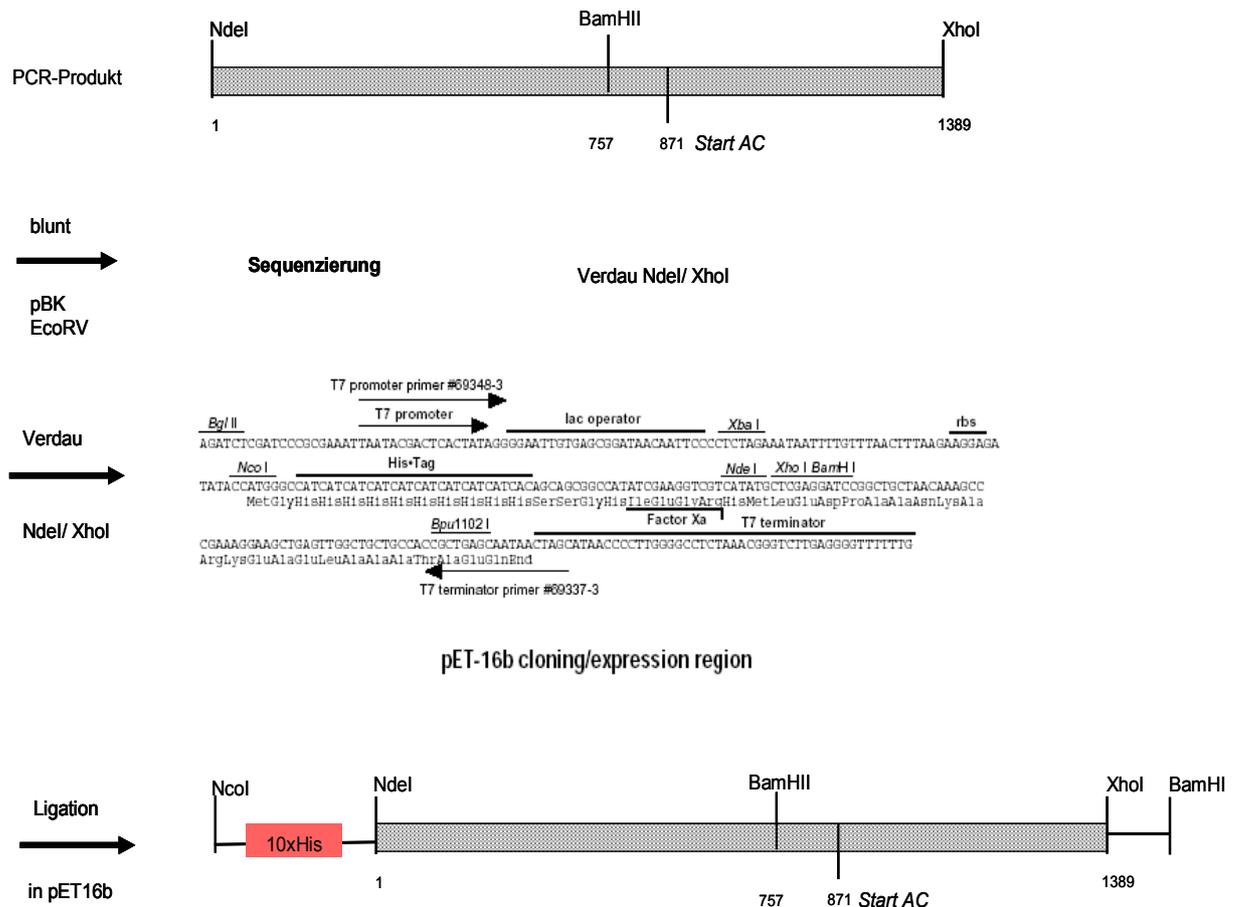
Der Ausgangsklon Rv1625c CLC (AC1-14AS-Linker-AC2 in pBluescriptSK(-) ohne *XhoI*-Schnittstelle) wurde von Dr. Yinglan Guo, Tübingen zur Verfügung gestellt. Aus einem *pBlueskript*-Vektor wurde die *XhoI*-Schnittstelle zu Klonierungszwecken entfernt. Anschliessend wurden Fragmente, die für die katalytische Domäne von Rv1625c kodieren und über einen Linker von 14 Aminosäuren verbunden sind, einkloniert. N-terminal wurde das erste Fragment (ohne Stoppcodon) über eine *BamHI*- und einer *MluI*-Schnittstelle einligiert. Zwischen der *MluI*- und einer *XhoI*-Schnittstelle ist die Sequenz für den Linker codiert, zwischen *XhoI* und *SacI* liegt die Sequenz für das zweite Fragment (mit Stoppcodon), das für eine weitere katalytische Domäne codiert. Dies wurde für Rv1900c nachempfunden indem durch entsprechendes Design der Primer zwei PCR-Produkte für die katalytische Domäne erhalten wurden. Das erste Fragment (Primer *lipj2* s und *clc1* as) kodiert für die katalytische Domäne von *Lipj* ohne Stoppcodon. N-terminal liegt eine *BamHI*-Schnittstelle, C-terminal eine *MluI*-Schnittstelle. Durch Verdauung des PCR-Produkts und des Vektors Rv1625c CLC mit diesen beiden Enzymen wurde die erste katalytische Domäne von Rv1625c entfernt, die entsprechende Sequenz für *lipj* eingesetzt. Auf dieselbe Weise wurde das zweite Fragment von Rv1625c nach dem Linker durch das PCR-Produkt für das zweite Fragment (mit Stoppcodon) von *lipj* ersetzt. In diese Sequenz wurde N-terminal eine *XhoI*-Schnittstelle, C-terminal eine *SacI*-Schnittstelle eingeführt (Primer *clc2* s und *clc2* as). Nach Sequenzierung konnte die gesamte Sequenz (AC-Linker-AC-Stoppcodon) mit den Enzymen *BamHI* und *SacI* ausgeschnitten werden und in einen gleichermassen geschnittenen Expressionsvektor eingesetzt werden. Als Expressionsvektor diente *pQE30*, das Startcodon liegt auf dem Vektor und es wird N-terminal ein Hexa-His-Tag codiert. Das Stoppcodon wurde durch entsprechendes Design des Primers *clc2* s direkt vor der *SacI*-Schnittstelle eingeführt.

# METHODEN



### 3.11.4 Holoenzym in *pET16b*

Verwendete Primer: - lipj1 pET s  
 - lipj1 pET as



Durch PCR mit den Primern lipj pET s und lipj pET as wurde ein DNA-Fragment erhalten, das für *Lipj1-462* codiert. N-terminal wurde eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt, C-terminal eine *XhoI*-Schnittstelle. Das erhaltene PCR-Produkt wurde nach Glätten der Enden in den Klonierungsvektor *pBlueskript SK(-)* eingesetzt und sequenziert. Der Klonierungsvektor wurde zuvor mit *EcoRV* aufgeschnitten, die Enden ebenfalls geglättet. Anschliessend wurde das Fragment durch Verdau mit den Enzymen *NdeI* und *XhoI* ausgeschnitten und in einen mit denselben Endonukleasen verdauten Expressionsvektor *pET16b* ligiert.

Da die verwendeten Schnittstellen im Vektor *pET16b* sehr dicht zusammenliegen, wurde zuerst 60 min mit *NdeI* verdaut, anschließend 60 min mit *XhoI*. Das Startcodon liegt auf dem Vektor, es wird ein Deca-His-tag zu Reinigungszwecken N-terminal codiert. Das Stoppcodon wurde durch den Primer lipj pET as direkt vor der *XhoI*-Schnittstelle eingeführt.

### 3.11.5 Konstrukte mit Punktmutationen

- Holoenzym *Lipj*<sub>1-462</sub>

Die Klonierung der Mutante HoloC15A wurde in gleicher Weise wie die Klonierung von *lipj*<sub>1-462</sub> (3.11.2) mit folgenden Primern durchgeführt: *lipj* holo C15A, *lipj*1 as.

- Katalytische AC-Domäne

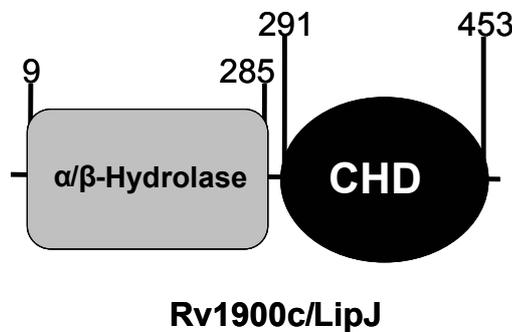
Alle Punktmutationen der katalytischen Domäne wurden nach demselben Prinzip durchgeführt: Ein Fragment aus dem Wildtyp-Klon (Rv1900<sub>C291-462</sub>) wurde mithilfe singularer Schnittstellen ausgeschnitten und durch ein PCR-Produkt ersetzt, das mit denselben Enzymen geschnitten wurde. Dieses unterschied sich vom herausgeschnittenen Stück lediglich durch die gewünschte Punktmutation, welche durch entsprechendes Design eines Primers eingeführt wurde. Nachfolgende Tabelle zeigt, welche Primer dazu eingesetzt wurden; der Austausch der jeweiligen Aminosäure ergibt sich aus der Bezeichnung der Konstrukte, die singulären Schnittstellen sind mit den Primersequenzen unter 2.3.2 angegeben.

<b>Konstrukt</b>	<b>sense-Primer</b>	<b>antisense-Primer</b>
<i>lipj</i> H402N	<i>lipj</i> H-N s	<i>lipj</i> 2s
<i>lipj</i> H402A	<i>lipj</i> H-A s	<i>lipj</i> 2s
<i>lipj</i> N342K	<i>lipj</i> 2s	<i>lipj</i> N-K as
<i>lipj</i> N342A	<i>lipj</i> 2s	<i>lipj</i> N-A as
<i>lipj</i> N342E	<i>lipj</i> 2s	<i>lipj</i> N-E as
<i>lipj</i> D395A	<i>lipj</i> D-A s	<i>lipj</i> 2as
<i>lipj</i> D302A	D302A s	<i>lipj</i> 1as
<i>lipj</i> D302E	D302Es	<i>lipj</i> 1as
<i>lipj</i> D346A	<i>lipj</i> D346A s	<i>lipj</i> 2as
<i>lipj</i> D346E	<i>lipj</i> D346E s	<i>lipj</i> 2as
<i>lipj</i> R406A	<i>lipj</i> R406A s	<i>lipj</i> 2as
<i>lipj</i> E340A	<i>lipj</i> 2s	<i>lipj</i> E-A as
<i>lipj</i> V341A	<i>lipj</i> 2s	<i>lipj</i> V-A as
<i>lipj</i> T343A	<i>lipj</i> 2s	<i>lipj</i> T-A as
<i>lipj</i> F348A	<i>lipj</i> F-A s	<i>lipj</i> 2as
<i>lipj</i> E386A	<i>lipj</i> 2s	<i>lipj</i> E386A as
<i>lipj</i> K442A	<i>lipj</i> K442A s	<i>lipj</i> 2as
<i>lipj</i> R377A	<i>lipj</i> 2s	<i>lipj</i> R377A as

Die Doppelmutante lipj N342A/D395A wurde über die singulären Schnittstellen *Kpn I* und *XmaCI* kloniert. Dazu wurde aus dem Klon lipj N342A das Fragment (ohne Mutation) zwischen bp 1180 und 1397 herausgeschnitten und durch das entsprechende Stück aus lipj D395A (mit Mutation D-A) ersetzt.

## 4 ERGEBNISSE

Das Gen *Rv1900c* aus *M. tuberculosis* wurde zu Beginn als *lipj* annotiert, eine mögliche Esterase (Cole et al., 1998). Dies basierte auf der Annahme, dass die Aminosäuren 9-285 am N-terminalen Ende eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase darstellen. Bei näherer Betrachtung konnte C-terminal eine Cyclase-Domäne (cyclase homology domain CHD) identifiziert werden (Aminosäuren 291- 453; McCue et al. 2000), so dass das Model einer kombinierten Hydrolase-/ Cyclase-Domäne nahe lag.



Dass Proteine mit einer solchen Struktur existieren, beispielsweise Verknüpfungen von möglichen Hydrolase- und Adenylatcyclase-Domänen, wird auch für Proteobakterien vorhergesagt. Betrachtet man *Bradyrhizobium japonicum* (GenBank NP\_774332), so findet sich eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Domäne, die zu 39% identisch und zu 52% ähnlich zu der von *Rv1900c* ist. Des Weiteren weist eine bereits biochemisch charakterisierte 3-Oxoacidat Enol-Lacton Hydrolase aus *Pseudomonas* (GenBank AAL02408) eine zu 25% identische und zu 39% ähnliche Sequenz zur Hydrolase-Domäne von *lipj* auf. Unter diesen Gesichtspunkten erscheint es schwierig, eine verlässliche Vorhersage über eine enzymatische Aktivität der N-terminalen Domäne von *Rv1900c* zu machen.

Die Adenylatcyclase-Domäne wurde als Klasse IIIc CHD klassifiziert (Linder und Schultz, 2003). Aus der Aminosäuresequenz kann man vorhersagen, dass *Lipj* als Homodimer katalytisch aktiv ist (Guo et al., 2001). Allerdings wird in der Literatur mehrfach beschrieben, dass für eine enzymatische Aktivität als Adenylatcyclase sechs kanonische Aminosäuren in bestimmter Reihenfolge zwingend nötig sind. In *Rv1900c* findet man jedoch anstelle des Adenin-bindenden Lysins ein Asparagin (N342), ein für die Katalyse essentielles Asparagin ist

durch Histidin ersetzt (H402). Die folgende Abbildung zeigt vergleichend die Sequenz der Cyclase-Domänen von Rv1900c und Rv1264, einer weiteren mycobakteriellen Adenylatcyclase. Im Gegensatz zu *Lipj* sind in Rv1264 alle sechs kanonischen Aminosäuren konserviert, bei *Lipj* sind dagegen nur vier konserviert (●), zwei weichen vom konservierten Schema ab (↓) (Linder und Schultz, 2003).

		●1		↓2	●3
Rv 1264	211	PGARQVTVAFA <b>D</b> LVGFTQLGEVVSAAELGHLAGRLAGLARDLTAPPV-WFI <b>K</b> TIG <b>D</b> AVMLVCPDP			
Rv 1900c	291	AERMLATIMFT <b>D</b> IVGSTQHAAALGDDRWRDLLDNHDTIVCHEIQRFGGRE <b>V</b> N <b>T</b> AG <b>D</b> GFVATFTSP			
			●4	↓5	●6
Rv 1264	291	DNNFRLRAGVASGMAVSRAG---- <b>D</b> WFGSP <b>V</b> N <b>V</b> AS <b>R</b> VTGVARPGAVLVADSVREALGDAPEAD			
Rv 1900c	370	AALGIEVRIGIHAGEVEVRDASHGT <b>D</b> VAGVAV <b>H</b> IGAR <b>R</b> V <b>C</b> ALAGPSEVLVSSTVRDIVAGS----			
Rv 1264	352	GFQWSFAGPRRLRGIRGDVRLFRVR			
Rv 1900c	431	RHRFAERGEQELKGVPGRWRLCVLM			

**Abbildung 4-1 Alignment der katalytischen Domänen der Klasse IIIc Adenylatcyclasen Rv1264 und Rv1900c.** ● : in beiden Sequenzen konservierte kanonische Aminosäuren, ↓ : abweichende kanonische Aminosäuren in Rv1900c; ●1/●3 : Bindung Cofaktor, ↓2/●4 : Purinspezifizierung, ↓5/●6 : Stabilisierung Übergangszustand.

Die nachfolgenden Untersuchungen sollten zeigen, welche Rolle die veränderten Aminosäuren bei der Katalyse spielen und ob *Lipj* überhaupt als Adenylatcyclase aktiv ist. Dazu wurde *Lipj* zuerst ohne die N-terminale Domäne als Lipj<sub>291-462</sub> (im Text auch als *AC* oder *katalytische Domäne* bezeichnet) exprimiert.

## 4.1 Biochemische Charakterisierung von Lipj<sub>291-462</sub>

### 4.1.1 Expression und Reinigung von Lipj<sub>291-462</sub>

Die katalytische Domäne von Lipj wurde in BL21(DE3)[pRep4]-Zellen exprimiert und als lösliches Protein über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätsreinigung gereinigt. Das errechnete Molekulargewicht des Proteins liegt bei 19 739 Da, der berechnete isoelektrische Punkt bei 6,4. Im SDS-PAGE sieht man eine Einzelbande bei 20 kDa (s. Abbildung 4-1). Die Ausbeute an gereinigtem Protein betrug (6 h Expressionszeit, 25°C) 2.5-3 mg pro 200 ml Expressionskultur.

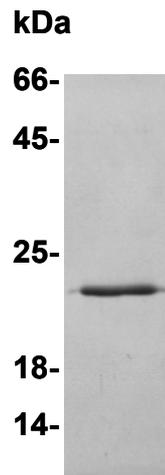


Abbildung 4-2: SDS-PAGE 15% der katalytischen Domäne (2 µg gereinigtes Protein); Durch zusätzliche Expression des His-Tags, codiert auf pQE30, Signal bei 22 kDa.

### 4.1.2 Cofaktorerfordernis

Alle bisher bekannten Adenylatcyclasen benötigen ein zweiwertiges Kation als Cofaktor, da der ATP-Me<sup>2+</sup>-Komplex das eigentliche Substrat darstellt. Bei *Lipj*<sub>291-462</sub> lag die optimale Konzentration im AC-Test mit 75µM ATP bei 2 mM Manganchlorid; da aber in weiteren Versuchen meist mit 500 µM ATP gearbeitet wurde, betrug die Konzentration an freiem Mn<sup>2+</sup> im AC-Test standardmäßig 3 mM Mn<sup>2+</sup>. Mit 10 mM Magnesiumsulfat und 2 mM Magnesiumchlorid als Cofaktor war keine AC-Aktivität messbar.

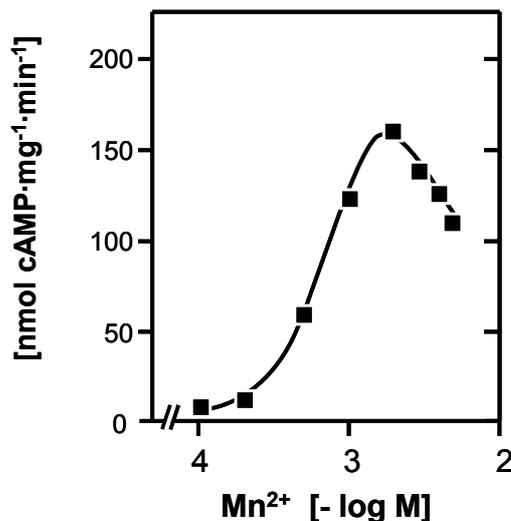


Abbildung 4-3: Manganabhängigkeit der katalytischen Domäne *Lipj*<sub>291-462</sub>; (75 µM ATP, MOPS/TRIS pH 6.4, 10 min, 37°C; 0.2 µg gereinigtes Protein, 0.1-5 mM Manganchlorid)

### 4.1.3 Temperaturabhängigkeit und Aktivierungsenergie

Die Aktivität von gereinigtem Protein wurde bei sechs verschiedenen Temperaturen ermittelt:

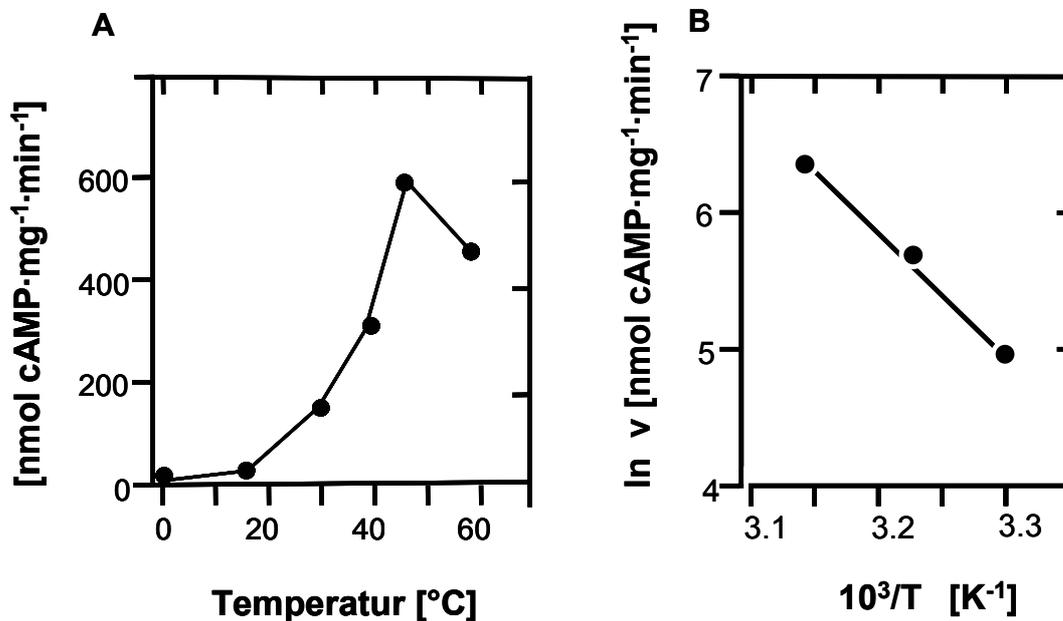


Abbildung 4-4: A: Temperaturabhängigkeit der katalytischen Domäne; (0.2  $\mu\text{g}$  gereinigtes Protein, 75  $\mu\text{M}$  ATP, TRIS/HCl pH 7.5, 10 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ ); B: Arrheniusplot

Der maximale Umsatz der katalytischen AC-Domäne lag bei 45 $^{\circ}\text{C}$ . Da Enzyme aus *M.tub.* aber oft menschlicher Körpertemperatur ausgesetzt sind und andere Adenylatcyclasen bei dieser Temperatur getestet wurden, lag die Test-Temperatur aus Gründen der Vergleichbarkeit bei allen weiteren Experimenten bei 37 $^{\circ}\text{C}$ . Um die Aktivierungsenergie  $E_a$  zu ermitteln, wurde mit den Messwerten von 30 $^{\circ}\text{C}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  und 45 $^{\circ}\text{C}$  (linearer Bereich) ein Arrheniusplot durchgeführt. Der  $E_a$ -Wert lag mit 73 kJ/Mol-K für die katalytische Domäne in dem für Adenylatcyclasen typischen Bereich (Tang und Hurley, 1998).

### 4.1.4 pH-Optimum

Der pH-Wert und die eingesetzte Puffersubstanz beeinflussen die Aktivität der katalytischen Domäne von Lipj<sub>291-462</sub> *in vitro* stark. Im pH-Bereich zwischen pH 5.5 (Tris/Acetat-Puffer) und pH 8.5 (TES/NaOH) werden so Unterschiede in der spezifischen Aktivität bis zu Faktor neun gemessen. Um eine Vergleichbarkeit zu den Mutanten des Wildtyps zu gewährleisten, deren Optimum (s. 4.3.2) bei pH 8.1 liegt, wurden die nachfolgenden Versuche, falls nicht ausdrücklich erwähnt, mit TES/NaOH-Puffer pH 8.1 durchgeführt.

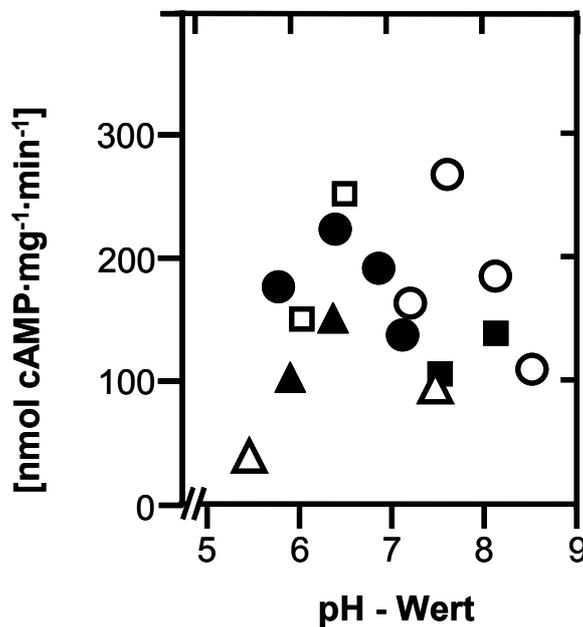


Abbildung 4-5: pH-Abhängigkeit der katalytischen Domäne  
 Bedingungen: 0.2 µg gereinigtes Protein, 75 µM ATP, 37°C, 10 min;  
 Puffersubstanzen: △ Tris/Acetat, (●) MOPS/Tris, (□) MES, (○) TES/NaOH,  
 (▲) MES/Tris, (■) Tris/HCl

### 4.1.5 Proteinabhängigkeit und Dimerisierung von Lipj<sub>291-453</sub>

Bei der katalytischen Domäne von Lipj<sub>291-453</sub> zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit zwischen im Test eingesetzter Proteinmenge und Aktivität: Im Bereich zwischen 30 und 700 nM Protein nahm die spezifische Aktivität um mehr als das dreifache zu; dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei Lipj tatsächlich um ein Homodimer handelt. Aus den Messwerten lässt sich die Dissoziationskonstante  $K_{Diss}$  berechnen: Der errechnete  $K_{Diss}$ -Wert von 100 nM Protein zeigt, dass die Dimerisierung von Lipj hoch affin verläuft.

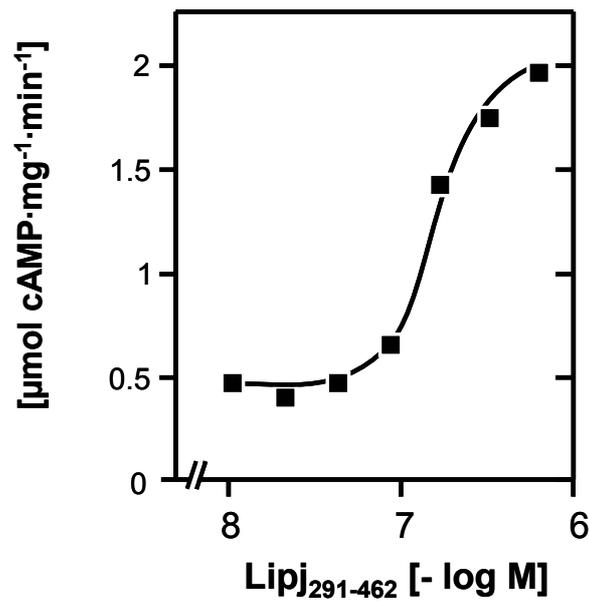


Abbildung 4-6: Proteinabhängigkeit Lipj<sub>291-462</sub> (10 min, 37°C; 10 - 600 nM gereinigtes Protein bzw. 0.02 - 1.2  $\mu\text{g}$  Protein)

Auch nach SDS-PAGE und anschließendem Westernblot (Antikörperherstellung und -spezifität s. 4.6.14) kann bei 45 kDa eine Bande des *Lipj*-Dimers detektiert werden. Dies untermauert die Annahme, dass *Lipj* als Dimer enzymatisch aktiv ist.

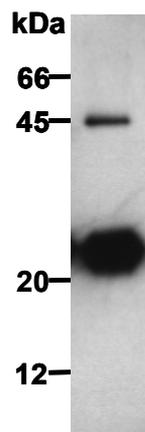


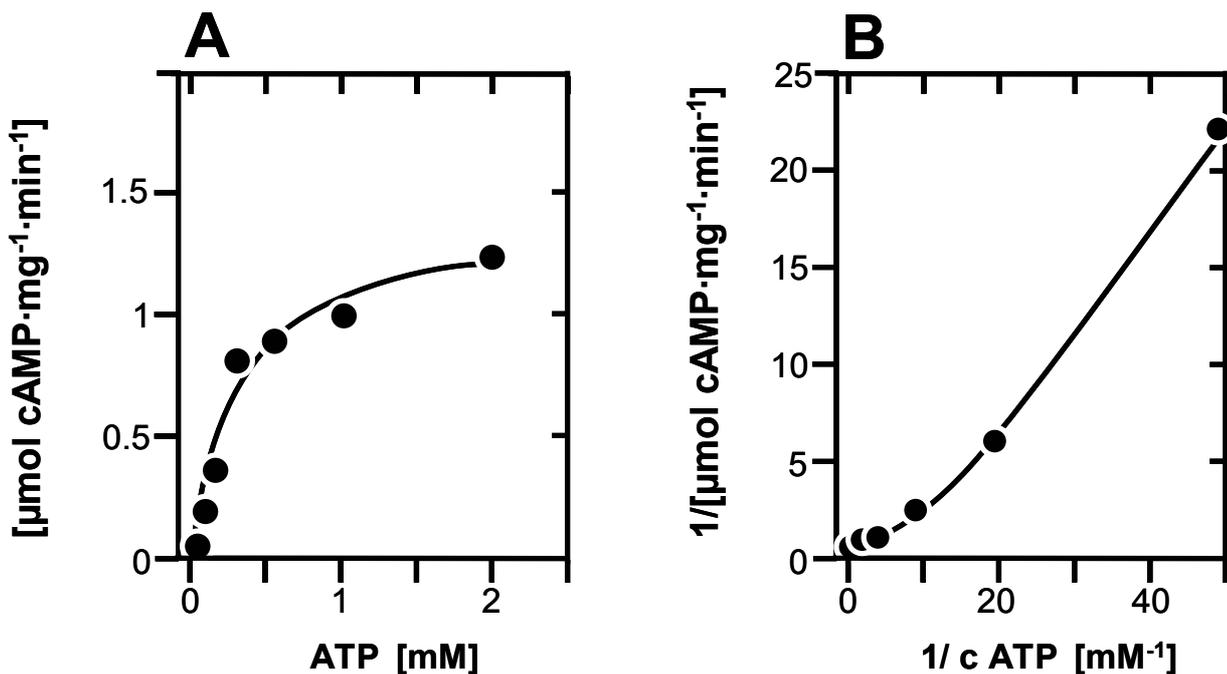
Abbildung 4-7: Westernblot mit spezifischem AntiLipj-Antikörper (0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) nach SDS-PAGE 15% mit Zellhomogenat aus Expressionszellen; 0.25 ml Expressionszellen wurden bei  $\text{OD}_{600} = 0.5$  abzentrifugiert, in 20  $\mu\text{l}$  4xProbenpuffer resuspendiert und aufgetragen. Expositionszeit 60 sec.

**4.1.6 Substratspezifität**

Alle bisher untersuchten Klasse III Adenylatcyclasen besitzen eine stringente Spezifität für ATP. Ungewöhnlicherweise wurde bei *Lipj*<sub>291-462</sub> mittels Guanylatcyclase-Test eine GC-Seitenaktivität festgestellt: Im Test mit 10 µg gereinigtem Protein können bis zu 150 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> cGMP gemessen werden. Setzt man im AC- und GC-Test vergleichbare Proteinmengen von 0,5-1 µg ein, liegt die gemessene GC-Seitenaktivität von 100 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> cGMP bei 7 % der AC-Aktivität. Alle GC-Tests wurden mit 500 µM GTP und TES/NaOH-Puffer pH 8.1 bei 37°C über 10 min durchgeführt.

**4.1.7 Kinetische Messungen**

Die katalytische Domäne zeigt mit einem Hill-Koeffizienten von 1.2 ein leicht kooperatives Verhalten, was erneut die Annahme zweier katalytischer Zentren bestätigt. Eine Auswertung nach Lineweaver-Burk war daher nicht möglich, die maximale Aktivität  $V_{max}$  wurde somit über einen Hill-Plot ermittelt. Dazu wurde die Hillfunktion an die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeits- /Substratkonzentrations-Diagramme gefittet und ein  $V_{max}$ -Wert von 1.3 µmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> cAMP erhalten (Figur C). Die daraus berechnete Wechselzahl für die katalytische Domäne von *Lipj* liegt bei 0.4 sec<sup>-1</sup>. Die halbmaximale Sättigung lag bei [ATP] = 300 µM, eine für Adenylatcyclasen vergleichsweise typische Substrataffinität (Guo et al., 2001, Kanacher et al., 2002; Tang und Hurley, 1998).



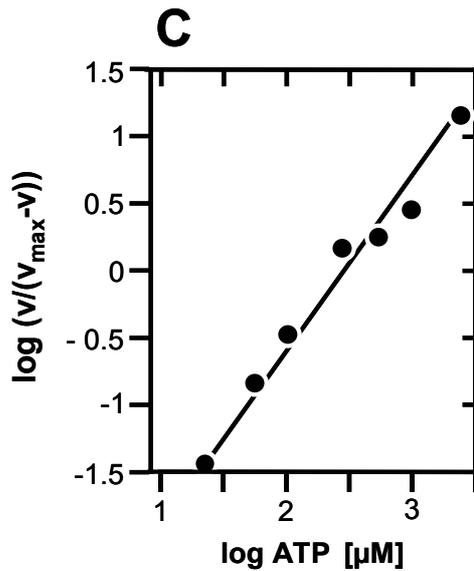


Abbildung 4-8: Substratabhängigkeit *Lipj*<sub>291-462</sub> (10 min, 37°C, 0.02 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.2004x - 2.9275$ ;  $R^2 = 0.966$

#### 4.1.8 Einfluss von 2'd,3'AMP

P-site-Inhibitoren wie 2'd,3'AMP sind Adenin- oder Adenosinanaloga und können daher in die katalytische Tasche von Adenylatcyclasen binden. Dort werden sie nicht umgesetzt, sondern blockieren kompetitiv die Abgangsstelle des Katalyseproduktes cAMP und wirken somit hemmend (Dessauer u. Gilman, 1997; Hurley, 1999; Tesmer et al., 2000).

Bei Zusatz dieses Inhibitors (1 mM) im AC-Test wurde die spezifische Aktivität von 1.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  auf ein Drittel der Wildtypaktivität ( $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) reduziert.

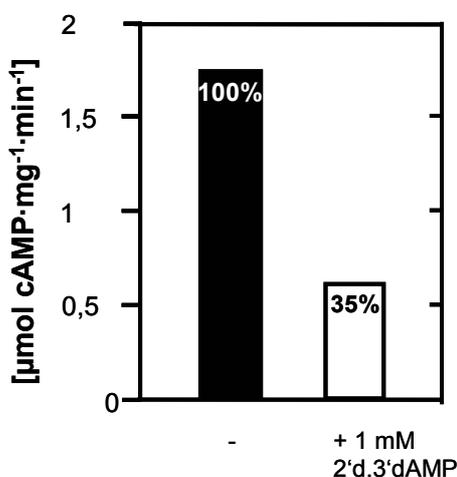


Abbildung 4-9: Hemmung von *Lipj*<sub>291-462</sub> durch 1 mM 2'd,3'AMP (10 min, 37°C, 0.5  $\mu\text{g}$  Protein, 0.5 mM ATP; 100% =  $1.8 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )

### 4.1.9 Einfluss von Substratanaloga

Des weiteren wurden im AC-Test zwei ATP-ähnliche Inhibitoren zugesetzt: Bei Zusatz von  $\alpha,\beta$ -CH<sub>2</sub>-ADP ging die spezifische Aktivität drastisch zurück; statt 875 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> wurden nur noch 15 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> gemessen (< 2%). Der zweite Inhibitor, ATP $\alpha$ S- R<sub>p</sub> [Adenosin 5'( $\alpha$ -thio)-Triphosphat], führte zu einer geringeren Hemmung: Es wurden noch knapp 70% der Wildtypaktivität erreicht (550 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>). Die Substratanaloga (maximal 10  $\mu$ l Volumen) wurden aus Stammlösungen in die vorgelegten Proteinlösungen pipettiert, der Test wurde bei 37°C/ 0.5 mM ATP/ 10 min Reaktionszeit durchgeführt.

## 4.2 Charakterisierung der Mutanten von *Lipj*<sub>291-462</sub>

### 4.2.1 Expression und Reinigung

Alle Mutanten von *Lipj*<sub>291-462</sub> waren unter gleichen Bedingungen wie beim Wildtyp gut exprimierbar. Die löslichen Proteine waren nach Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätsreinigung sauber.

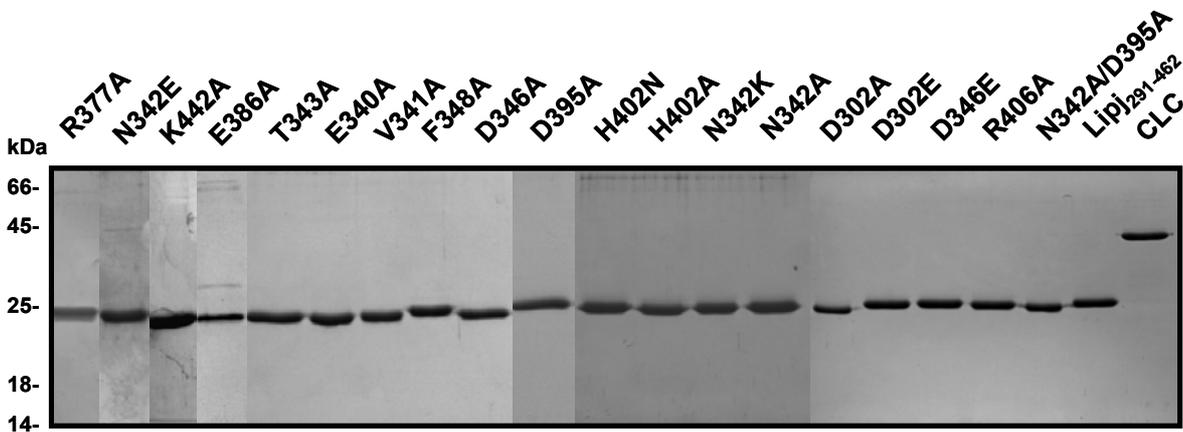


Abbildung 4-10: SDS-PAGE 15% Wildtyp und Mutanten (je 2  $\mu$ g gereinigtes Protein)

### 4.3 Mutationsanalyse der kanonischen Aminosäuren

In der Literatur wird beschrieben, dass für eine Katalyse als AC sechs kanonische Aminosäuren in bestimmter Reihenfolge nötig sind (Tesmer et al., 1997, 1999; Zhang et al., 1997). In *Lipj* lassen sich im Sequenzvergleich nur an 4 Stellen Übereinstimmungen mit diesem Modell finden: An den Aminosäurepositionen 302 und 346 findet sich erwartungsgemäß je ein Aspartatrest (Bindung des Cofaktors). Weiter wird beschrieben, dass zur Bindung des Substrates die Aminosäuren Lysin und Aspartat benötigt werden (Tesmer et al., 1997; Sunahara et al., 1998): In *Lipj* ist an Position 395 zwar ein Aspartat zu finden, statt Lysin findet sich hier allerdings ein Asparagin. Ebenfalls untypisch: Ein Asparagin zur Stabilisierung des Übergangszustandes (Yan et al., 1997; Hurley, 1998) ist durch ein Histidin ersetzt (Position 402), Arginin 406 passt dagegen wieder ins Modell. Im Folgenden wurde die Rolle dieser Aminosäuren durch Herstellung von Punktmutanten untersucht.

#### 4.3.1 *Lipj* N342 / H402: Die veränderten Aminosäuren

Folgende Punktmutanten von *Lipj*<sub>291-462</sub> wurden kloniert und in *E. coli* exprimiert: *Lipj* N342A und H402A; ebenfalls die entsprechenden Mutationen zurück zu den kanonischen Aminosäuren *Lipj* N342K und H402N. Alle vier Mutanten waren AC-aktiv (s. Tabelle 4-1).

Enzym	<i>Lipj</i> <sub>291-462</sub>	<i>Lipj</i> N342A	<i>Lipj</i> N342K	<i>Lipj</i> H402A	<i>Lipj</i> H402N
[nmol·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	<b>1300</b>	<b>700</b>	<b>900</b>	<b>900</b>	<b>1200</b>

**Tabelle 4-1:** **V<sub>max</sub>-Werte aus kinetischer Messung (0.2 µg Protein im Test, TES/NaOH-Puffer pH 8.1)**

#### 4.3.2 pH-Optimum

Bei allen vier Mutanten liegt der optimale pH-Wert in vitro bei ungefähr pH 8.1, der Einfluss der eingesetzten Puffersubstanzen ist weniger stark als beim Wildtyp (s. Abbildung 4-11). Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden alle folgenden AC-Tests bei pH 8.1 TES/NaOH-Puffer durchgeführt.

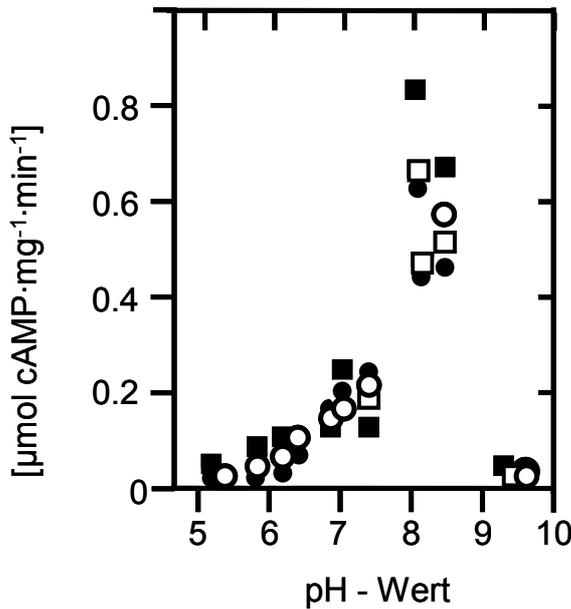


Abbildung 4-11: pH-Abhängigkeit der Mutanten (●) N342A, (○) N342K, (■) H402A, (□) H402N; Bedingungen: 0.2 µg gereinigtes Protein, 0.5 M ATP, 37°C, 10 min; Puffersubstanzen: pH 5.35-6.35: MES/Tris, pH 6.4-6.9: MOPS/Tris, pH 7.45: Tris/Acetat, pH 7.5-8.1: Tris/HCl, pH 8.1-8.5: TES/NaOH, pH 9.3-9.7: NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

### 4.3.3 Proteinabhängigkeit

Alle vier Mutanten wurden darauf untersucht, ob sich im Vergleich zum Wildtyp eine Änderung des Dimerisierungsverhalten zeigt. Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied, alle Proteine zeigen ein ähnliches Dimerisierungsverhalten (Abbildung 4-12). Die errechneten Dissoziationskonstanten liegen im gleichen Bereich wie der Wildtyp.

Enzym	<i>Lipj</i> <sub>291-462</sub>	<i>Lipj</i> N342A	<i>Lipj</i> N342K	<i>Lipj</i> H402A	<i>Lipj</i> H402N
K <sub>diss</sub> [nM]	<b>100</b>	<b>80</b>	<b>130</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

Tabelle 4-2: Dissoziationskonstanten im Vergleich

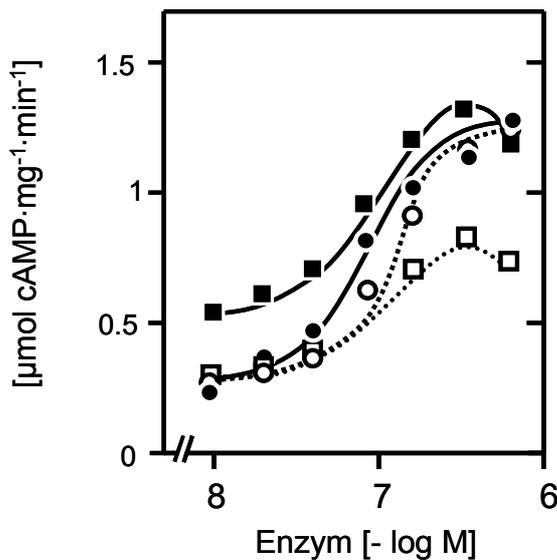


Abbildung 4-12: Proteinabhängigkeit der Mutanten *Lipj*<sub>291-462</sub> (●) N342A, (○) N342K, (■) H402A, (□) H402N (10 min, 37°C, 0.5 M ATP; 0.02-1.9 µg bzw. 10-960 nM gereinigtes Protein)

### 4.3.4 Substratspezifität

Mittels GC-Test wurden die Punktmutanten wie der Wildtyp auf GC-Seitenaktivität untersucht. Hier zeigten sich Unterschiede zwischen den Mutanten, bei denen zu den kanonischen Aminosäuren zurückmutiert wurde und den Alanin-Mutanten: Während *Lipj* N342A mit 8% relativer GC-Seitenaktivität und H402A mit 5% Seitenaktivität im selben Bereich wie der Wildtyp (7%) liegen, zeigt sich bei N342K mit nur 1% und H402N (2%) eine deutliche Reduktion der relativen GC-Seitenaktivität (Tabelle 4-3).

Enzym	V <sub>AC</sub> [nmol cAMP·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	V <sub>GC</sub> [nmol cGMP·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	% relative GC-Seitenaktivität
<i>Lipj</i> <sub>291-462</sub>	1500	100	7
N342A	900	70	8
N342K	1200	13	1
H402A	900	47	5
H402N	800	17	2

Tabelle 4-3: GC-Seitenaktivitäten der Mutanten *Lipj*<sub>291-462</sub> N342A, N342K, H402A und H402N im Vergleich (0.5 - 1 µg gereinigte Proteine im Test, 10 min, 37°C, 0.5 M NTP)

### 4.3.5 Kinetische Messungen

Ebenso wie bei *Lipj*<sub>291-462</sub> wurden für die Mutanten die kinetischen Parameter für die  $v_{max}$ ,  $SC_{50}$  und Hill-Koeffizient ermittelt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde 0.2  $\mu$ g gereinigtes Protein eingesetzt, die Konzentration an freiem Mangan betrug 3 mM.

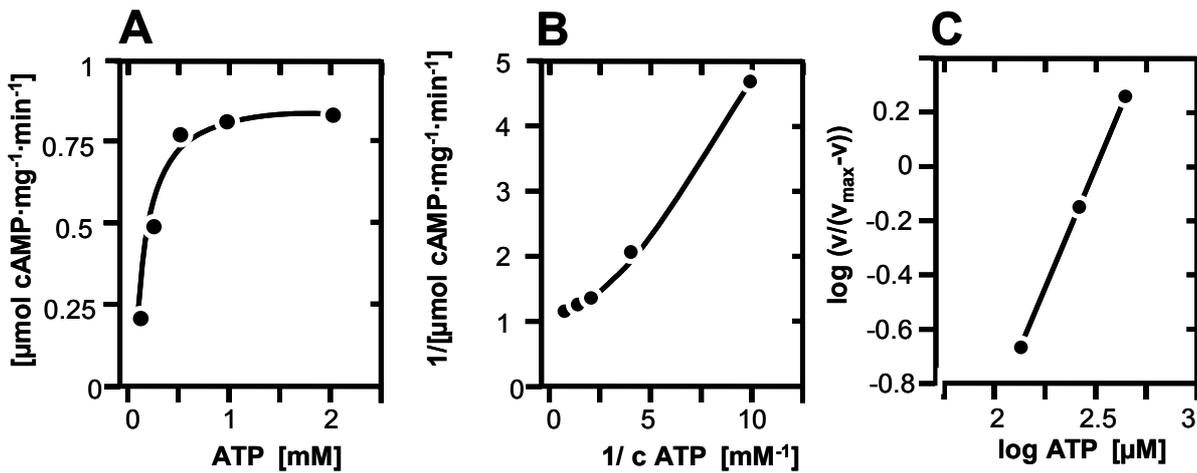


Abbildung 4-13: Substratabhängigkeit *Lipj* H402N (10 min, 37°C, 0.1 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.3453x - 3.3666$ ;  $R^2 = 0.999$  (linearer Bereich)

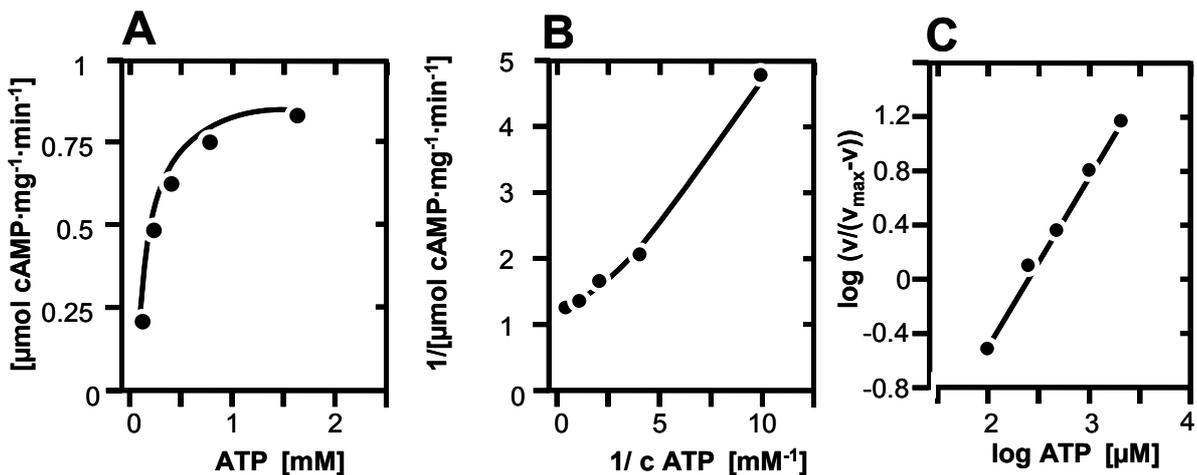


Abbildung 4-14: Substratabhängigkeit *Lipj* H402A (10 min, 37°C, 0.1 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.2642x - 2.9591$ ;  $R^2 = 0.994$

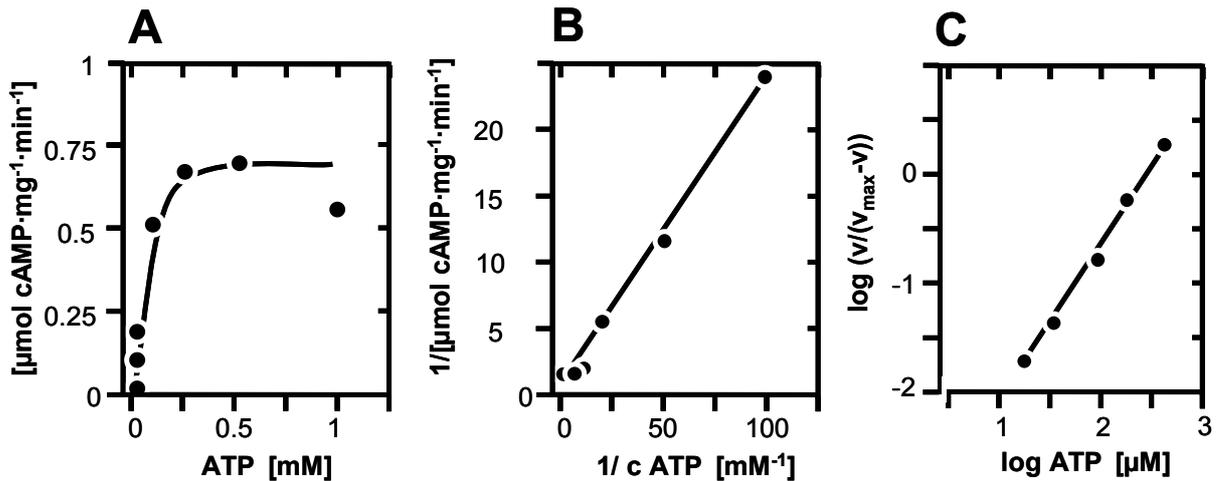


Abbildung 4-15: Substratabhängigkeit *Lipj* N342K (10 min, 37°C, 0.01 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.4686x - 3.2253$ ;  $R^2 = 0.997$  (linearer Bereich)

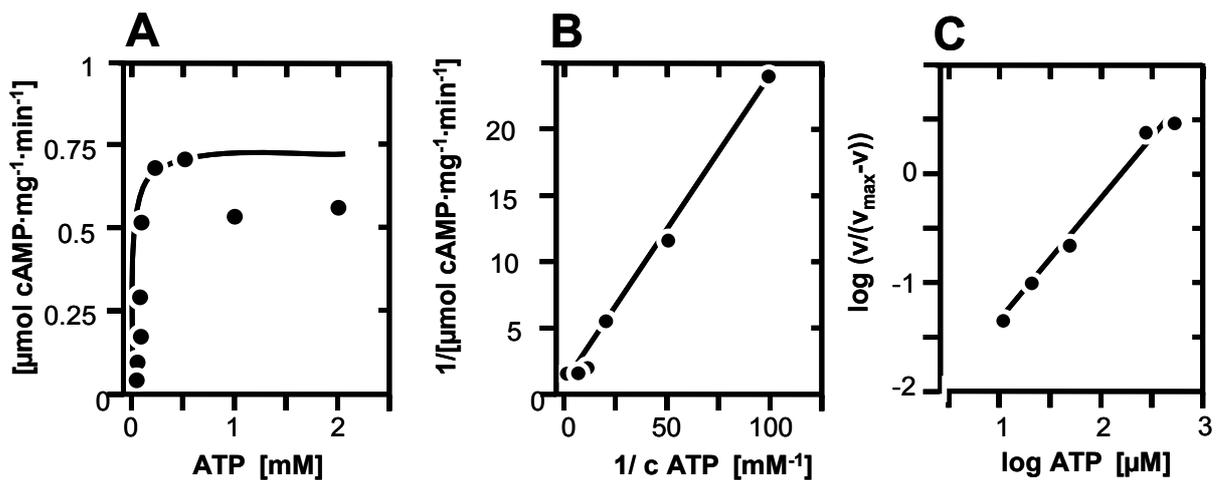


Abbildung 4-16: Substratabhängigkeit *Lipj* N342A (10 min, 37°C, 0.01 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.1264x - 2.4898$ ;  $R^2 = 0.983$  (linearer Bereich)

Eine Auswertung nach Lineweaver-Burk war nicht möglich, die maximale Aktivität  $V_{\text{max}}$  wurde somit wie beim Wildtyp über einen Hill-Plot ermittelt. Überraschenderweise fand sich weder eine starke Reduktion der Aktivität bei den Alanin-Mutanten, noch eine signifikante Erhöhung bei den Austauschen zu den kanonischen Aminosäuren- außer einer leichten Reduktion von  $V_{\text{max}}$  bei N342A konnte kein bedeutender Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden (s. Tabelle 4-4).

## ERGEBNISSE

Enzym	$v_{\max}$ [nmol cAMP·mg·min]	SC <sub>50</sub> [μM]	Hill-Koeffizient
Lipj <sub>291-462</sub>	1300	300	1.2
N342A	700	300	1.1
N342K	900	420	1.4
H402A	900	240	1.3
H402N	1200	400	1.3

**Tabelle 4-4:** Kinetische Parameter der Mutanten *Lipj*<sub>291-462</sub> N342A, N342K, H402A und H402N im Vergleich zum Wildtyp (Berechnung aus Hill-Plots).

Die katalytischen Zentren von Adenylatcyclasen und Guanylatcyclasen sind in Primärstruktur und Aufbau eng verwandt. Für Adenylatcyclasen wurde gezeigt, dass ein Lysin-/Aspartat-Paar (K/D) für die Erkennung des Substrats ATP verantwortlich ist, das entsprechende Aminosäure-Tandem in Guanylatcyclasen zur Erkennung von GTP sind die Aminosäurereste Glutamat und Cystein (E/C). Durch Austausch dieser Aminosäuren konnten die Spezifitäten für Substrat und Inhibitoren zwischen Adenylat- und Guanylatcyclasen ausgetauscht werden (Sunahara et al., 1998). Durch eine Doppelmutation in diesen beiden Positionen (E925K/C995D) war es möglich, eine membrangebundene Guanulatcyclase (humane RetGC-1) in eine Adenylatcyclase umzuwandeln (Tucker et al., 1998). Da in *Lipj*<sub>291-462</sub> weder die Punktmutationen an Position N342 zum kanonischen Lysin (N342K) noch zu Alanin (N342A) eine Beeinträchtigung der Adenylatcyclase-Aktivität verursachten, die GC-Seitenaktivität von N342K dagegen im Vergleich zum Wildtyp von 7% auf 1% reduziert ist, wurde eine weitere Punktmutante kloniert und exprimiert, N342E. Die spezifische AC-Aktivität von N342E entspricht nur noch 40% der AC-Aktivität des Wildtyps, die anderen kinetischen Parameter (Abbildung 4-17) sowie die Proteinabhängigkeit (Abbildung 4-18) sind kaum verändert (Tabelle 4-5).

Enzym	$v_{\max}$ [nmol cAMP·mg·min]	SC <sub>50</sub> [μM]	Hill-Koeffizient	K <sub>diss</sub> [nM]
Lipj <sub>291-462</sub>	1300	300	1.2	100
N342E	500	200	1.3	110

**Tabelle 4-5:** Kinetische Parameter der Mutanten *Lipj*<sub>291-462</sub> Wildtyp und N342E im Vergleich.

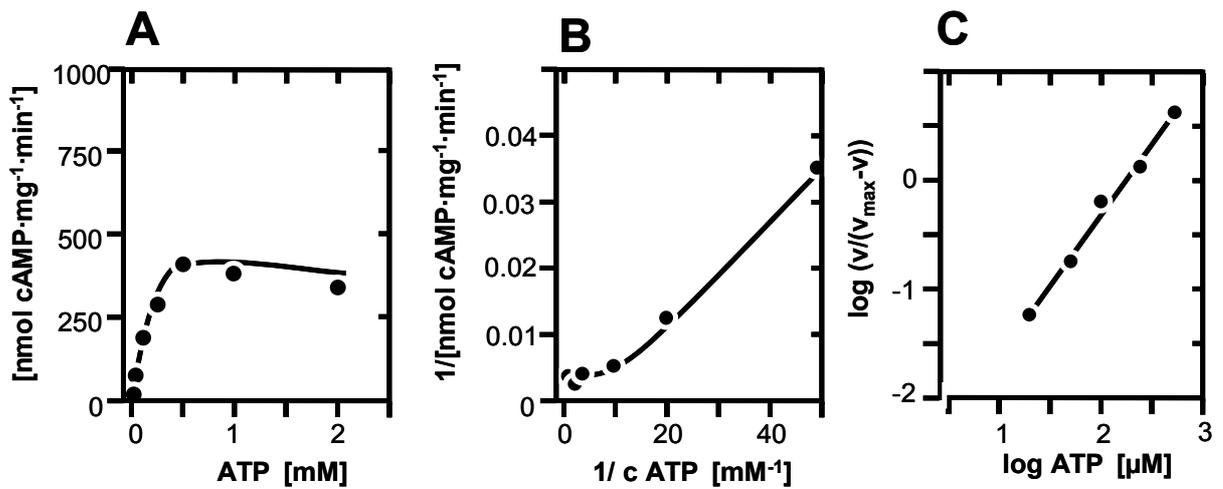


Abbildung 4-17: Substratabhängigkeit *Lipj* N342E (10 min, 37°C, 0.01 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.291x - 2.891$ ;  $R^2 = 0.992$  (linearer Bereich)

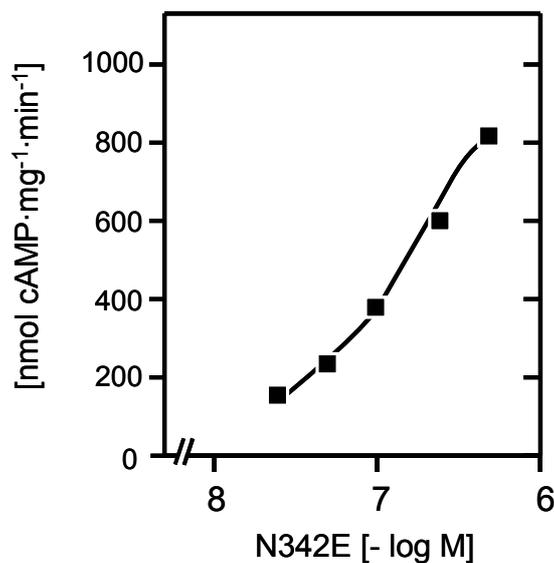
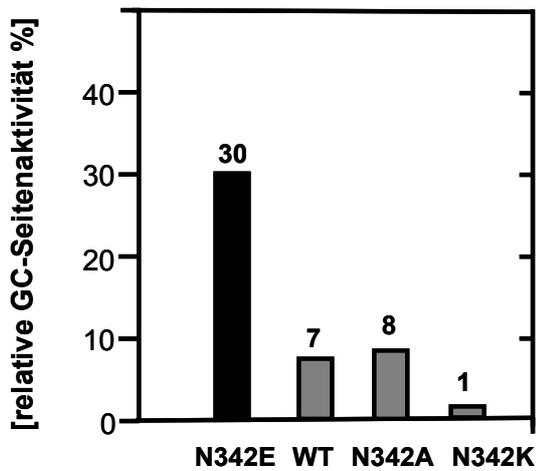


Abbildung 4-18: Proteinabhängigkeit *Lipj* N342E (10 min, 37°C, 0.5 M ATP; 25-500 nM bzw. 0.05-1 μg Protein)

Die relative GC-Seitenaktivität dagegen ist mit 30% (240 nmol cGMP·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht (Abbildung 4-19). Eine Mutation zum in Adenylatcyclasen kanonischen Lysin (N342K) verringert offensichtlich die Spezifität für das Substrat GTP, während ein Austausch zum in Guanylatcyclasen konservierten Glutamat (N342E) eine erhöhte Spezifität für GTP verursacht.



[nmol cGMP\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>]      240    100    60    10

Abbildung 4-19: Vergleich der relativen GC-Seitenaktivitäten *Lipj* N342E, Wildtyp (WT), N342A und N342K (10 min, 37°C, 0.5 mM GTP, 0.5-1 µg gereinigte Proteine): Mutation zum AC-kanonischen Lysin (N342K) verursacht eine Reduktion in der GC-Seitenaktivität, Mutation zum GC-kanonischen Glutamat (N342E) führt zu einer erhöhten GC-Seitenaktivität.

#### 4.3.6 *Lipj* D395 / R406 / D302 / D346: Die kanonischen Aminosäuren

Um die Rolle dieser vier kanonischen Aminosäuren in *Lipj* zu untersuchen, wurden weitere Punktmutanten kloniert und in *E. coli* exprimiert:

- 1) Aspartat395, laut Modell die zweite Aminosäure zur Substratspezifizierung neben N342: Punktmutante **D395A** und Doppelmutante **N342A/D395A**
- 2) Arginin406, im Ensemble mit Histidin402 zur Stabilisierung des Übergangszustandes: Punktmutante **R406A**
- 3) D302 und D346, laut Modellvorhersage beteiligt an der Koordination des metallischen Cofaktors: Punktmutanten **D302A** und **D346A**.

1) Die Mutation von Aspartat395 zu Alanin verursachte überraschenderweise keine Verringerung der spezifischen AC-Aktivität. Ebenso wie bei *Lipj*<sub>291-462</sub> wurden für *Lipj*<sub>291-462</sub> D395A die kinetischen Parameter über den Hill-Plot ermittelt (Abbildung 4-20). Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde 0.2 µg gereinigtes Protein eingesetzt, die Konzentration an freiem Mangan betrug bei allen weiteren kinetischen Messungen 3 mM.

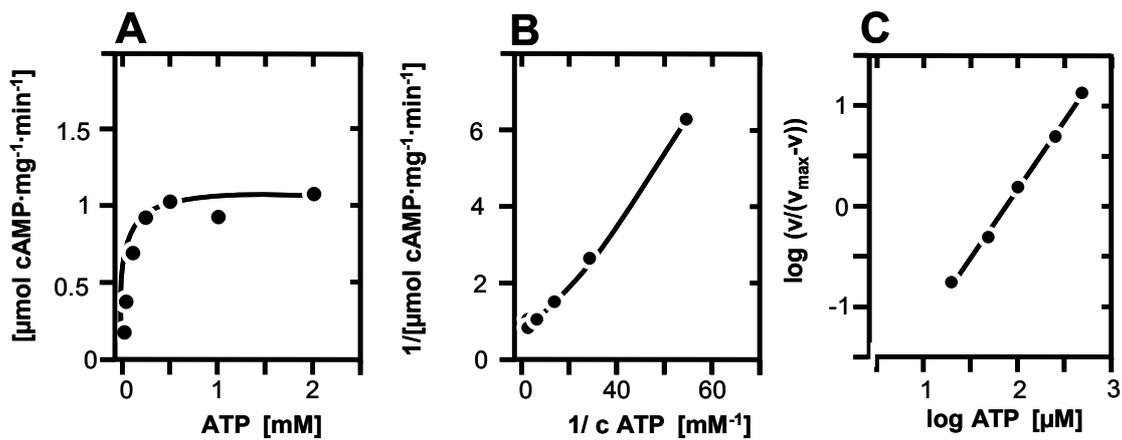


Abbildung 4-20: Substratabhängigkeit *Lipj* D395A (10 min, 37°C, 0.02 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.3458x - 2.5431$ ;  $R^2 = 0.997$  (linearer Bereich)

Aus der Hill-Funktion wurde ein  $V_{\text{max}}$ -Wert von  $1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  cAMP erhalten, die Substratspezifität ist mit  $SC_{50}=80 \mu\text{M}$  signifikant höher als beim Wildtyp, der Hill-Koeffizient beträgt 1.3 (alle Parameter im Vergleich zum Wildtyp s. Tabelle 4-6).

Sogar die Doppelmutante N342A/D395A zeigt keine starken Abweichungen in den kinetischen Parametern (Abbildung 4-21).

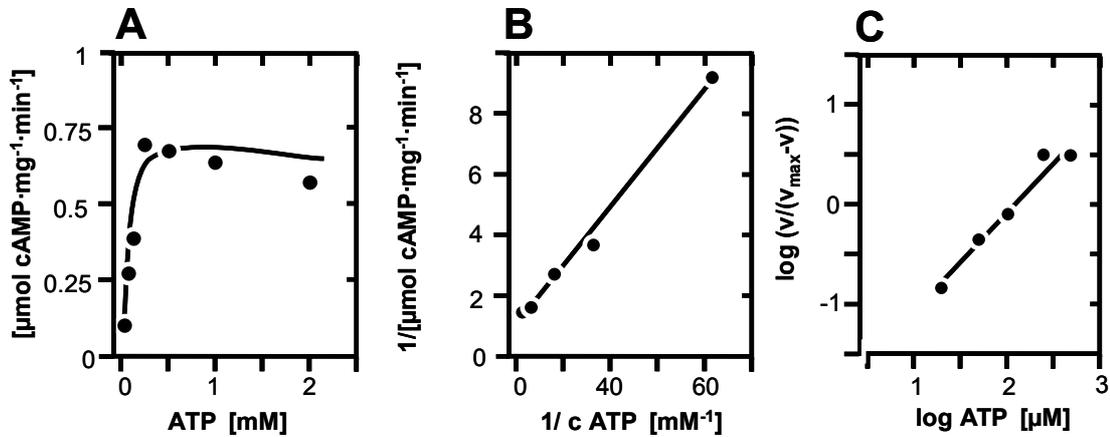


Abbildung 4-21: Substratabhängigkeit Lipj N342A/D395A (10 min, 37°C, 0.02 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.0236x - 2.1386$ ;  $R^2 = 0.952$  (linearer Bereich)

$V_{max}$  beträgt  $1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  cAMP, der Hill-Koeffizient von 1.0 zeigt allerdings, dass keine Kooperativität des Enzyms mehr vorliegt. Daher kann für Lipj N342A/D395A ein echter  $K_M$ -Wert von  $130 \mu\text{M}$  berechnet werden.

Die Dimerisierung beider Proteine verläuft hoch affin, so dass ab 10 nM Protein aufwärts die spezifische Aktivität konstant erscheint (Abbildung 4-22)- ein krasser Widerspruch zum klassischen Modell für Klasse III-Adenylatcyclasen.

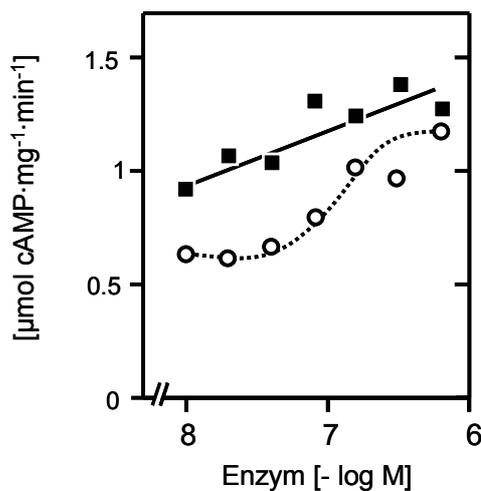


Abbildung 4-22: Proteinabhängigkeit Lipj (○) N342A/D395A und (■) D395A (10 min, 37°C, 0.5 M ATP; 10-960 nM bzw. 0.02-1.92  $\mu\text{g}$  Enzym): beide Proteine sind hochdimerisiert.

2) Im Gegensatz zu den His402-Mutanten hat eine Mutation der zweiten Aminosäure zur Stabilisierung des Übergangszustandes (R406) starke Auswirkungen auf die spezifische Aktivität:  $V_{\max}$  der Mutante R406A ist stark reduziert auf  $110 \text{ nmol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , das entspricht 8% der Wildtypaktivität (Abbildung 4-23). Die halbmaximale Sättigung lag bei  $[\text{ATP}] = 300 \text{ }\mu\text{M}$ , der Hillkoeffizient von 1.7 ist deutlich höher als beim Wildtyp (Tabelle 4-6). Lipj R406A ist als  $V_{\max}$ -Mutante zu bezeichnen. Eine Proteinabhängigkeit war aufgrund der geringen Aktivität nicht messbar.

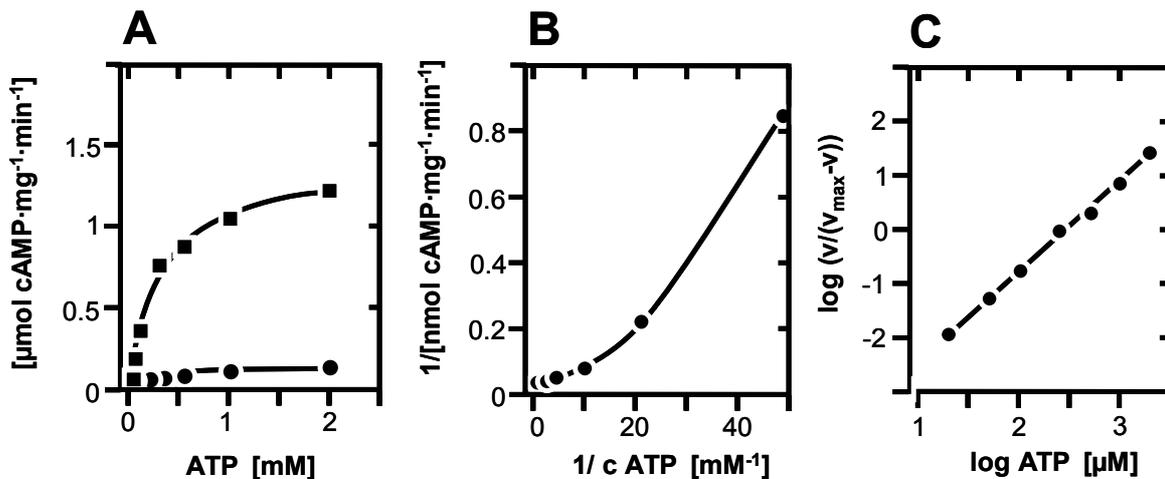


Abbildung 4-23: Substratabhängigkeit *Lipj* R406A (10 min, 37°C, 0.02 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten, (●) R406A, (■) Wildtyp zum Vergleich; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot, Geradengleichung:  
 $y = 1.6830x - 4.1717$ ;  $R^2 = 0.997$ ;  
 → R406A ist eine reine  $V_{\max}$ -Mutante.

Enzym	$V_{\max}$ [nmol cAMP·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	GC [%]	SC <sub>50</sub> [μM]	Hill- Koeffizient	$K_{\text{diss}}$ [nM]
Lipj <sub>291-462</sub>	1300	7	300	1.2	100
D395A	1100	11	80	1.3	<10
N342A/D395A	900	7	130	1.0	<10
R406A	110	2	250	1.7	n.d.

Tabelle 4-6: Parameter der Mutanten Lipj D395A, N342A/D395A und R406A im Vergleich zum Wildtyp (n.d. = nicht messbar)

3) Zuletzt wurden die beiden Aspartatreste untersucht, die laut Modellvorhersage die Koordination der Metallionen übernehmen: Bei beiden Mutanten, D302A und D346A, war weder AC- noch GC-Aktivität messbar. Wurden unter Standardbedingungen (10 min, 37°C, pH 8.1 TES/NaOH-Puffer, 3 mM Mangan, 0.5 M ATP bzw. GTP) Proteinmengen von 0.5 – 2.4 µg Protein eingesetzt, lagen alle Messwerte unter dem doppelten Leerwert. Diese beiden Reste haben offensichtlich ihre Funktion bewahrt und sind für die Katalyse unbedingt notwendig.

### 4.3.7 Zwei weitere konservierte Aminosäuren: K442 und R377

In Mammalia ACs sind zusätzlich zu den sechs kanonischen Aminosäuren noch ein Lysin an Position 1065, ein Arginin an Position 1029 (C<sub>2</sub>-Schleife der AC II aus der Ratte) und ein Arginin an Position 484 (C<sub>1</sub>-Schleife der AC V aus Kaninchen) konserviert. Aus der Kristallstruktur und proteinchemischen Ergebnissen wurde diesen basischen Aminosäureresten, zusammen mit Mg<sup>2+</sup>, die Bindung des Pyrophosphats zugeschrieben (Tesmer et al., 1997). Im Alignment mit Mammalia ACs zeigt sich, dass dieses Lysin auch in *Lipj* konserviert ist (**K442**), Arginin 484 entspricht in *Lipj* **R377**. Eine Mutation nach Alanin sollte zeigen, ob K442 und R377 auch in *Lipj*<sub>291-462</sub> eine wichtige Rolle bei der Katalyse spielt. Untersuchungen mit gereinigtem Protein K442A zeigten keine herausragenden Unterschiede in der AC-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit von R377A beträgt dagegen nur noch 40% im Vergleich zu *Lipj*<sub>291-462</sub>. Beide Proteine zeigen eine reduzierte Guanylatcyclase-Seitenaktivität (Tabelle 4-7). Die GC-Seitenaktivität von K442A und R377A wird unter gleichen Messbedingungen wie bei *Lipj*<sub>291-462</sub> von 7% auf 1% (10 nmol · mg<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>) reduziert. Die kinetischen Parameter wurden über die Hillfunktion bestimmt (Abbildung 4-24, Abbildung 4-25). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass beide Aminosäurereste ihre konservierte Funktion beibehalten haben.

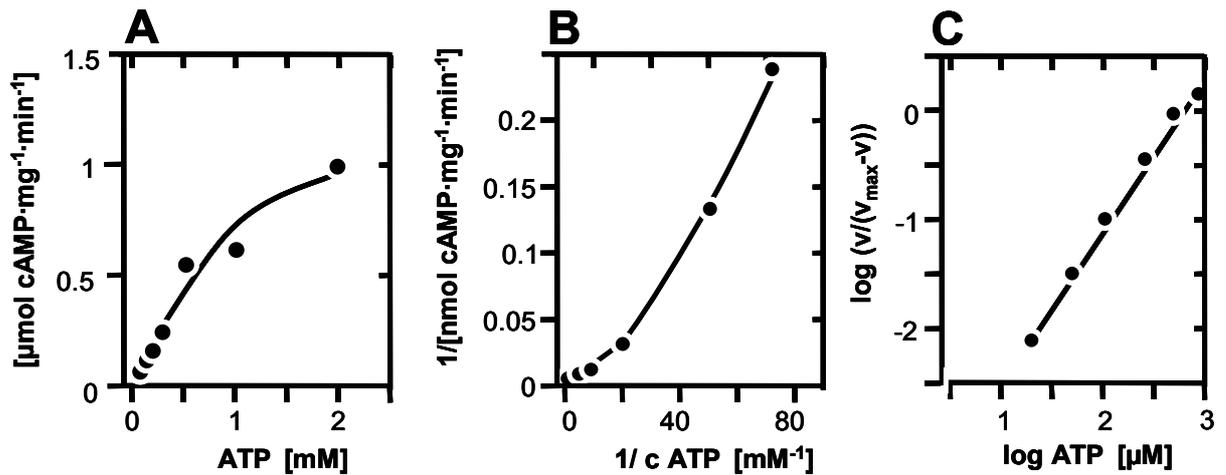


Abbildung 4-24: Substratabhängigkeit *Lipj* K442A (10 min, 37°C, 0.02 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.3748x - 3.8253$ ;  $R^2 = 0.988$

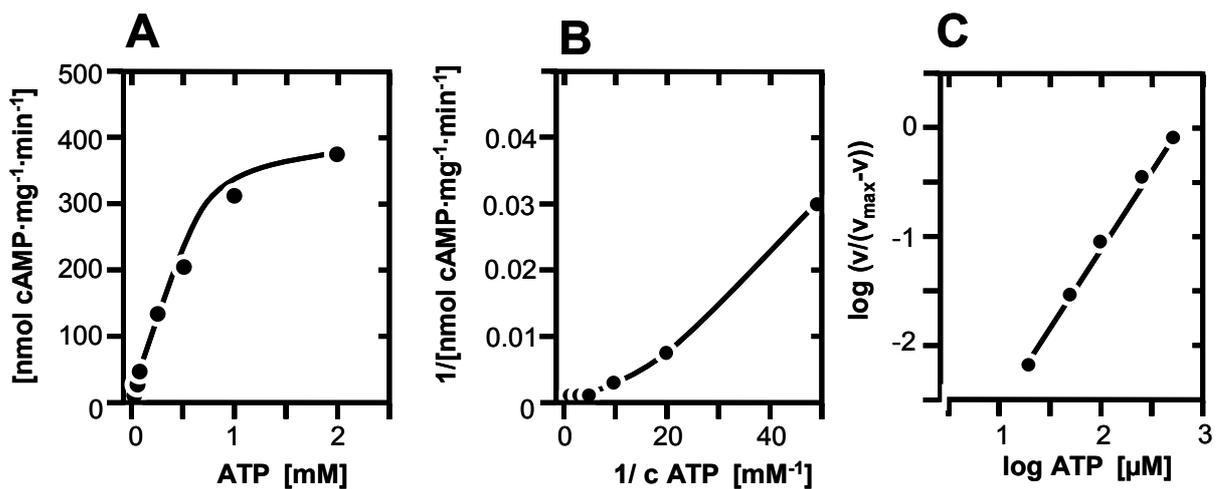


Abbildung 4-25: Substratabhängigkeit *Lipj* R377A (10 min, 37°C, 0.02 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.514x - 4.115$ ;  $R^2 = 0.997$

Aus der Proteinabhängigkeit ergibt sich für K442A ein  $K_{\text{diss}}$ -Wert von 40 nM, für R377A 160 nM, die Affinität der einzelnen Monomere zueinander ist ähnlich der des Wildtyps (Abbildung 4-26 und Abbildung 4-27).

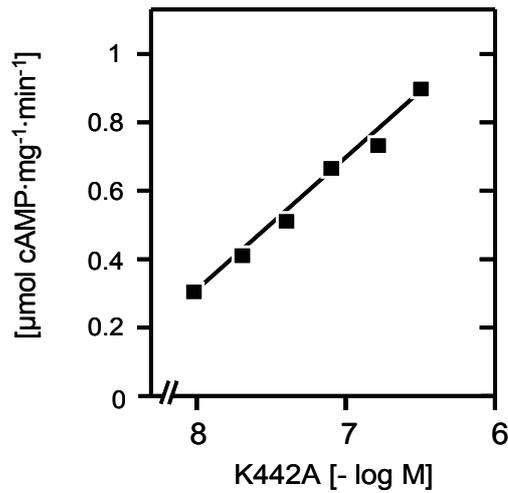


Abbildung 4-26: Proteinabhängigkeit *Lipj* K442A (10 min, 37°C, 0.5 M ATP; 10-960 nM bzw. 0.02-1.9 µg Protein)

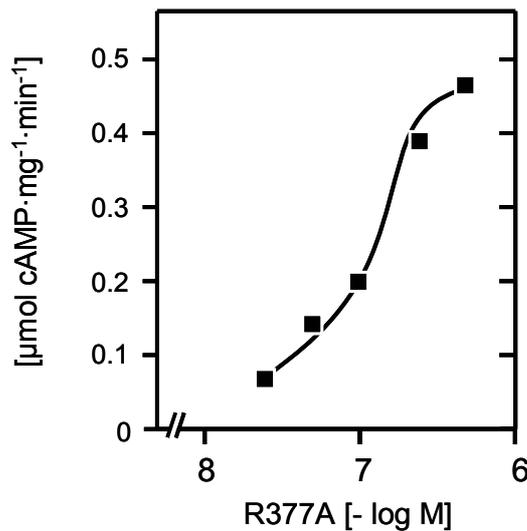


Abbildung 4-27: Proteinabhängigkeit *Lipj* R377A (10 min, 37°C, 0.5 M ATP; 25-500 nM bzw. 0.05-1 µg Protein)

Enzym	$v_{max}$ [µmol cAMP·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	GC [%]	SC <sub>50</sub> [µM]	Hill-Koeffizient	K <sub>diss</sub> [nM]
Lipj <sub>291-462</sub>	1.3	7	300	1.2	100
K442A	1	1	600	1.3	40
R377A	0.5	1	530	1.5	160

Tabelle 4-7: Kinetische Parameter der Mutante K442A und R377A im Vergleich zum Wildtyp *Lipj*<sub>291-462</sub>. Die relative GC-Seitenaktivität ist stark reduziert.

### 4.3.8 Rekonstitutionsversuch zweier inaktiver Mutanten

Die enzymatische Inaktivität eines Proteins kann auch durch Fehlfaltung des Proteins selbst bedingt sein und nichts mit dem Effekt der Punktmutation auf eine wie auch immer geartete Enzymaktivität zu tun haben. Um dies auszuschließen, wurde ein Rekonstitutionsversuch mit zwei Mutanten durchgeführt, die jeweils inaktiv sind, sich jedoch gegenseitig komplementieren sollten. Derartige Versuche wurden bereits zuvor für andere Adenylatcyclasen erfolgreich durchgeführt (Guo et al., 2001; Kanacher et al., 2002). Durch Kristallstruktur und Mutationsanalysen wurde für Mammalia Adenylatcyclasen gezeigt, dass enzymatische Aktivität an die Ausbildung eines Heterodimers aus C<sub>1</sub>- und C<sub>2</sub>-Schleife gekoppelt ist. Zwischen den beiden Schleifen bilden sich das katalytische Zentrum mit sechs kanonischen Aminosäuren für die Umsetzung von ATP und eine Forskolinbindungsstelle aus. Die beiden zur Katalyse notwendigen Metallionen werden über Aspartatreste der C<sub>1</sub>-Schleife gebunden, die restlichen vier Aminosäuren (beide substratbindenden Reste und zwei Aminosäuren zur Stabilisierung des Übergangszustandes) liegen dagegen auf der C<sub>2</sub>-Schleife (Dessauer et al., 1997; Tesmer et al., 1997; Zhang et al., 1997). Für die mycobakterielle AC Rv1625c wurde dagegen gezeigt, dass sich ein Homodimer mit zwei identischen ATP-Bindungstaschen ausbildet. Je ein ATP-Molekül wird über die beiden metallbindenden Aspartatreste aus einer Proteindomäne und vier weiteren kanonischen Aminosäuren aus der zweiten Domäne gebunden und umgesetzt. Durch das Mischen jeweils zweier inaktiver Mutanten konnte dann eine Rekonstitution der Aktivität erhalten werden, wenn die Ausbildung einer einzelnen katalytischen Tasche möglich war (Guo et al., 2001). Überträgt man dieses Model auf *Lipj*<sub>291-462</sub>, werden in diesem Protein D302 und R406 werden von verschiedenen Monomeren gestellt, um eine katalytische Tasche zu formen. Sowohl durch Mutation von R406 nach Alanin, als auch von D302 nach Alanin kann sich keine funktionsfähige katalytische Tasche ausbilden. Das Mischen beider inaktiver Mutanten R406A und D302A erlaubt dagegen die Rekonstitution einer einzelnen katalytischen Tasche (Abbildung 4-28).

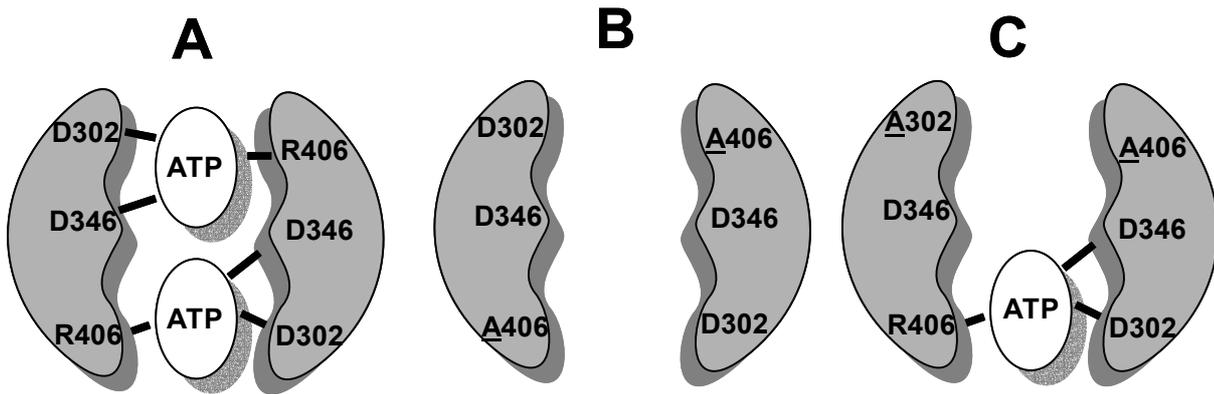


Abbildung 4-28:

Modell des Homodimers Lipj<sub>291-462</sub>

**A:** Wildtyp, Bindung von 2 ATP-Moleküle möglich

**B:** R406A, keine ATP-Bindung möglich

**C:** R406A+ D302A, Bindung eines ATP-Moleküls möglich

(modifiziert nach Guo et al., 2001)

Diese Annahme konnte durch Titration von R406A mit steigenden Mengen D302A experimentell bewiesen werden (Abbildung 4-29). Durch die Komplementierung konnte 70% ( $1.4 \mu\text{mol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) der Wildtyp-Aktivität wiederhergestellt werden, der errechnete  $K_{\text{diss}}$ -Wert liegt bei 270 nM ( $2.7 \times K_{\text{diss}}$  Wildtyp). Dies zeigt zum einen, dass durch die Komplementierung nur noch eine katalytische Tasche ausgebildet werden kann, zum anderen wurde gezeigt, dass fehlende oder geringe Aktivität der einzelnen Proteine ist nicht auf eine Fehlfaltung zurückzuführen ist, denn mit 70% der Wildtypaktivität wurde sogar der theoretisch zu erwartende Wert (50%, da nur eine katalytische Tasche) etwas übertroffen.

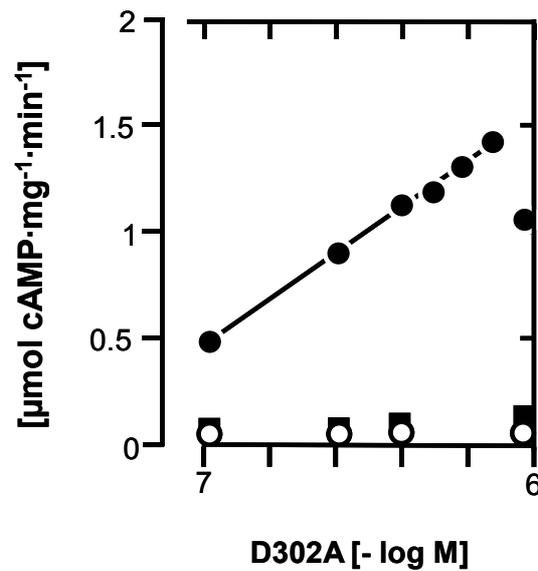


Abbildung 4-29:

Durch Titration von 0.1 µM R406A mit 0.1 – 0.75 µM der inaktiven Mutante D302A wird eine Rekonstitution der Aktivität erreicht; (○) Lipj<sub>291-462</sub> D302A allein (0.1-1 µM), (◻) Lipj<sub>291-462</sub> R406A allein (0.1-1 µM), (●) Mischung 0.1 µM R406A + 0.1–1 µM D302A. Bedingungen: 10 min, 37°C, 0.5 mM ATP; Inkubation der Proteinmischungen 10 min auf Eis vor dem Start der Reaktion.

#### 4.4 Mutationsanalyse aus Kristallisationsergebnissen

Da N342 offensichtlich keinen Einfluss auf die Substratspezifität hat, wurden alle restlichen Aminosäuren aus diesem Loop durch einen Alanin-Scan untersucht, d.h. E340, V341, T343 und F348 wurden jeweils zu Alanin mutiert. Alle Mutanten (E340A, V341A, T343A und F348A) wurden kloniert und in *E. coli* exprimiert. Im Vergleich zum Wildtyp ergab keine der Mutationen einen gravierenden Unterschied in den kinetischen Parametern (s. Abbildung 4-30 bis Abbildung 4-33); alle Parameter wurden unter gleichen Bedingungen wie beim Wildtyp ermittelt.

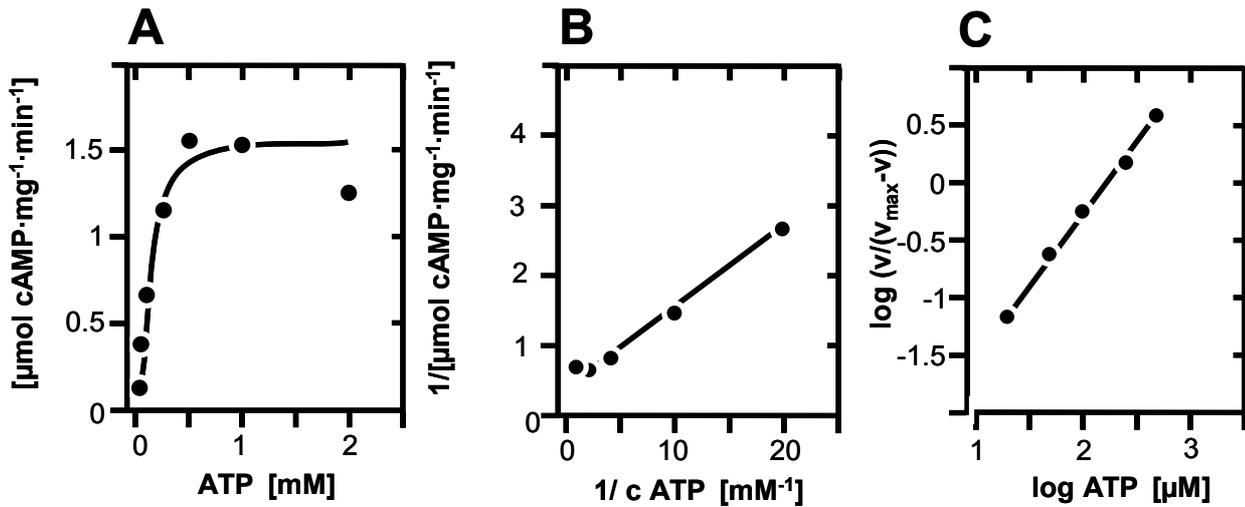


Abbildung 4-30: Substratabhängigkeit *Lipj* E340A (10 min, 37°C, 0.02 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.240x - 2.785$ ;  $R^2 = 0.988$

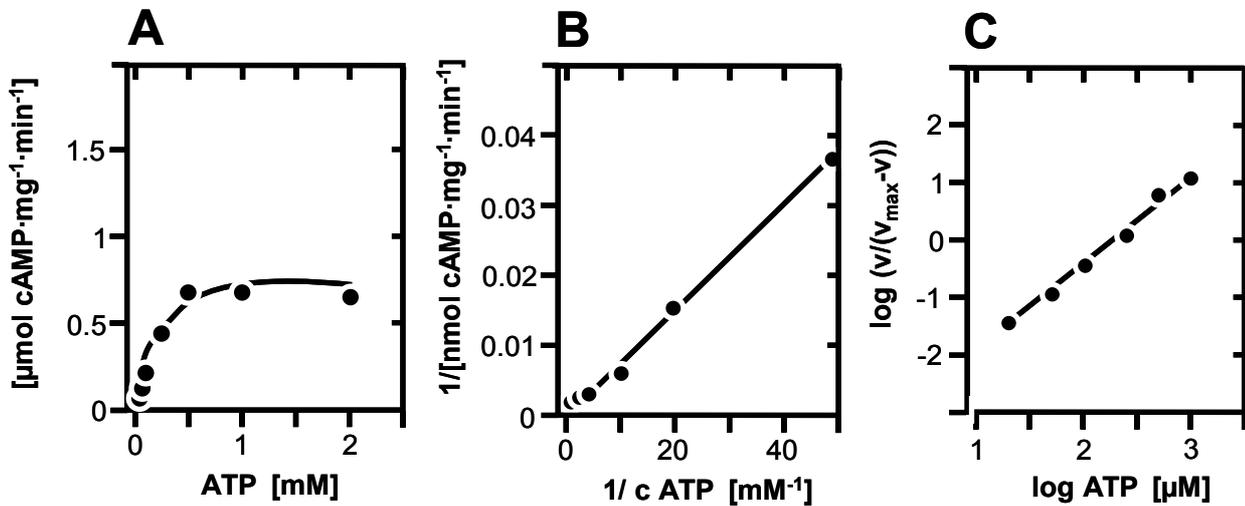


Abbildung 4-31: Substratabhängigkeit *Lipj* V341A (10 min, 37°C, 0.02 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.5801x - 3.6221$ ;  $R^2 = 0.990$

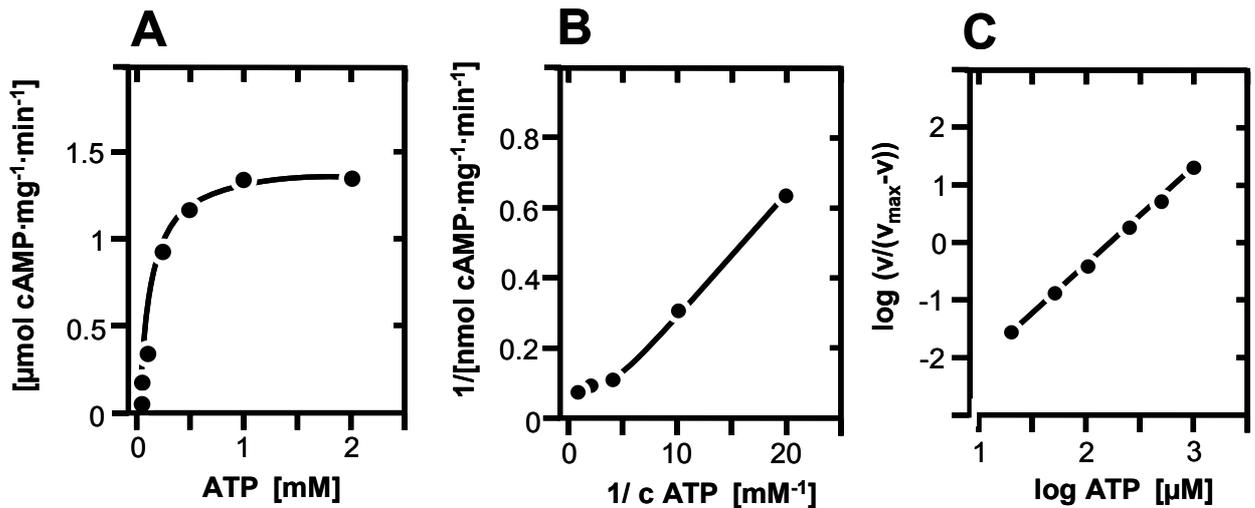


Abbildung 4-32: Substratabhängigkeit *Lipj* T343A (10 min, 37°C, 0.02 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.667x - 3.7687$ ;  $R^2 = 0.988$

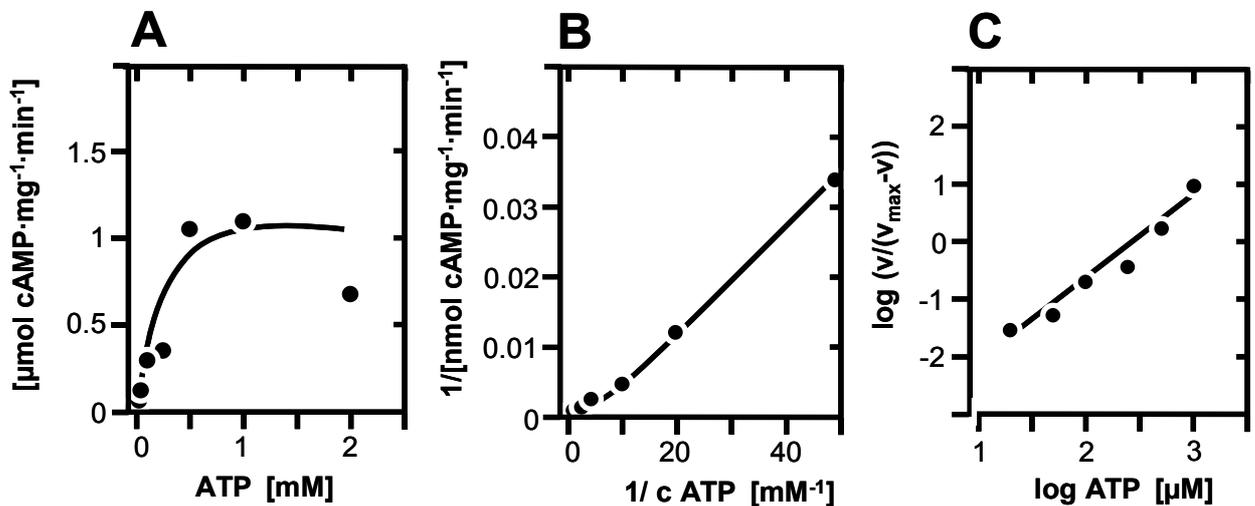


Abbildung 4-33: Substratabhängigkeit *Lipj* F348A (10 min, 37°C, 0.02 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.3623x - 3.6631$ ;  $R^2 = 0.957$

## ERGEBNISSE

Einzigste Ausnahme waren die veränderten Dimerisierungseigenschaften der Punktmutante E340A: Der errechnete  $K_{diss}$ -Wert von E340A ist mit  $<8$  nM um mehr als Faktor 10 kleiner als der des Wildtyps (Tabelle 4-8). Messungen in noch niedrigeren Proteinkonzentrationen waren unter den gewählten Messbedingungen nicht möglich. Die Mutante E340A ist also hochdimerisiert (s. Abbildung 4-34). Die Dimerisierungseigenschaften der restlichen Mutanten sind ähnlich wie beim Wildtyp (Abbildung 4-35).

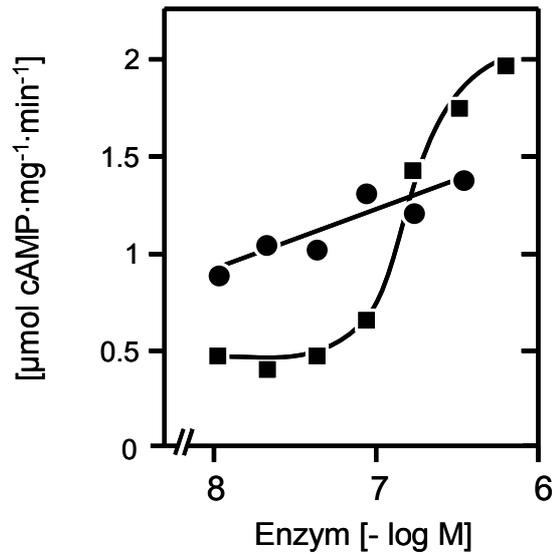


Abbildung 4-34: Proteinabhängigkeit E340A 10-360 nM (●) im Vergleich zum Wildtyp 10-600 nM (■); Bedingungen: 10 min, 37°C, 0.5 M ATP; E340A ist hochdimerisiert.

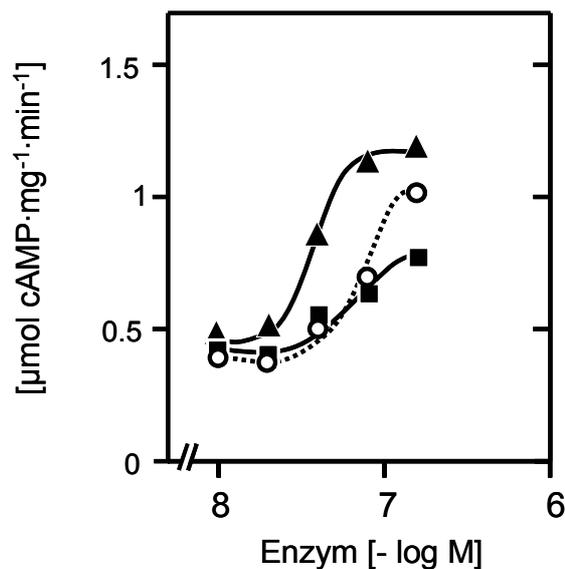


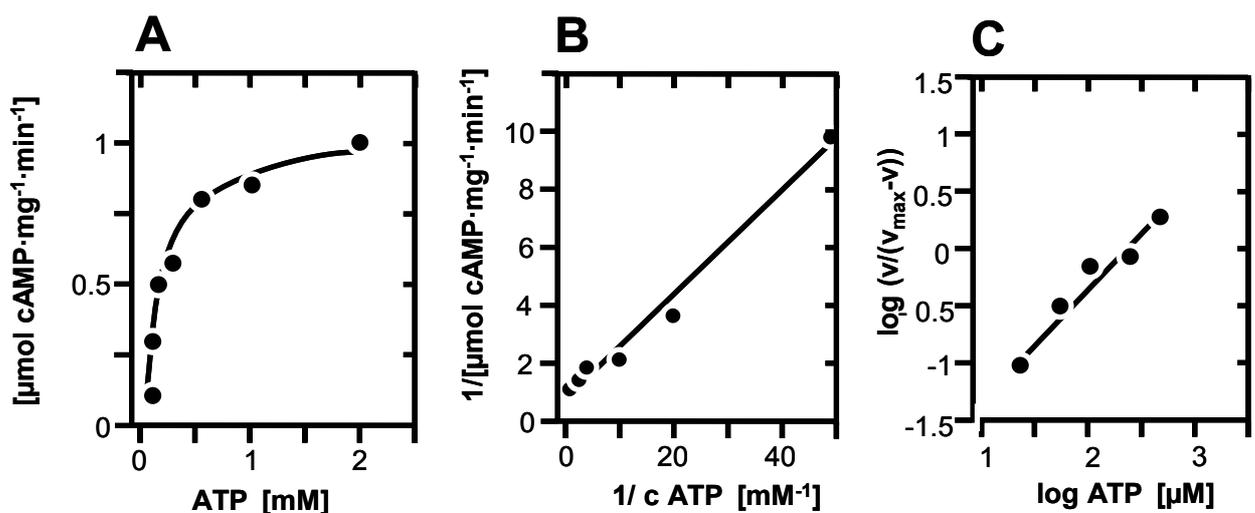
Abbildung 4-35: Proteinabhängigkeit Lipj T343A (■), F348A (▲), V341A (○) (10 min, 37°C, 0.5 M ATP; 10-320 nM gereinigte Proteine)

Nachfolgende Aufstellung (Tabelle 4-8) zeigt alle Parameter der Punktmutanten E340A, V341A, T343A und F348A im Vergleich zum Wildtyp.

Enzym	$v_{\max}$ [nmol cAMP·mg·min]	GC [%]	SC <sub>50</sub> [μM]	Hill-Koeffizient	K <sub>diss</sub> [nM]
Lipj <sub>291-462</sub>	1300	7	300	1.2	100
E340A	2000	5	180	1.3	<8
V341A	800	5	200	1.6	40
T343A	1400	5	180	1.6	30
F348A	1400	7	250	1.5	40

**Tabelle 4-8:** Parameter der Mutanten E340A, V341A, T343A und F348A im Vergleich zum Wildtyp; die Berechnung der Parameter erfolgte wie bei Lipj<sub>291-462</sub>.

Modelliert man in die voraussichtliche ATP-Bindungstasche in der Kristallstruktur von Lipj<sub>291-462</sub> ein ATP-Molekül, so fällt die geringe Distanz zwischen Arginin 316 und dem Glutamatrest an Position 386 auf (ca. 3Å). Um untersuchen zu können, ob dieser Rest eine Rolle bei der Katalyse spielt, wurde eine weitere Punktmutante, E386A, kloniert und in *E.coli* exprimiert. Die kinetischen Parameter wurden in gleicher Weise wie bei Lipj<sub>291-462</sub> ermittelt und wiesen keinen gravierenden Unterschied zum Wildtyp auf (Abbildung 4-36).



**Abbildung 4-36:** Substratabhängigkeit Lipj E386A (10 min, 37°C, 0.02 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 0.8842x - 2.0745$ ;  $R^2 = 0.952$  (linearer Bereich)

## ERGEBNISSE

Der negative Hill-Koeffizient  $K_{Hill} = 0.9$  ergibt sich dadurch, dass über ein Fitten der Hillfunktion nur ein Korrelationskoeffizient von 0.95 erreicht wird. Diesem errechneten Parameter wird keine große Bedeutung beigemessen. Durch Messung der Proteinabhängigkeit kann ein  $K_{diss}$ -Wert von 40 nM errechnet werden, das Dimerisierungsverhalten ist Wildtyp-ähnlich (Abbildung 4-37).

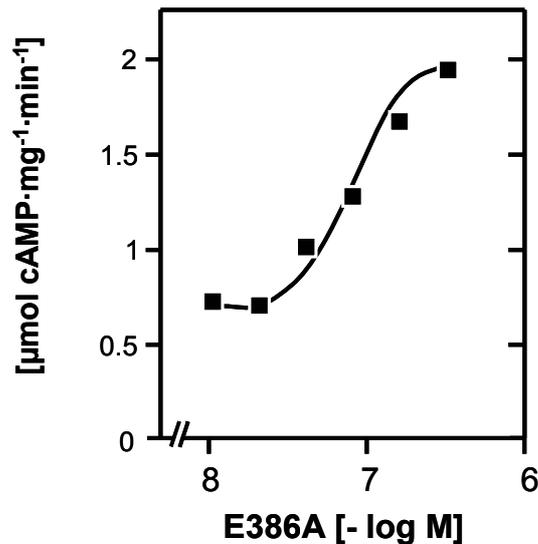


Abbildung 4-37: Proteinabhängigkeit Lipj E386A (10 min, 37°C, 0.5 M ATP; 10-320 nM gereinigtes Protein)

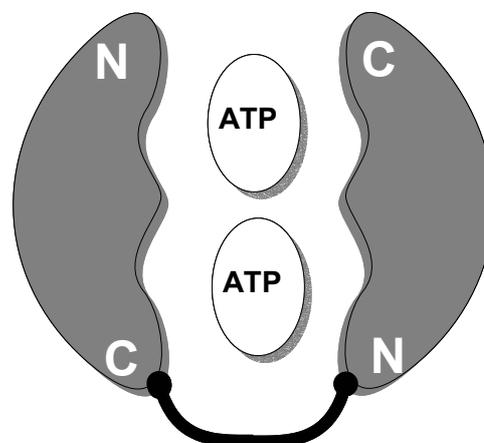
Die biochemische Charakterisierung von Lipj E386A (Tabelle 4-9) ergab keinen Hinweis auf eine wichtige Rolle dieser Aminosäure für die Adenylatcyclase-Aktivität von *Lipj*<sub>291-462</sub>.

Enzym	$v_{max}$ [nmol cAMP·mg·min]	GC [%]	SC <sub>50</sub> [µM]	Hill-Koeffizient	$K_{diss}$ [nM]
Lipj <sub>291-462</sub>	1300	7	300	1.2	100
E386A	1200	7	250	0.9	40

Tabelle 4-9: Parameter der Mutante E386A im Vergleich zum Wildtyp; die Berechnung der Parameter erfolgte wie bei *Lipj*<sub>291-462</sub>.

#### 4.5 Zwei AC mit Linker: *Lipj* CLC

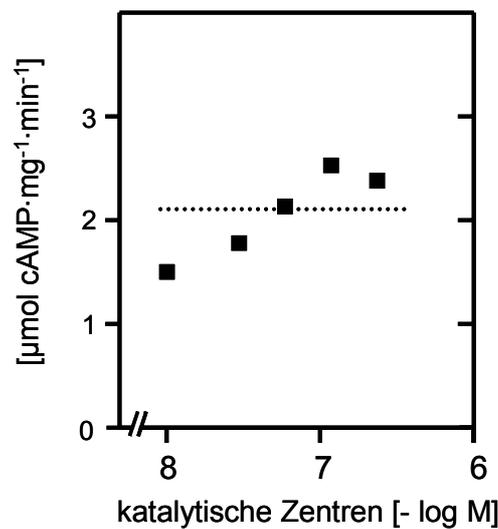
Die Ausbildung eines Dimers ist Voraussetzung für die katalytische Aktivität als AC (Taussig und Gilman, 1995; Sunahara et al., 1996). In Säuger-Adenylatcyclasen bilden zwei einander ähnliche cytosolische Domänen, C1 und C2, ein Heterodimer aus. Diese Domänen werden weiter unterteilt in C1a, C1b bzw. C2a und C2b, wobei die C1a und C2a Domänen in Lösung ein Heterodimer ausbilden, was Voraussetzung für die katalytische Aktivität ist. Es können sich aber auch Homodimere oder heterodimere Chimeren aus verschiedenen Isoformen bilden (Tang und Gilman, 1995; Yan et al., 1996; Whisnant et al., 1996). Die Ausbildung eines Homodimers wurde für die mycobakterielle Adenylatcyclase Rv1625c durch das Verbinden zweier katalytischer Zentren über einen Linker aus 14 Aminosäuren bewiesen. Durch das Verbinden zweier katalytischer Zentren war die gemessene AC-Aktivität nicht mehr von der Proteinkonzentration abhängig (Guo et al., 2001). Auch von *Lipj*<sub>291-462</sub> wurde ein solches artifizielles Dimer kloniert und in *E. coli* exprimiert, *Lipj* CLC (s. auch Abbildung 4-10). Der Linker zwischen den beiden katalytischen Zentren hat folgende Aminosäuresequenz: TRAAGGPPAAGGLE. Anzahl und Abfolge der Aminosäuren wurde so gewählt, weil Dr. Ying Lan Guo bereits zuvor erfolgreich ein funktionelles Dimer mit diesem Linker zwischen den katalytischen Zentren von Rv1625c generieren konnte, zudem lassen sich die Triplets für TR und LE als Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *MluI* und *XhoI* verwenden. Dabei wurde die erste katalytische Domäne C-terminal über den Linker mit dem N-Terminus der zweiten Domäne verbunden und somit zwei identische katalytische Zentren in einem Protein exprimiert. Schematisch kann *Lipj* CLC folgendermaßen dargestellt werden (Abbildung 4-38):



**Abbildung 4-38:** Zwei katalytische Zentren von *Lipj*<sub>291-462</sub> werden über einen Linker aus 14 Aminosäuren verbunden (C- nach N-terminal).

### 4.5.1 Proteinabhängigkeit

Hinweise darauf, dass *Lipj* als Dimer arbeitet ergaben sich bereits aus den Untersuchungen zur Proteinabhängigkeit und Western-Blot-Analyse. Messungen zur Proteinabhängigkeit von *Lipj* CLC zeigen, dass auch bei kleinsten Proteinkonzentrationen die volle spezifische Aktivität erreicht ist; die spezifische Aktivität ist also praktisch unabhängig von der Proteinkonzentration. Dadurch wird deutlich, dass die Proteinabhängigkeit von *Lipj*<sub>291-462</sub> den Prozess der Dimerisierung widerspiegelt.



**Abbildung 4-39:** Proteinabhängigkeit *Lipj* CLC (10 min, 37°C, pH 6.4 MOPS/Tris, 0.5 M ATP; 5-250 nM gereinigtes Protein; es wird die Konzentration an katalytischen Zentren im Test angegeben).

### 4.5.2 Substratspezifität

Durch die Verknüpfung zweier katalytischer Domänen wird die Substratspezifität nicht verändert: Unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie bei *Lipj*<sub>291-462</sub> werden für *Lipj* CLC 6 % relative GC-Seitenaktivität gemessen (vgl. 4.1.6: *Lipj*<sub>291-462</sub> 7 % relative Seitenaktivität).

### 4.5.3 Kinetische Messungen

Die Bestimmung der Substratabhängigkeit zeigt, dass Lipj CLC keiner reinen Michaelis-Menten-Kinetik gehorcht (Abbildung 4-40). Kinetische Parameter wurden daher wie beim Wildtyp durch Fitten der Hill-Funktion an die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeits-/Substratkonzentrations-Diagramme bestimmt. Durch die Verknüpfung zweier Monomere erhöht sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$  von 1,3 auf 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Die anderen Parameter unterscheiden sich nur geringfügig von denen des Wildtyps:  $K_M$  liegt bei 350  $\mu\text{M}$  (Lipj<sub>291-462</sub>: 300  $\mu\text{M}$ , vgl. 4.1.7); der Hill-Koeffizient (1.0) zeigt, dass keine Kooperativität mehr vorliegt.

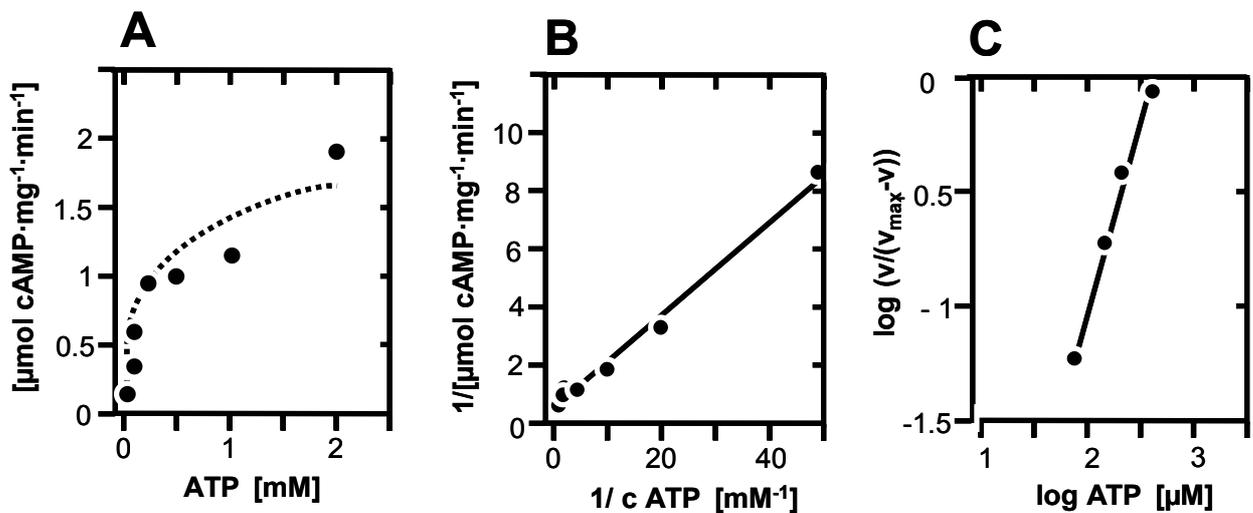


Abbildung 4-40: Substratabhängigkeit *Lipj* CLC (10 min, 37°C, 0.02 - 2 mM ATP)  
 Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot,  
 Geradengleichung:  $y = 1.0529 - 2.5298x$ ;  $R^2 = 0.992$  (linearer Bereich).

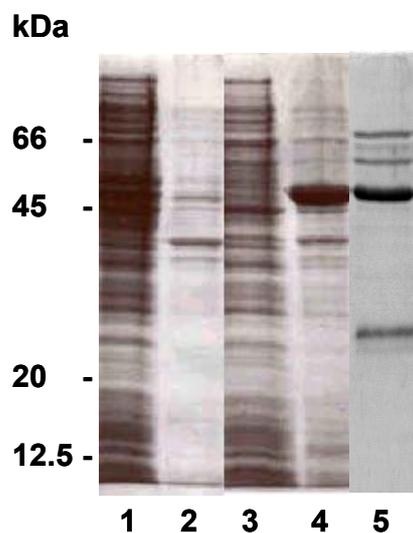
## 4.6 Charakterisierung des Holoenzym *LipJ*<sub>1-462</sub>

### 4.6.1 Das Holoenzym *LipJ*<sub>1-462</sub> ist ebenfalls AC-aktiv

Um das Holoenzym auf AC-Aktivität zu testen, wurde *LipJ*<sub>1-462</sub> in pQE30 kloniert und in BL21(DE3) [pRep4]-Zellen exprimiert. Die Expression erfolgte in 50  $\mu\text{l}$  LB (amp/kan) über 4 h bei Raumtemperatur, induziert wurde mit 60  $\mu\text{M}$  IPTG. Nach Zellernte wurden die Zellen in 50 mM Tris/HCl resuspendiert und mit Ultraschall lysiert. Von diesem Zellhomogenat wurden 40  $\mu\text{l}$  im AC-Test eingesetzt (Tris/HCl pH 7.5, Zusatz von regenerierendem System, Kontrolle pQE30 in BL21(DE3) [pRep4]). Unter Berücksichtigung der Ausbeute (ca. 50%) ergab sich im Test Totalumsatz (eingesetzt: 1.3 Millionen cpm, Probe 600 000 cpm, Kontrolle 350 cpm); *Lipj*<sub>1-462</sub> ist als AC also ebenfalls hochaktiv.

## 4.6.2 Expression und Reinigung

Das errechnete Molekulargewicht des Proteins beträgt 51 114 Da, der berechnete isoelektrische Punkt bei 5,96. Im Gegensatz zur katalytischen Domäne wurde allerdings nur sehr wenig lösliches Protein gebildet. Der Löwenanteil fand sich nach Zentrifugation des Zellhomogenates bei 3000xg im Niederschlag wieder. Durch anschließende Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätsreinigung des Überstandes konnten pro 200 ml Expressionskultur nur ca. 40 µg Protein gewonnen werden, das zudem verunreinigt war (Abbildung 4-41). Die Verunreinigungen wurden als typische lösliche *E. coli*-Proteine identifiziert, die beispielsweise dann mitgereinigt werden, wenn die Konzentration an Protein mit His-Tag gering ist.



**Abbildung 4-41:** Expressionsbande des Holoenzym im Niederschlag (Zentrifugation mit 3000xg) bei 51 kDa. SDS-PAGE 15%, pro Spur wurden ca. 20 µg Protein aufgetragen. Spur 1: Überstand pQE30 leer als Kontrolle in BL21-Zellen, 2: Niederschlag pQE30, 3: Überstand Lipj<sub>1-462</sub>, 4: Niederschlag Lipj<sub>1-462</sub>, 5: Eluat NiNTA- Reinigung Lipj<sub>1-462</sub> mit typischen löslichen Verunreinigungen aus *E. coli* bei ca. 25, 55 und 66 kDa).

Zur Verbesserung der Ausbeute und des Reinheitsgrades wurden verschiedene Parameter in einzelnen Expressionen und Reinigungsversuchen verändert:

- Die Expressionsdauer variierte von 3 - 20 h, die Temperatur von 18-30°C
- Zugabe unterschiedlicher Harzmengen zum Überstand (50 – 250 µl)
- Induzierung mit 0 – 60 µM IPTG
- Binden des Proteins ans Harz 1 – 16 h
- Verschiedene Methoden zur Zelllyse (Ultraschall, Lysozym und DNase; Frenchpress)
- Statt Expression in BL21 (DE3) [pRep4] in BL21 Star – Zellen (erhöhte mRNA-Stabilität)
- Hitzeschocken der Expressionszellen bei OD<sub>600</sub> = 0.5 für 1 Minute

(um die Bildung eventueller Hitzeschockproteine zu induzieren. Zur 37°C warmen Expressionskultur wurde dasselbe Volumen an 59°C heißem LB unter Rühren zugegeben, danach erfolgte 5 min Eiskühlung. Anschließend wurden die notwendigen Antibiotika erneut zugegeben, da sie eventuell durch Zugabe des heißen Mediums zerstört werden können. Unter Schütteln (220 Umdrehungen pro Minute) wurde bei 37°C weiterexprimiert. Als Kontrolle dienten BL21-Zellen ohne Plasmid. Jede dieser Änderungen brachte keine oder nur geringfügige Verbesserung in Reinheit oder Ausbeute; Versuche, das Protein nach denaturierender Reinigung mit Guanidiniumchlorid und Harnstoff mittels Dialyse zu renaturieren, blieben erfolglos (Messwerte im AC-Test waren stets geringer als der doppelte Leerwert bei 20-50 µg Protein nach Dialyse pro Testansatz, 10 min Reaktionszeit, 37°C, TES/NaOH-Puffer pH 8.1).

#### **4.6.2.1 Einfluss von Tensiden**

Um die Löslichkeit von Proteinen zu erhöhen, kann nach Zellyse und vor der Zugabe des Harzes ein Tensidzusatz erfolgen. Um auszuschließen, dass das Protein dadurch denaturiert wird, wurde der Zentrifugationsniederschlag der Zellernte (3000xg) im AC-Test mit verschiedenen Detergenzien versetzt und die Aktivität mit unbehandeltem Zentrifugationsniederschlag verglichen. Der Tensidzusatz erfolgte aus konzentrierten Stammlösungen (max. 10 µl/ Testansatz), die Inkubationsdauer vor Reaktionsstart betrug 10 min. Um Wechselwirkungen mit den zugesetzten Tensiden auszuschließen, wurde der Test ohne regenerierendes System durchgeführt.

Detergenz	Endkonzentration [%]	Restaktivität [%]
DDM	0.05	63
DDM	0.1	76
DDM	0.3	67
Polidocanol	0.5	91
Polidocanol	1	87
Nonidet P-40	0.1	50
Nonidet P-40	0.5	98
Triton X 100	0.1	68
Triton X 100	0.5	91

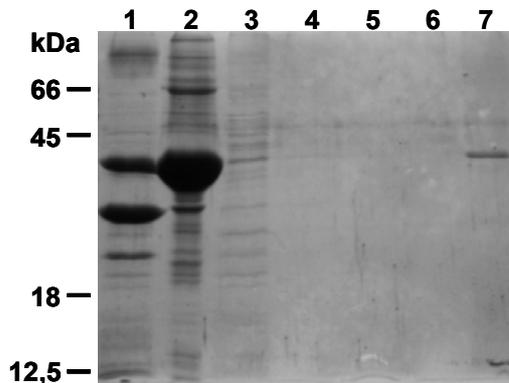
**Tabelle 4-10: Tensideinfluss auf Lipj<sub>1-462</sub> : Die Aktivität wird nur gering beeinträchtigt.**

Wie Tabelle 4-10 zeigt, wird die Aktivität von *Lipj*<sub>1-462</sub> kaum beeinträchtigt. Lediglich im Ansatz mit 0.1% Nonidet ist die AC-Aktivität auf die Hälfte reduziert. Mit einem Zusatz von 0.5% Nonidet bleibt die Aktivität aber unberührt (98% Restaktivität).

Da das Enzym also durch die getesteten Detergenzien nicht denaturiert oder stark in seiner Aktivität gehemmt wird, konnten Tensidzusätze zur Verbesserung von Löslichkeit, Reinheitsgrad und Ausbeute eingesetzt werden.

### 4.6.3 Membranpräparation Holo *Lipj*<sub>1-462</sub>

Aus der Sequenzanalyse von *lipj* ergibt sich zwar kein Hinweis auf transmembranspannende Regionen, dennoch findet sich das exprimierte Holoenzym *Lipj*<sub>1-462</sub> nach Zellyse und Zentrifugation immer im Niederschlag wieder (SDS-PAGE-Analyse, Abbildung 4-42). Daher wurde eine Membranpräparation (1% Polidocanol, s. 3.9) mit anschließender Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung durchgeführt. Trägt man die einzelnen Fraktionen auf ein PAGE-Gel auf, findet sich weiterhin über 90% des Proteins nach dem ersten Zentrifugationsschritt mit 3000xg im Niederschlag wieder, nur ein geringer Teil konnte löslich gewonnen und gereinigt werden (ca. 40 µg gereinigtes Protein, geschätzt aus PAGE-Gel). Der Reinheitsgrad konnte allerdings deutlich erhöht werden: Das Protein im Eluat ist sauber. Versuche mit weiteren Detergenzien (Triton P-40 2%, CHAPS 2%, n-Octyl-β-D-Glucopyranosid 3%) ergaben keine Verbesserung, auch mit diesen Detergenzien wurden über 90% des Proteins nach Zentrifugation mit 3000xg unlöslich im Niederschlag wiedergefunden.



**Abbildung 4-42:** Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung *Lipj*<sub>1-462</sub> nach Membranpräparation. SDS-PAGE 12.5%. Spur 1: 10 µl Überstand nach zweiter Zentrifugation 100 000xg, 2: 10 µl Niederschlag 3000xg (nach Resuspendierung in 20 ml Suspensionspuffer) 3: Durchlauf der Reinigung, 4-6 : Waschfraktionen, 7 : 10 µl Eluat aus Reinigung

#### 4.6.4 Expression von *Lipj*<sub>1-462</sub> in pET16b / BL21(DE3)[pLysS]

Dass *Lipj*<sub>1-462</sub> in *E. coli* partikulär exprimiert wird, könnte auch durch Bildung von so genannten „inclusion bodies“ bedingt sein. Die Bildung von *inclusion bodies* kann vielfältige Ursachen haben. Eine Ursache könnte das gewählte Expressionssystem sein. Bei der Expression in pQE30 / BL21(DE3) [pRep4] besteht die Möglichkeit, dass bereits vor Induktion mit IPTG laufend Protein gebildet wird. Um auszuschließen, dass die partikulären Eigenschaften des Holoenzym *Lipj*<sub>1-462</sub> durch stete Hintergrundexpression bedingt sind, wurde das Protein auch in einem anderen System kloniert und exprimiert.

Das Expressionssystem pET16b / BL21(DE3)[pLysS] der Firma Novagen verspricht zuverlässige Unterdrückung von Hintergrundexpression (Abbildung 4-43). Die Transkription des Zielgenes auf dem Expressionsvektor wird über einen T7-Promotor gesteuert. Dieser Promotor wird nur von der T7-RNA-Polymerase erkannt, nicht von *E. coli*-Polymerasen. Vor der Induktion ist das System nicht aktiv, da der zugehörige *lac*-Operator durch den *lac*-Repressor blockiert ist (codiert durch ein *lacI*-Gen auf dem Vektor pET16b). Zudem kann keine T7-Polymerase exprimiert werden, da auch die Expression dieses Enzyms doppelt kontrolliert ist: Zum einen wird auf dem zusätzlichen [pLysS]-Plasmid das T7-Lysozym codiert, ein natürlicher Inhibitor der T7-Polymerase; zum anderen wird auch die Transkription des T7-Gens auf dem Wirtsgenom (Genabschnitt DE3) über ein *lac-operon* geregelt. Das *lacI*-Gen für den *lac*-Repressor wird doppelt codiert: Auf dem Wirtsgenom und zusätzlich auf dem Expressionsplasmid pET16b. So wird im inaktiven Zustand sicher gestellt, dass keine T7-Polymerase zur Transkription des Zielgens gebildet wird, eventuell vorhandene Polymerase könnte zwar den zugehörigen Promotor erkennen, durch den blockierten *lac*-Operator würde dennoch keine Transkription erfolgen können. Erst durch Induktion mit IPTG wird eine Transkription möglich: Der Repressor des *lac*-Operators vor dem T7-Gen wird inaktiviert, die Expression von T7-Polymerase wird gestartet. Da es sich hierbei um eine Überexpression handelt, spielt es keine Rolle, dass ein Teil der exprimierten Polymerase durch T7-Lysozym inaktiviert wird. Gleichzeitig wird durch IPTG auch der *lac*-Operator vor dem Zielgen freigegeben. Eine Transkription des Zielgens durch die T7-Polymerase ist nun möglich, das Protein wird ebenfalls überexprimiert. *Lipj*<sub>1-462</sub> wurde in diesem Expressionssystem kloniert und exprimiert.

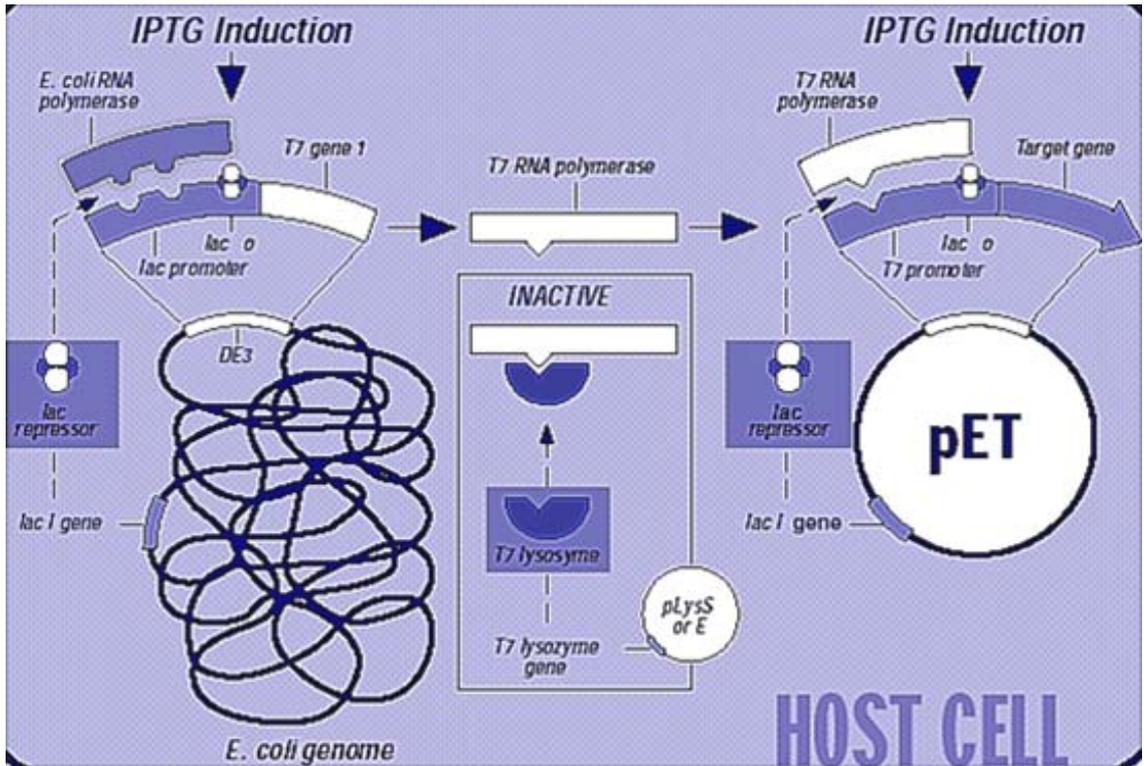


Abbildung 4-43: Expressionssystem pET16b / BL21(DE3)[pLysS]-Zellen; Quelle: www.novagen.de

Wie auf dem SDS-PAGE zu sehen (Abbildung 4-44), wird das Holoenzym dennoch unlöslich exprimiert. Bei anschließender Reinigung des Überstandes zeigt sich aber eine Verbesserung gegenüber dem bisher verwendeten System: Das Protein im Eluat ist relativ sauber, die Ausbeute pro 200 ml Kultur beträgt ca. 170 µg Protein, im Vergleich zum vorigen System (ca. 40 µg/200 ml) mehr als das Vierfache.

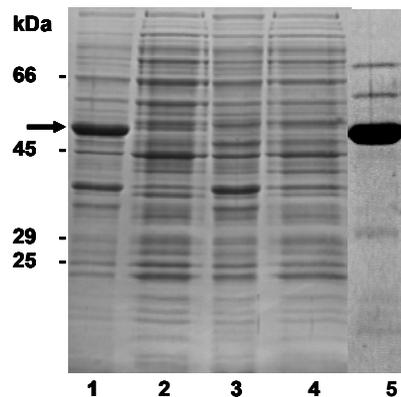
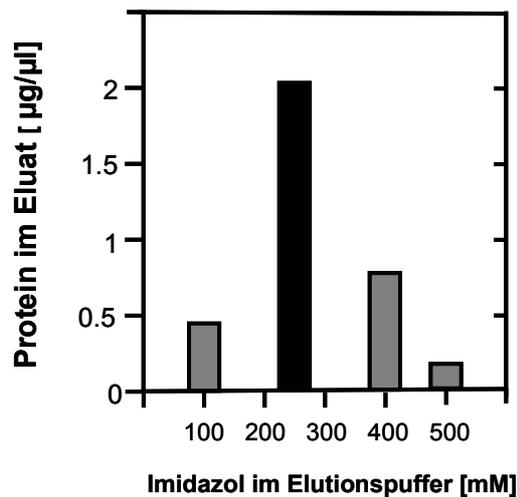


Abbildung 4-44: Expression des Holoenzym in pET16b/BL21[pLysS]. SDS-PAGE 12.5%, pro Spur ca. 20 µg Protein. Spur 1: Niederschlag *Lipj*<sub>1-462</sub> 3000xg, 2: Überstand *Lipj*<sub>1-462</sub> 3000xg, 3: Niederschlag pET16b/BL21[pLysS] leer als Kontrolle, 4: Überstand pET16b/BL21[pLysS], 5: Eluat Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung (250 mM Imidazol im Elutionspuffer).

Da das Protein nun mit einem N-terminalen Deca-His-Tag exprimiert wurde, musste überprüft werden, ob 250 mM Imidazol im Elutionspuffer ausreichen, um das Protein vom Harz zu lösen. Eine Elutionsreihe mit Imidazolgehalten im Elutionspuffer von 100-500 mM zeigte, dass mit 250 mM Imidazol der größte Teil des Proteins eluiert werden kann (Abbildung 4-46).



**Abbildung 4-45:** Elutionsreihe 100-500 mM Imidazol. Das mit Protein beladene Harz in der Säule wurde zuerst mit 200 µl Elutionspuffer (100 mM Imidazol) eluiert, anschliessend mit je 200 µl Elutionspuffer 250 mM, 400 und 500 mM Imidazol. Nach Elution mit 250 mM Imidazol ist bereits der größte Teil des Proteins eluiert.

#### 4.6.5 Lipj<sub>1-462</sub> – ein Ektoenzym?

Werden Zellen nach Expression von *Lipj*<sub>1-462</sub> (BL21(DE3)[pRep4]) in Zellwaschpuffer resuspendiert und ohne weitere Maßnahmen zur Lyse 40 µl der Suspension in den AC-Test gegeben, kann bereits starke AC-Aktivität gemessen werden (gemessener Substratumsatz 34%). Da im Zellwaschpuffer 1 mM EDTA enthalten ist, könnte dies ein Hinweis auf Lokalisation des Holoenzym im periplasmatischen Raum von *E. coli* sein. Um auszuschließen, dass der Effekt lediglich durch den osmotischen Gradienten von LB-Medium zum Suspensionspuffer verursacht wurde, erfolgte Resuspendierung und AC-Test der unlysierten Zellen unter zum Medium isoosmotischen Bedingungen. Dazu wurde die Osmolalität verschiedener Chargen LB-Medium mit Semi-Mikroosmometer der Fa. Knauss bestimmt (3 Chargen: 285-305 mOsm). Es wurden 2 Puffer zur Resuspendierung hergestellt und im Halbmikroosmometer vermessen, die Angleichung der Molalitäten wurde unter Berücksichtigung der Aktivitäten über Henderson-Hasselbalch berechnet und durch Zusatz von Glycerol 99% erreicht:

## ERGEBNISSE

---

- Tris/HCl EDTA-frei (500 ml: Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM; Glycerol 9.89 g; H<sub>2</sub>O ad 500.0)
- Tris/HCl mit EDTA (500 ml: Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM; EDTA 1 mM; Glycerol 9.7 g; H<sub>2</sub>O ad 500.0)

Beide Puffer wurden vermessen und lagen im Bereich zwischen 285- 290 mOsm.

In gleicher Weise wurde mit dem Test-Cocktail zur Messung der AC-Aktivität verfahren: Messung eines Cocktails, der ohne Zusatz der radioaktiven Tracer auf gleiche Osmolalität geprüft wurde, ergab 305 mOsm. Als Kontrollen dienten Zellen mit exprimierter katalytischer Domäne und Leervektor. Nach Expression von *Lipj<sub>1-462</sub>* wurden aus der Kultur 40 µl Zellen direkt in den AC-Test gegeben, der Rest (2x25 ml) wurde abzentrifugiert und die Zellniederschläge unterschiedlich aufgearbeitet:

- 1) Resuspendierung in 25 ml EDTA-haltigem Puffer
- 2) Resuspendierung in 25 ml EDTA-freiem Puffer, davon wurden 12.5 ml durch 30 sec US lysiert.

Von allen Ansätzen wurden 40 µl im Test eingesetzt (75 µM ATP, pH 7.5). Die nachfolgende Tabelle zeigt, dass EDTA nicht allein der auslösende Faktor für die gemessene Aktivität war. Da sowohl bei *Lipj<sub>1-462</sub>* als bei *Lipj<sub>291-462</sub>* die Aktivität gleichermaßen durch Resuspendieren in beiden Puffern zugänglich wird, kann kein Rückschluss auf eine Lokalisation von *Lipj<sub>1-462</sub>* in *E. coli* gezogen werden (Tabelle 4-11). Wahrscheinlich wurden die Zellen durch Scherkräfte beim Resuspendieren schon beschädigt; die höchste Aktivität wird bei beiden Proteinen nach Lyse durch Ultraschall gemessen. Das Protein wird offensichtlich auch nicht von den Zellen ins Medium sezerniert. (vgl. 4.6.16)

[cpm]	Zellen direkt aus Kultur	EDTA-frei	EDTA 1mM	EDTA 1mM + US
pQE30	50	65	65	65
Kat. Domäne	400	3500	50000	100000
Holoenzym	200	2000	8000	40000

**Tabelle 4-11:** cpm im isoosmotischen AC-Test im Vergleich: Kein Hinweis auf ein Ektoenzym .

### 4.6.6 pH-Optimum

*Lipj<sub>1-462</sub>* zeigt weniger Abhängigkeit von der eingesetzten Puffersubstanz als die katalytische AC-Domäne. Wird über einen pH-Bereich von 4.5 – 9.3 gemessen, liegt die höchste Aktivität bei pH 7.45 (Tris/Acetat). Der pH-Bereich, in dem Aktivität von *Lipj<sub>1-462</sub>* gemessen wird ist allerdings recht breit (pH 6.4 bis 8.5). Aus Gründen der Vergleichbarkeit der Messungen werden alle weiteren Tests bei pH 8.1 (TES/NaOH) durchgeführt, falls nicht gesondert angegeben.

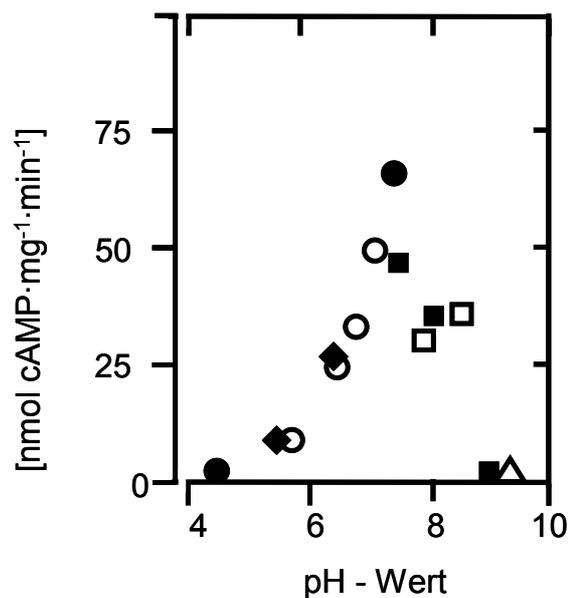


Abbildung 4-46:

pH-Abhängigkeit *Lipj<sub>1-462</sub>*

Bedingungen: 0.2 µg gereinigtes Protein, 75 mM ATP, 37°C, 10 min;  
 Puffersubstanzen: ● Tris/Acetat, ○ MOPS/Tris, ◆ MES/Tris,  
 □ TES/NaOH, ■ Tris/HCl, △ NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

### 4.6.7 Proteinabhängigkeit

Die Abhängigkeit der Aktivität von der eingesetzten Proteinkonzentration ist für *Lipj<sub>1-462</sub>* ähnlich wie für die katalytische Domäne: Im Bereich zwischen 4 und 420 nM kann mit steigender Proteinkonzentration eine Erhöhung der Aktivität um mehr als das 15fache gemessen werden. Die im Test eingesetzten Proteinmengen betragen 0.02 – 2.1 µg Protein, die Testdauer wurde von 10 auf 7 Minuten gesenkt, um einen hemmenden Einfluss von gebildetem Pyrophosphat zu vermindern. Halbmaximale Aktivität (=  $K_{diss}$ ) lag bei 90 nM vor (Abbildung 4-47).

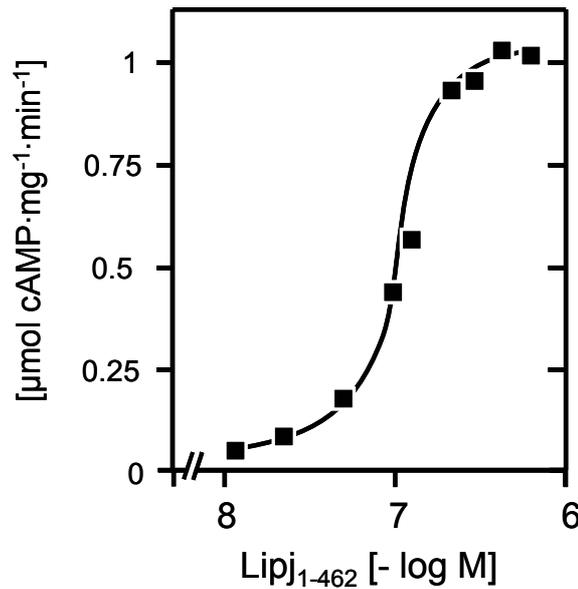


Abbildung 4-47: Proteinabhängigkeit *Lipj*<sub>1-462</sub> (7 min, 37°C, 0.5 M ATP, pH 7.5 TRIS/HCl; 4-420 nM gereinigtes Protein)

#### 4.6.8 Substratspezifität

Auch das Holoenzym wurde auf Guanylatcyclase-Seitenaktivität untersucht. Werden im AC- und GC-Test vergleichbare Proteinmengen von 0.5-1 μg eingesetzt, ergibt sich eine relative Seitenaktivität von 4% für das Holoenzym- also ein ähnlicher Wert wie bei *Lipj*<sub>291-462</sub> (7%, s. 4.1.6). Um Vergleichbarkeit mit *Lipj*<sub>291-462</sub> zu gewährleisten, wurde 10 min bei 37°C in TES/NaOH-Puffer pH 8.1 getestet.

#### 4.6.9 Kinetische Messungen

Auch *Lipj*<sub>1-462</sub> zeigt ein kooperatives Verhalten: Bei gleichen Messbedingungen wie bei der katalytischen Domäne lässt sich über einen Hill-Plot ein Hill-Koeffizient von 1.4 errechnen (Abbildung 4-48). Auch  $V_{max}$  (300 nmol cAMP·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) und  $SC_{50}$  (350 μM) wurden über die Hill-Funktion errechnet. Während der  $SC_{50}$ -Wert quasi gleich dem der katalytischen Domäne ist (300 μM), scheint die maximale Reaktionsgeschwindigkeit stark abzuweichen. Berechnet man allerdings die jeweiligen Wechselzahlen über das Molekulargewicht der Proteine, so ergibt sich für die katalytische Domäne 0.4/sec, für das Holoenzym 0.3/sec- es zeigt sich also kein Unterschied.

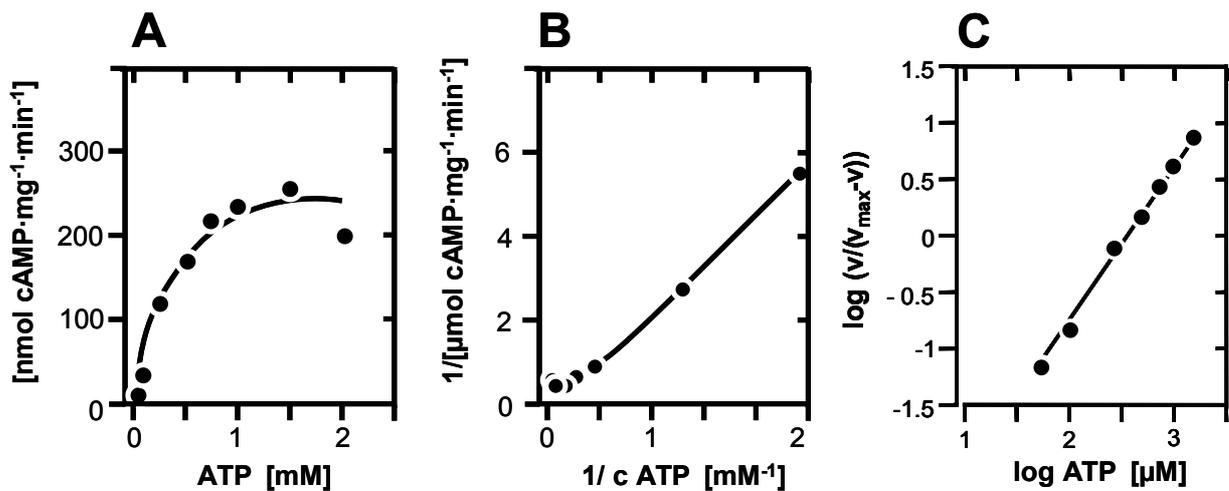


Abbildung 4-48: Substratabhängigkeit *Lipj*<sub>1-462</sub> (10 min, 37°C, TRIS/HCl pH 7.5, 0.05 - 2 mM ATP) Auftragung nach: A= Michaelis-Menten; B= Lineweaver-Burk; C= Hill-Plot, Geradengleichung:  $y = 1.4333x - 3.6743$ ;  $R^2 = 0.9949$

#### 4.6.10 Mögliche Aktivatoren

Da die N-terminale Domäne von *Lipj*<sub>1-462</sub> in allen bisherigen Tests praktisch keinen Einfluss gezeigt hat, wurden im AC-Test verschiedene Substanzen zugesetzt, um eventuell einen Hemmstoff oder Aktivator von *Lipj*<sub>1-462</sub> ausfindig zu machen. Zum einen ist in der Literatur beschrieben, dass ungefähr 30 % der Gene von *Mycobacterium tuberculosis* an der Synthese oder dem Metabolismus von Lipiden beteiligt sind (Cole et al., 1998); daher kamen Substanzen wie beispielsweise Palmitinsäure zum Einsatz. Bei der Auswahl der Substanzen wurde berücksichtigt, welchen physiologischen Bedingungen Mykobakterien in Phagosomen ausgesetzt sind (Russel, 2001), daher wurde die Wirkung von Nitroprussidnatrium oder Calcium untersucht. Sofern die getesteten Substanzen wasserlöslich waren, wurde die gemessene spezifische Aktivität [nmol cAMP·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>] mit einer Probe von *Lipj*<sub>1-462</sub> ohne jeglichen Zusatz verglichen; nicht-wasserlösliche Substanzen wurden in DMSO gelöst und maximal 1 μl dieser konzentrierten Lösungen pro Ansatz zugefügt, als Kontrolle diente eine Probe mit 1 μl DMSO. Nachfolgend ist gezeigt, um wie sich unter dem jeweiligen Zusatz ändert: man kann bei keiner der eingesetzten Zusätze eine signifikante Hemmung oder Aktivierung der spezifischen Aktivität von *Lipj*<sub>1-462</sub> feststellen (Tabelle 4-12).

**ERGEBNISSE**

<b>Zusatz</b>	<b>Spezifische Aktivität [nmol cAMP·mg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>]</b>	<b>Spezifische Aktivität ÷ Spezifische Aktivität[Kontrolle]</b>
[Kontrolle DMSO]	410	[1]
[Kontrolle ohne Zusatz]	220	[1]
CaCl <sub>2</sub> 100 µM	350	1.6
CaCl <sub>2</sub> 50 µM	280	1.3
Glucose 1 mM	340	1.5
Glucose 0.5 mM	300	1.4
K <sup>+</sup> 140 µM [K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	410	1.9
K <sup>+</sup> 70 µM [K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	350	1.6
Linolsäure 5 mM	330	0.8
Palmitinsäure 1 mM	250	0.6
Nitroprussidnatrium 1 mM	450	1.1
Nitroprussidnatrium 10 mM	290	0.7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 40 mM	570	1.4

**Tabelle 4-12:** Vergleich der spezifischen Aktivität des Holoenzym bei Zusatz verschiedener Substanzen (pH 7.5 Tris/HCl, 10min, 37°C, ATP 0.5 mM); gemessene counts: 10 000-100 000 cpm. Bei den Messungen für Nitroprussidnatrium und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde die Kontrolle mit DMSO bei der Berechnung zugrunde gelegt, da eine Kontrolle ohne Zusatz aufgrund einer zu hohen Proteinkonzentration im Test nicht auswertbar war. Keine der Substanzen bewirkt eine signifikante Hemmung oder Stimulierung.

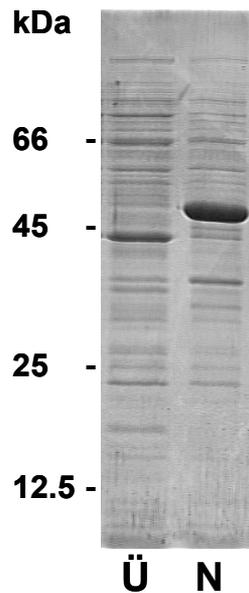
#### 4.6.11 Test auf Esterase- und Hydrolase-Aktivität

Da *Lipj* als mögliche Esterase annotiert wurde und geringe Ähnlichkeit zu bekannten Hydrolasen aufweist, wurde das gereinigte Holoenzym *Lipj*<sub>1-462</sub> auf Lipase- und Phosphatase-Aktivität getestet (s. 3.10.3). Beim Lipasetest mit p-Nitrophenylacetat als Substrat wurde mit gegen 50 mM Tris/HCl pH 7.5 dialysiertem Eluat aus der Proteinreinigung gearbeitet, da allein der imidazolhaltige Elutionspuffer bereits eine Gelbfärbung des Ansatzes verursacht. Als Positivproben dienten für Esterase-Tests *Staphylococcus hyicus*- Lipase, für Phosphatase-Tests *Alkalische Phosphatase*. Als Negativkontrolle wurde das entsprechende Volumen des Puffers zugegeben, in dem das Protein gelagert wurde. Tests galten als erfolgreich durchgeführt, wenn nach Ablauf der Reaktionszeit eine deutliche Farbänderung der Positivprobe bzw. keinerlei Farbänderung der Negativprobe feststellbar war.

Es konnte keine Esterase- oder Hydrolaseaktivität von *Lipj*<sub>1-462</sub> festgestellt werden.

#### 4.6.12 Mutante des Holoenzym: *Lipj*<sub>1-462</sub>C15A

Die Aminosäure Cystein ist durch Ausbildung von Disulfidbrücken oft wichtig für die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen. Vergleicht man die Sequenz von *Lipj* aus *M. tuberculosis* mit dem entsprechenden Gen in *M. smegmatis*, fällt ein einziges konserviertes Cystein im Bereich der N-terminalen Domäne auf: In *Lipj*<sub>1-462</sub> das Cystein an Position 15 (vgl. 7.3). Um zu überprüfen, ob diese Aminosäure für die partikulären Eigenschaften des Proteins in *E. coli* verantwortlich ist, wurde die Punktmutante *Lipj C15A* kloniert und in BL21(DE3)[pRep4] exprimiert. Nach Expression und Lyse wurde das Zellhomogenat (5 ml) durch Zentrifugation in lösliche (Überstand) und unlösliche (Niederschlag) Bestandteile getrennt. Auf dem SDS-PAGE kann man im aufgetragenen Überstand keine Proteinbande von *Lipj C15A* erkennen, im Niederschlag dagegen ist bei 51 kDa eine starke Expressionsbande zu sehen (Abbildung 4-49). Um zu überprüfen, ob auch die AC-Aktivität in dieser Fraktion zu finden ist, wurden 40 µl des Überstandes im Test vermessen, der Niederschlag wurde in 500 µl Tris/HCl resuspendiert und davon ebenfalls 40 µl getestet. Im Überstand wurden unter den üblichen Testbedingungen 2500 cpm gemessen, im Niederschlag dagegen über 400 000 cpm. Die Mutante C15A ist also AC-aktiv, wird aber ebenfalls in *E. coli* partikulär exprimiert. Es wurden keine Reinigungsversuche unternommen.



**Abbildung 4-49:** Signal Lipj C15A im Zentrifugationsniederschlag 3000xg bei 51 kDa, das Protein wird in *E. coli* wie *Lipj*<sub>1-462</sub> nicht löslich exprimiert. SDS-PAGE 12.5%, pro Spur ca. 20 µg Protein (Ü:Überstand, N:Niederschlag)

#### 4.6.13 Lipj ist auch in BCG nachweisbar

Der humane Impfstoff gegen Tuberkulose wird nicht aus *M. tuberculosis* gewonnen, sondern aus *M. bovis BCG*. Da es für *BCG* noch kein abgeschlossenes Genomprojekt gibt und somit die komplette Sequenz noch nicht verfügbar ist, sollte mittels PCR-Analyse überprüft werden, ob *Lipj* auch in *BCG* vorhanden ist. Dazu wurden PCR-Ansätze mit Primern für die katalytische Domäne (*Lipj* 2s und *Lipj*2as) und die N-terminale Domäne (*Lipj*1s und *Lipj*1as) verwendet; als „template“ diente genomische *BCG*-DNA (freundlicherweise vom Labor Dr. Boettger, Universität Zürich, zur Verfügung gestellt). Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit genomischer *M. tub.*-DNA inkubiert, als weitere Kontrolle diente ein Ansatz ohne „template“. Wie in der Abbildung des Agarosegels zu sehen, auf dem die Proben nach 20 Zyklen PCR aufgetragen wurden, konnte in beiden Ansätzen, katalytische und N-terminale Domäne, ein PCR-Produkt detektiert werden (Abbildung 4-50). Das Signal für die N-terminale Domäne wird wie berechnet bei ca. 1000 Basenpaaren erhalten, das Signal für die katalytische Domäne (500 Basenpaare) wird auf der selben Höhe wie die Kontrolle mit *M. tub.*-, „template“ detektiert. Das Gen für *Lipj* ist also auch im Impfstamm *M. bovis BCG* enthalten.

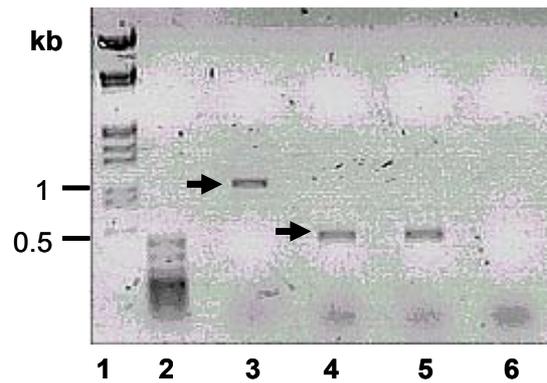


Abbildung 4-50:

Probenauftrag auf Agarosegel 1.5%: Spur 1:  $\lambda$ -Marker, 2:  $\pi$ -Marker, 3: PCR-Produkt (BCG-template) mit Primern Lipj1s/1as, 4: PCR-Produkt (BCG-template) Lipj 2s/2as, 5: Positivkontrolle (M. tub.-template), 6: Negativkontrolle (kein template)

#### 4.6.14 Der *Lipj*-Antikörper

Um die katalytische Domäne von *Lipj* im Western Blot oder bei Immunmarkierungen spezifisch nachweisen zu können, wurde ein Antikörper hergestellt. Dazu wurden 2x 7 mg gereinigte katalytische Domäne von *Lipj* an die Firma Biogenes geliefert: Ein Teil (7 mg gereinigtes Protein gegen 50 mM Tris/HCl, 10 % Glycerol dialysiert) diente der Immunisierung zweier Kaninchen, weitere 7 mg (50 mM Phosphatpuffer 1:1 pH 7.1, 10 % Glycerol) diente der Herstellung einer Affinitätssäule zur Reinigung der gewonnenen polyklonalen Kaninchen-IgG. Zur Kontrolle der Reinheit der verwendeten Proteine diente ein SDS-PAGE (Abbildung 4-51). Wie nachfolgend zu sehen, sind die verwendeten Proteine sauber gereinigt.

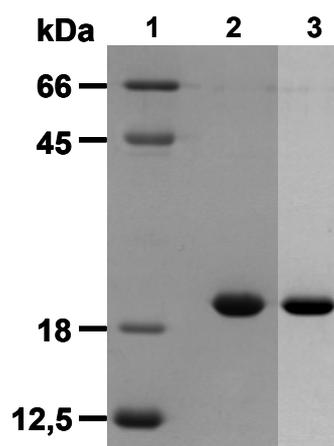


Abbildung 4-51:

SDS-PAGE 15%; Spur 1: Proteinmarker (12.5, 18, 45, 66 kDa), Spur 2: 2  $\mu$ g *Lipj*<sub>291-462</sub> in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 % Glycerol, Ni<sup>2+</sup>NTA-gereinigt; Spur 3: 2  $\mu$ g *Lipj*<sub>291-462</sub> in 50 mM Phosphatpuffer pH 7.1, 10 % Glycerol, Ni<sup>2+</sup>NTA-gereinigt

## ERGEBNISSE

---

Nach Immunisierung und Reinigung wurden von der Firma Biogenes folgende Komponenten geliefert:

- 2x spezifische IgG gereinigt: Anti-Lipj 4333 g (13.6 mg in 14 ml)  
Anti-Lipj 4334 g (14.6 mg in 11.3 ml)  
(nachfolgend als AK 33 und AK 34 abgekürzt)
- 2x Durchlauf Antiserum
- 2x 1.5 ml Präimmunserum
- 2x 2 ml Antiserum Kaninchen.

Zur Lagerung wurde ein Teil der erhaltenen IgG vorsichtig mit 50 % Glycerol gemischt und bei -20°C eingefroren, ein weiterer Teil wurde zu je 50 µl in Eppendorf-Cups aliquotiert und lyophilisiert. Die restliche Menge der gelieferten Anti-Lipj Antikörper wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### 4.6.15 Nachweisgrenze und Spezifität des Anti-Lipj-Antikörpers

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde ein Dot-Blot durchgeführt. Dazu wurden 0.1 – 100 ng gereinigte katalytische Domäne von *Lipj* auf eine PROTRAN<sup>®</sup>-Membran aufgetragen und mit verschiedenen Antikörperverdünnungen inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidasegekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Fc-Antikörper eingesetzt. Die Detektion der Signale erfolgte mittels *ECL-Plus*-Kit.

Nach 60 sec Belichtungszeit können mit den lyophilisierten IgG Anti-Lipj 33 (0.2 µg/ml), 33/2 (0.2 µg/ml), 33 (0.25 µg/ml) und 34/2 (0,25 µg/ml) noch ≤ 0.1 ng Protein detektiert werden (Abbildung 4-52). Von beiden Antikörpern wurden zwei Chargen lyophilisiert- 1. Lieferung AK 33 und 34, sowie 2. Charge nach Ausbluten der Tiere AK 33/2 und 34/2. Falls nicht anders erwähnt, wurden für Western Blots Lyophilisate von AK 34/2 verwendet (Rekonstitution der IgG in 50 µl Wasser).

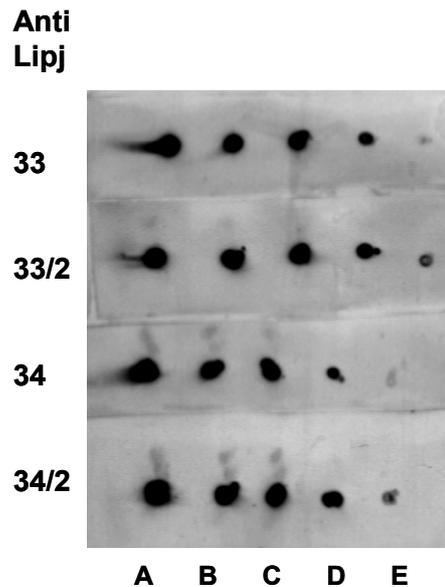


Abbildung 4-52:

Nachweisgrenze der Anti-Lipj-Antikörper, Dot Blot.

Antikörperkonzentrationen: AK 33: 0.2 µg/ml, AK 33/2: 0.2 µg/ml, AK 34: 0.25 µg/ml, AK 34/2: 0.25 µg/ml. Proteinkonzentrationen

(*Lipj*<sub>291-462</sub> gereinigt) A: 100 ng, B: 10 ng, C: 5 ng, D: 1 ng, E: 0.1 ng.

Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurden Western Blots mit allen bekannten und exprimierten mykobakteriellen Adenylatcyclasen durchgeführt. Da teilweise gereinigte Proteine, aber auch Zellhomogenate mit exprimiertem Protein eingesetzt wurden, kann gleichzeitig überprüft werden, ob mit Anti-Lipj auch Proteine aus *E. coli* erfasst werden. Nachfolgende Abbildungen zeigen, dass nach Western Blot und ECL-Plus-Entwicklung nur Signale von *Lipj*<sub>291-462</sub> bzw. dem *Lipj*-Dimer erhalten werden. Mit Anti-Lipj 34/2 kann die katalytische Domäne also spezifisch nachgewiesen werden (Abbildung 4-53).

## ERGEBNISSE

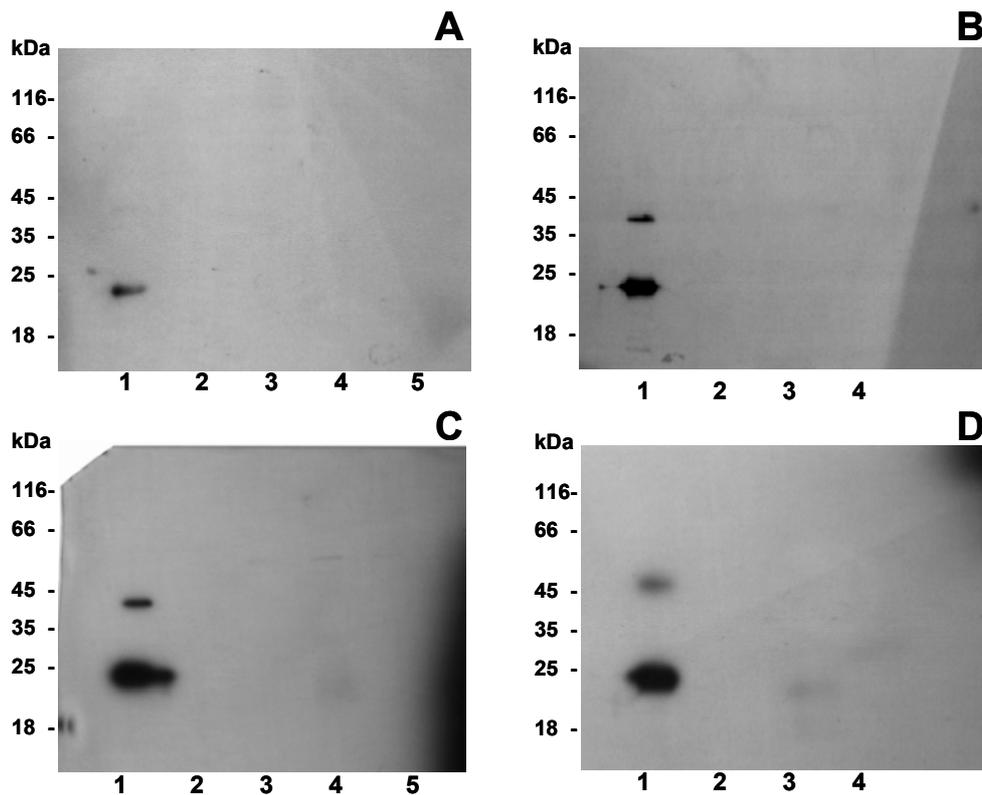


Abbildung 4-53: Western Blots zur Spezifität von Anti-Lipj 34/2 (0.13 µg/ml) mit Proteinen aller 15 mykobakteriellen ACs :

AC	Konstrukt	Proben-aufbereitung	Molekular-gewicht (kDa)	aufgetragene Proteinmenge (µg)	Abbildung/Spur
Rv1900c (Lipj)	Katalytische Domäne	gereinigt	20	0.7	A1;B1;C1;D1
Rv0891	Holoenzym	Zellhomogenat	33	20	A2
Rv1647	Holoenzym	Zellhomogenat	37	20	A3
Rv1358	Katalytische Domäne	Zellhomogenat	29	20	A4
Rv2488	Katalytische Domäne	Zellhomogenat	29	20	A5
Rv1359	Holoenzym	Zellhomogenat	28	20	B2
Rv1264	Holoenzym	gereinigt	43	1	B3
Rv1625c	Holoenzym	gereinigt	47	1.5	B4
Rv1318c	Holoenzym	Zellhomogenat	60	20	C2
Rv1319c	Holoenzym	Zellhomogenat	60	20	C3
Rv1320c	Holoenzym	Zellhomogenat	60	20	C4
Rv3645c	Holoenzym	Zellhomogenat	60	20	C5
Rv0386	Katalytische Domäne	gereinigt	20	2	D2
Rv2212	Katalytische Domäne	gereinigt	20	2	D3
Rv2435c	Katalytische Domäne	gereinigt	25	2	D4

#### 4.6.16 Detektion von *Lipj* in *E. coli*

Um *Lipj* in *E. coli* detektieren zu können, wurde eine Immunogoldmarkierung mit anschließender Elektronenmikroskopie mit Unterstützung von Dr. H. Schwarz, MPI Tübingen, durchgeführt. Ziel war es festzustellen, ob *Lipj*<sub>1-462</sub> im periplasmatischen Raum lokalisiert ist (vgl. 4.6.5) und Hinweise auf die partikulären Eigenschaften des Holoenzym zu erhalten.

Dazu wurden die isolierte katalytische Domäne und das Holoenzym *Lipj*<sub>1-462</sub> in BL21-Zellen exprimiert, als Negativkontrolle diente der Expressionsvektor pQE30 in derselben Zelllinie. Die Kulturen wurden mit 60 µM IPTG induziert, die Expression erfolgte bei Raumtemperatur über 3.5 h. Alle Kulturen wurden in zeitlichem Abstand von 30 Minuten induziert, da pro Kultur ungefähr eine halbe Stunde zur Kryofixierung benötigt wird. Die Expression wurde im selben zeitlichen Abstand durch Abkühlen der Kulturen auf 4°C gestoppt, alle Zellen befinden sich also zum Zeitpunkt des Einfrierens etwa im selben Stadium. Von allen 3 Kulturen wurde ein Teil direkt kryofixiert; alternativ wurde mit je 1 ml Kultur eine Plasmolyse mit anschließender Glutaraldehydfixierung durchgeführt. Dass die Proteine tatsächlich in ausreichender Menge und aktiv exprimiert wurden, stellten Kontrollen mittels SDS-PAGE (Abbildung 4-54) und AC-Assay sicher (je 40 ml Zellhomogenat im AC-Test, 37°C, 10 min, Tris/HCl-Puffer pH 7.5, ohne regenerierendes System; *Lipj*<sub>1-462</sub>: 17% Umsatz; *Lipj*<sub>291-462</sub>: 98% Umsatz; Kontrolle pQE30: Umsatz kleiner als doppelter Leerwert).

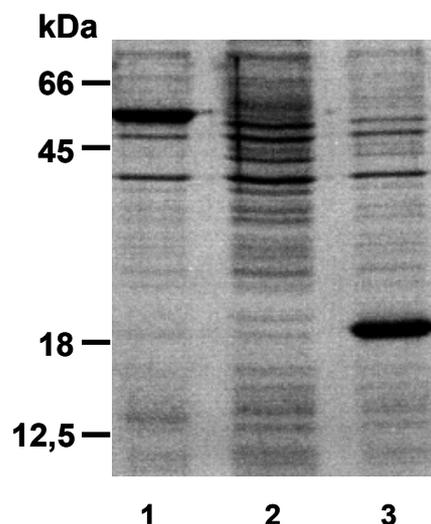


Abbildung 4-54:

SDS-PAGE 15% Expressionskontrolle für Ultradünnschnitte; je 10 µl Expressionskultur mit 5 µl 4xProbenpuffer versetzt, 5 min 95°C.  
 Spur 1: *Lipj*<sub>1-462</sub> (51 kDa), Spur 2: Kontrolle pQE30, Spur 3: *Lipj*<sub>291-462</sub> (20 kDa).

## ERGEBNISSE

Zuerst wurden Ultradünnschnitte von *Lipj*<sub>291-462</sub>, *Lipj*<sub>1-462</sub> und der Kontrolle ohne Immunmarkierung unter dem Elektronenmikroskop betrachtet (Abbildung 4-55). In allen drei Proben ergaben sich keine Hinweise auf eine Lokalisation von überexprimiertem Protein im periplasmatischen Raum. Die Abbildungen zeigen weiterhin, dass *Lipj*<sub>1-462</sub> in großen Mengen exprimiert wurde, Größe und Form der überexprimierten Proteinmenge deuten auf „inclusion bodies“ (A: große, zusammenhängende Proteinansammlungen) hin. *Lipj*<sub>291-462</sub> dagegen zeigt das typische Erscheinungsbild eines löslichen Proteins, das im Cytosol der Zelle exprimiert wurde (C: viele, kleinere Proteinansammlungen, im Cytosol der Zelle verteilt). Die Kontrolle zeigt keine Hinweise auf überexprimiertes Protein in der Zelle (B).

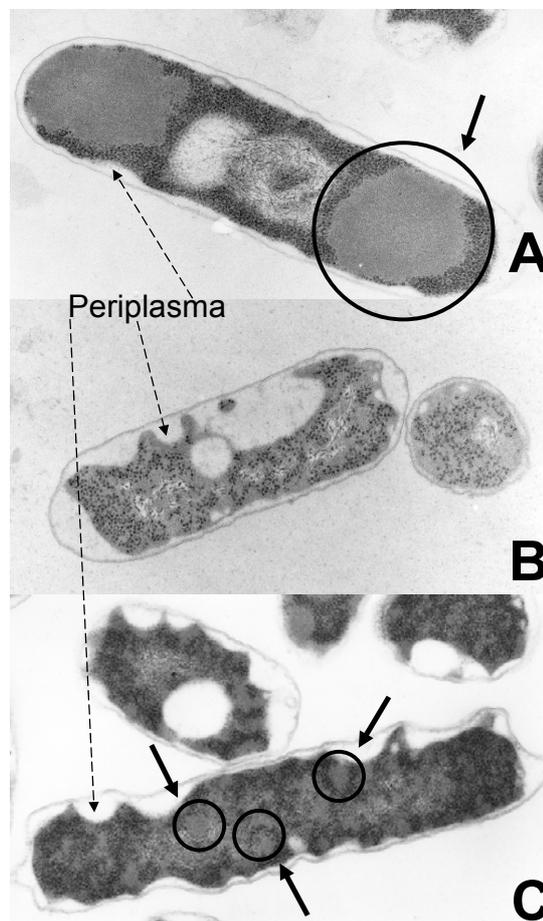


Abbildung 4-55:

Ultradünnschnitte im Elektronenmikroskop ohne Immunmarkierung. Figur A: *Lipj*<sub>1-462</sub>: partikuläres Protein; große, zusammenhängende Proteinansammlungen (→○), Hinweis auf „inclusion bodies“. Figur B: Kontrolle Leervektor pQE30, kein Hinweis auf überexprimiertes Protein. Figur C: *Lipj*<sub>291-462</sub>: kleinere, im Cytosol verteilte Proteinansammlungen (→○), Hinweis auf ein lösliches Protein. In allen drei Proben kein Hinweis auf ein überexprimiertes Protein im periplasmatischen Raum der Zelle (----->). Alle Proben sind mit Glutaraldehyd fixiert.

An den von Dr. H. Schwarz hergestellten Ultradünnschnitten der Proben von *Lipj*<sub>1-462</sub> und *Lipj*<sub>291-462</sub> wurde eine Immunogoldmarkierung mit Anti-Lipj-Antikörper 33 (2 µg/ml in PBG) durchgeführt und mittels Elektronenmikroskopie ausgewertet (Abbildung 4-56). Diese Aufnahmen bestätigen, dass *Lipj*<sub>291-462</sub> als lösliches Protein im Cytosol exprimiert wurde, *Lipj*<sub>1-462</sub> jedoch in großen „inclusion bodies“- dies erklärt die partikulären Eigenschaften des Proteins. Auch in diesem Experiment fand sich kein Hinweis auf eine Lokalisation von *Lipj* im periplasmatischen Raum.

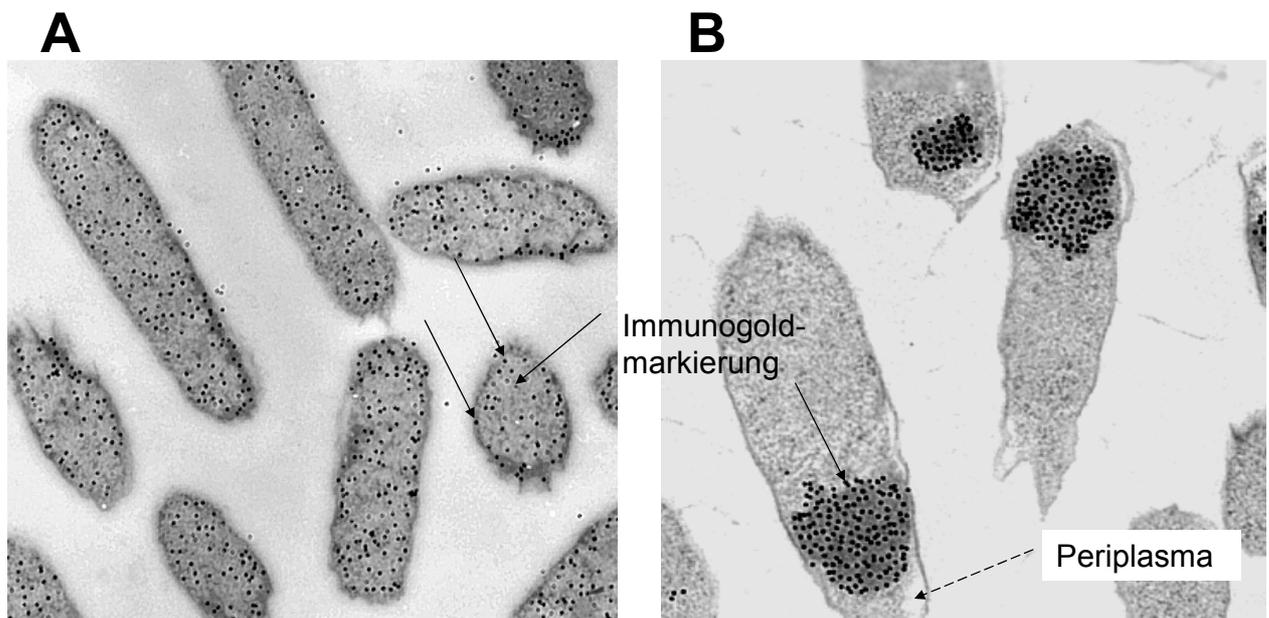


Abbildung 4-56:

**Immunogoldmarkierung *Lipj***

**Figur A: *Lipj*<sub>291-462</sub>; lösliches Protein im Cytosol (→Immunogold)**

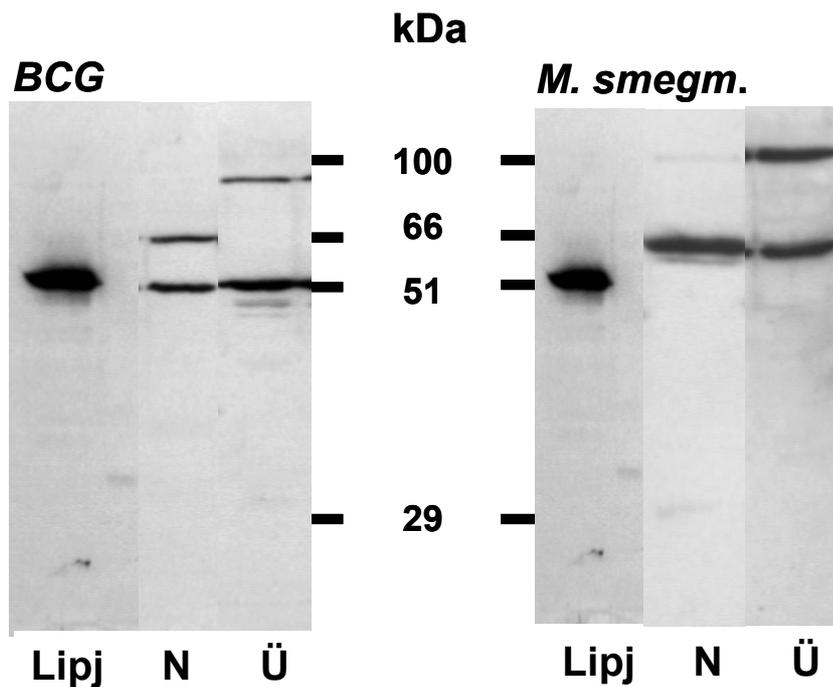
**Figur B: *Lipj*<sub>1-462</sub>; partikuläres Protein in „inclusion bodies“ (→Immunogold). Kein Hinweis auf Lokalisation im periplasmatischen Raum (----→ Periplasma).**

#### 4.6.17 Detektion von *Lipj* in *M. smegmatis* und *BCG*

Mit mycobakteriellen Zellen aus dem Labor Dr. Boettger, Zürich sollte mittels Western Blotting überprüft werden, ob das Protein *Lipj* auch in *BCG*-Zellen detektiert werden kann - die PCR-Analyse (s. 4.6.13) zeigte bereits, dass das Gen für *lipj* in *BCG* vorhanden ist. Ebenfalls untersucht wurden *M. smegmatis*-Zellen: im Alignment (*M. tub.* vs *M. smegm.*, s. 7.3) wird deutlich, dass in *M. smegmatis* ein Gen mit Ähnlichkeit zu *lipj* vorhanden ist. Dazu wurden je 50 ml Zellkultur nach drei Tagen Inkubationszeit zentrifugiert (5000xg, 10 min). Die

## ERGEBNISSE

Zellniederschläge wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend in 3 ml Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5) resuspendiert. Nach Zellyse durch French-Press-Aufschluss wurden je 1 ml der Zellhomogenate zentrifugiert (20 000xg, 30 min) und in lösliche (Überstand) und unlösliche Bestandteile (Niederschlag) getrennt. Die Proben wurden mittels Western-Blot-Analyse mit spezifischem Anti-Lipj-Antikörper untersucht. Nachfolgende Abbildung zeigt ein klares Signal in *BCG*-Zellen auf der Höhe von *Lipj*<sub>1-462</sub> (51 kDa); des Weiteren wird im Zentrifugationsniederschlag ein Protein von ca. 66 kDa und im Überstand ein weiteres bei ca. 100 kDa detektiert (Abbildung 4-57). In *M. smegm.* wird kein Signal auf der Höhe von *Lipj*<sub>1-462</sub> erhalten, allerdings werden auch hier Proteine von 66 bzw. 100 kDa erfasst. *Lipj*<sub>1-462</sub> wird also in *BCG*-Zellen exprimiert, welche weiteren Proteine in beiden Zelllinien durch den spezifischen Anti-Lipj-Antikörper noch miterfasst wurden ist unsicher; eventuell typische Überstands- bzw. Niederschlagsproteine, die beim Zentrifugationsschritt nicht komplett getrennt wurden.



**Abbildung 4-57:** Western-Blot-Analyse mit *BCG*- und *M. smegmatis*-Zellen. 10 Sekunden Belichtungsdauer, spezifischer Anti-Lipj-Antikörper AK 34/2 (0.6 µg/ml); (rechts: *BCG*-Zellen, links: *m.smegm.*-Zellen, jeweils mit Kontrolle *Lipj*<sub>1-462</sub> gereinigt 0.1 µg (*Lipj*); Zentrifugationsniederschlag (*N*) und Überstand (*Ü*) nach Zellyse und Zentrifugation (20 000xg). Das Molekulargewicht der Proteine wurde über *peqGold*-Proteinmarker ermittelt.

## 4.7 Die Kristallstruktur von *Lipj*

Alle Arbeiten zur Kristallstruktur wurden von PD Dr. Jürgen Linder, Tübingen, Dr. Sangita Sinha / Dr. Steven Sprang, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA durchgeführt. Die folgenden Informationen und Abbildungen wurden freundlicherweise vor Veröffentlichung von Dr. Sprang zur Verfügung gestellt. Es gelang, sowohl *Lipj* ohne Substrat (2.2 Å Auflösung), sowie Protein mit dem Substratanalogon AMPCPP (2.6 Å) zu kristallisieren. In beiden Fällen handelt es sich um Dimere, die im Vergleich zu bereits gelösten AC-Kristallstrukturen räumlich relativ weit von einander getrennt sind und somit wenig Berührungspunkte zwischen den einzelnen Dimeren zeigen. Aus der bisher ermittelten Struktur zeigt sich, dass auch in *Lipj* eine ähnliche Sekundärstruktur wie in Mammalia AC vorliegt. In beiden existiert das so genannte „palm“ (Handflächen) Motiv, eine bestimmte Abfolge von  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ ). Außerdem zeigt die Elektronendichteverteilung, dass die beiden metallbindenden Aspartate (Position 302/346) sehr nahe am Substratanalogon lokalisiert sind: Dies unterstreicht die Ergebnisse aus der Mutationsanalyse (beide Aspartate essentiell für Katalyse als AC). Auch in der Kristallstruktur findet sich kein Hinweis darauf, dass N342 und H402 an der Katalyse beteiligt sind; eventuell können auch Bindungen über das Peptidrückgrat eine Rolle spielen (s. auch DISKUSSION).

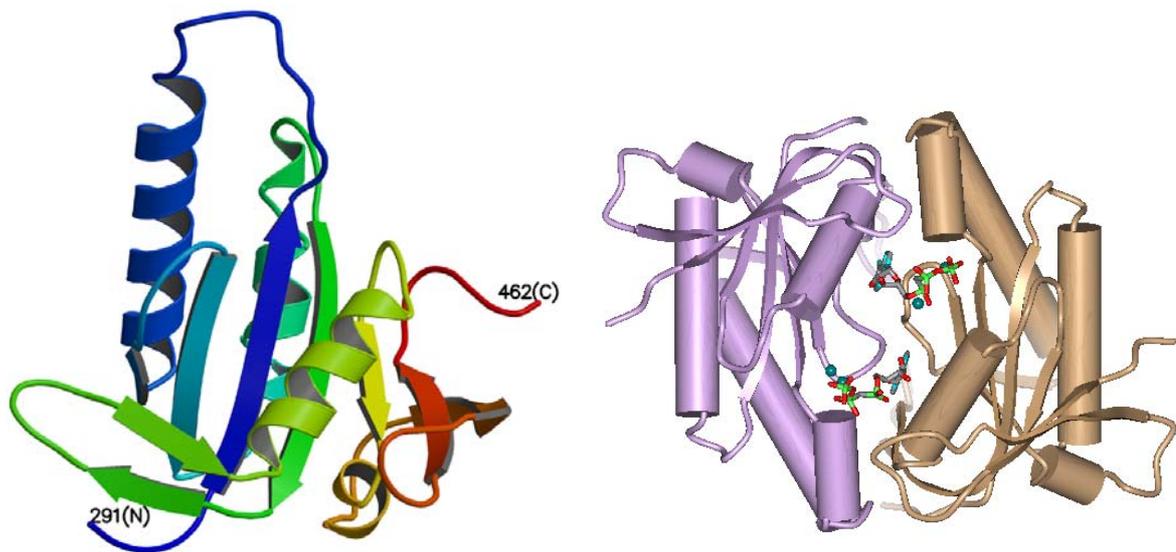


Abbildung 4-58:

Kristallstruktur *Lipj*

rechts: *Lipj*<sub>291-462</sub>, Monomer

links: *Lipj*<sub>291-462</sub>, Dimer mit einmodelliertem Substrat ATP und je 2 Mangan-Ionen

## 5 DISKUSSION

Ziel der Arbeit war, nach Klonierung und Expression von Rv1900c festzustellen, ob *Lipj* trotz gravierender Abweichungen in den kanonischen Aminosäuren als Adenylatcyclase die Umsetzung von ATP zu cyclischem AMP katalysiert. Nachdem Adenylatcyclaseaktivität festgestellt wurde, sollte das Enzym charakterisiert und über verschiedene Mutationsanalysen, auch im Vergleich zur Kristallstruktur von *Lipj*, der Katalysemechanismus des Enzyms untersucht werden. *Lipj*<sub>1-462</sub> zeigt im Sequenzvergleich neben der C-terminalen AC-Domäne N-terminal eine weitere Domäne, die eine mäßige Ähnlichkeit zu Hydrolasen und Lipasen aufweist. Es wurde untersucht, ob diese Domäne einen Einfluss auf die Adenylatcyclasedomäne hat und ob Hydrolase- oder Lipaseaktivität nachweisbar ist.

### 5.1 Charakterisierung der katalytischen Domäne von *Lipj*

*Lipj*<sub>253-462</sub> ließ sich gut in *E. coli* exprimieren und war mittels Ni<sup>2+</sup>NTA-Affinitätsreinigung schnell sehr sauber zu gewinnen. Trotz zweier Austauschungen in den kanonischen Aminosäuren konnte eine Aktivität als Adenylatcyclase festgestellt werden, die im Vergleich zu anderen mycobakteriellen ACs mit einer  $v_{\max}$  von 1.7  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  im oberen Bereich liegt. Insgesamt finden sich im Genom von *M. tuberculosis* 15 offene Leserahmen für Adenylatcyclasen (McCue et al., 2000), für neun davon ließ sich bis heute Adenylatcyclaseaktivität nachweisen. Lediglich vier davon sind in allen sechs kanonischen Aminosäuren konserviert, in allen anderen finden sich bis zu vier veränderte Reste. Sie wurden von Drs Y. Guo, J. Linder, J. Weber, A. Hammer, L. Castro und A. Abdel-Motal, S. Zeitz untersucht.

In allen Klasse III-Adenylatcyclasen ist ein Metall-Cofaktor für die Katalyse essentiell. Proteinbiochemische Versuche und bekannte Kristallstrukturen beweisen gleichermaßen, dass das eigentliche Substrat der ACs ein Komplex aus ATP und zwei  $\text{Me}^{2+}$ -Ionen ist, die mit zwei Aspartatresten im katalytischen Zentrum interagieren (Hurley 1999; Tesmer et al., 1999). Bei den meisten Adenylatcyclasen wird mit Mangan als Cofaktor eine wesentlich höhere Aktivität gemessen als unter Zusatz von Magnesium (Hurley, 1999; Kasahara et al., 1997). Bei *Lipj* konnte ausschließlich mit Mangan als Cofaktor AC-Aktivität festgestellt werden,  $\text{Mn}^{2+}$  ist also

essentiell für die Katalyse. Sowohl die Kristallstruktur von *Lipj*<sub>253-462</sub> auch die biochemischen Experimente zeigen, dass zwei Kationen an der Katalyse beteiligt sind.

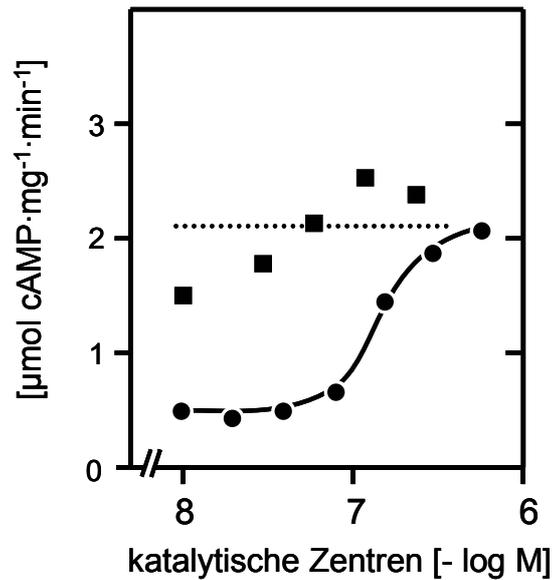
Bei der mit dem Substratanalogen AMPCPP erhaltenen Kristallstruktur finden sich zwei Mangan-Ionen im katalytischen Zentrum (s. auch Abbildung 4-58). Kinetische Messungen und die ermittelte Manganabhängigkeit zeigten, dass mit steigender ATP-Konzentration die  $Mn^{2+}$ -Konzentration so angepasst werden musste, dass die Konzentration an freiem Mangan immer 3 mM betrug, andernfalls verringerte sich die spezifische Aktivität.

Physiologisch weniger bedeutsam sind die *in vitro* ermittelten pH- und Temperaturoptima. Bei *Lipj* zeigt sich kein klares pH-Optimum, vielmehr ist die Aktivität in einem Bereich von ca. pH 6-8 am höchsten, der Einfluss der jeweiligen Puffersubstanz ist dabei offensichtlich relativ stark. Das gemessene Temperaturoptimum von 45°C liegt ungewöhnlich hoch, da *Mycobacterium tuberculosis* als Humanpathogen gewöhnlich einer Körpertemperatur von 37°C ausgesetzt ist. Der gemessene Wert für die Aktivierungsenergie lag mit 73 kJ/Mol·K für die katalytische Domäne in dem für Adenylatcyclasen typischen Bereich (Tang und Hurley, 1998).

In Klasse III Adenylatcyclasen wird die katalytische Tasche normalerweise aus zwei Proteindomänen gebildet (Tang and Gilman, 1995). Kristallstruktur und proteinbiochemische Experimente zeigten für Säuger-ACs, dass ein Heterodimer aus zwei ähnlichen Domänen ausgebildet wird (Tesmer et al., 1997 und 1999; Zhang et al., 1997). In bakteriellen Adenylatcyclasen können dagegen Dimere aus zwei identischen Domänen ausgebildet werden, man spricht dann von Homodimeren (Guo et al., 2001; Kanacher et al., 2002).

Dass auch *Lipj* unter Ausbildung von Homodimeren die Bildung von cAMP katalysiert, zeigt zum einen die nicht lineare Proteinabhängigkeit des Wildtyps. Mit zunehmender Proteinkonzentration erhöhte sich die gemessene spezifische AC-Aktivität um das Dreifache. Im Westernblot wird mit spezifischem Antikörper gegen die katalytische Domäne von *Lipj* neben einem Signal für das Monomer auch ein Dimer nachgewiesen.

Ein weiterer Hinweis ist die veränderte Proteinabhängigkeit des verknüpften Konstruktes *Lipj* CLC. Werden zwei Monomere über einen 14-Aminosäuren-Linker fest miteinander verbunden, ist die spezifische Aktivität praktisch unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und liegt bei geringer Proteinmenge in einem wesentlich höheren Bereich als beim Wildtyp (Abbildung 5-1).



**Abbildung 5-1:** Vergleich der Proteinabhängigkeiten Lipj CLC (■) und Lipj<sub>291-462</sub> (●). (10 min, 37°C, 0.5 M ATP; 5-600 nM gereinigte Proteine; es wird die Konzentration an katalytischen Zentren im Test angegeben).

Die Komplementation von zwei inaktiven Mutanten R406A und D302A zu 70 % der Wildtyp-Aktivität liefert einen weiteren Beweis dafür, dass *Lipj* als Homodimer arbeitet. Der positive Hill-Koeffizient von 1.2 weist auf ein leicht kooperatives Verhalten des Enzyms hin.

## 5.2 Struktur und Katalysemechanismus in *Lipj* sind neuartig

Üblicherweise sind für die Katalyse bei ACs sechs kanonische Aminosäuren essentiell. Zwei Aspartatreste zur Bindung des Metall-Cofaktors, ein weiteres Aspartat und ein Lysinrest zur spezifischen Bindung des Substrates ATP und, zur Stabilisierung des Übergangszustandes, die Aminosäuren Asparagin und Arginin. Dieses Muster zeigen zum Beispiel Säuger-Adenylatcyclasen, aber auch die mycobakteriellen ACs Rv1625c, Rv1264 oder Rv2212, die alle aktiv sind. Bei Klasse IIIb- und IIIc-Adenylatcyclasen finden sich allerdings häufig Austausche an diesen sechs Aminosäurepositionen. Im Bereich der substratspezifizierenden Aminosäuren zeigt sich eine große Variabilität, weniger verbreitet sind Austausche im Bereich der Aminosäuren für die Katalyse und eher selten bei den metallbindenden Aminosäureresten

(Linder und Schultz, 2003). Beispiele hierfür sind die mycobakteriellen Adenylatcyclasen Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c, Rv3645 oder Rv0386.

In *Lipj* weichen zwei Aminosäuren von diesem Schema ab:

- Anstelle von Asparagin findet man in *Lipj* einen Histidinrest (**H402**)
- Statt des substratspezifizierenden Lysins ist hier ein Asparagin (**N342**) vorhanden,

dennoch ist *Lipj* eine Adenylatcyclase mit einer relativ hohen Aktivität.

In der folgenden Abbildung wurde das aus der Kristallstruktur bekannte Modell des katalytischen Zentrums einer Mammalia AC auf *Lipj* übertragen: Dazu wurden die in einer Säuger-AC vorhandenen Aminosäurereste einfach durch die jeweiligen Aminosäuren in *Lipj* ersetzt, die im Sequenzvergleich die gleiche Position im Protein einnehmen. Nachfolgend soll diskutiert werden, in wieweit dieses Modell auf die katalytische Domäne von *Lipj* übernommen werden kann bzw. ob der bekannte Katalysemechanismus auch hier zugrunde liegt.

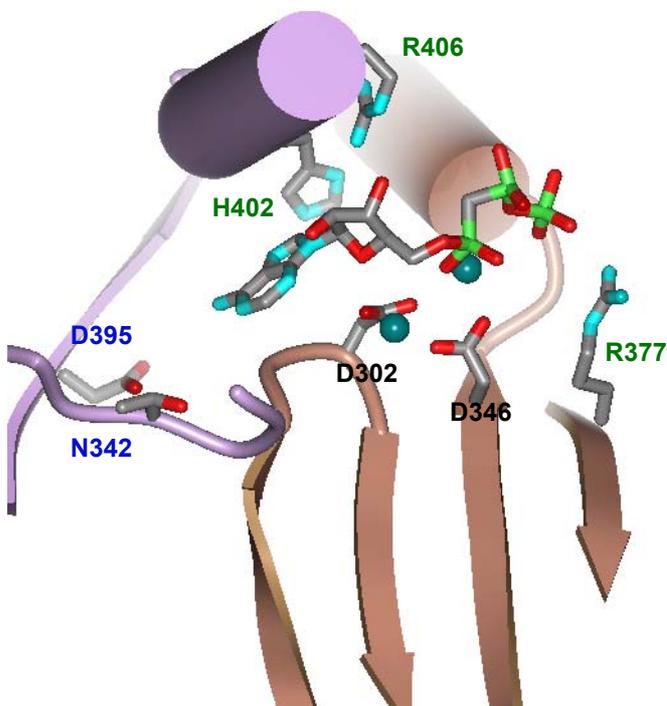


Abbildung 5-2: Modell des katalytischen Zentrums von *Lipj* mit gebundenem ATP und 2 Metallionen, modifiziert nach Dr. S. Sprang, Dallas (Vortrag in Tübingen, März 2004)

Dass diese sechs Aminosäuren für Adenylatcyclaseaktivität unbedingt vorhanden sein müssen, wurde für eine lösliche Mammalia AC beispielsweise von Tesmer et al., 1997, bewiesen, für die mycobakterielle AC Rv1264 von J. Linder et al., 2002. Austausch dieser Aminosäuren zu Alanin führten bei beiden Enzymen zu starker Abnahme oder Verlust der AC-Aktivität. Bei *Lipj* zeigten diese so genannten Alaninscreens allerdings stark unterschiedliche Auswirkungen.

Wie durch Mutationsanalyse gezeigt, spielt Position H402 keine wichtige Rolle bei der Katalyse. Weder eine Mutation von **H402** zu Alanin noch zum kanonischen Asparagin brachte eine nennenswerte Veränderung der kinetischen Parameter oder der Substratspezifität. Auch die Daten aus der Kristallstruktur ergaben keinen Hinweis auf die Beteiligung der Position H402 an der Umsetzung des Substrats. Bekanntermaßen basiert die Stabilisierung des Übergangszustandes in Klasse III Adenylatcyclasen nicht auf Asparagin allein, sondern auf einem Asparagin-/ Arginin -Paar. Wird nun das kanonische Arginin, in *Lipj* **R406**, zu Alanin mutiert, zeigt sich eine starke Auswirkung auf die Aktivität:  $v_{\max}$  von R406A beträgt nur noch 8% im Vergleich zum Wildtyp. Alle anderen Parameter sind weniger stark verändert, es handelt sich also wie erwartet um eine Mutante, die vor allem in ihrer Umsatzgeschwindigkeit beeinflusst wird. Dies bestätigt die aus dem Modell vorhergesagte entscheidende Rolle von R406 bei der Stabilisierung des Übergangszustandes. Die Mutanten **K442A** und **R377A** sollten weiterhin zeigen, ob auch diese Positionen eine Rolle in der Bindung des Pyrophosphat-Restes spielt. In Mammalia AC wird Pyrophosphat über  $Mg^{2+}$  und drei Aminosäurereste positioniert: Arg484, Arg1029 und Lys1065 (Tesmer et al., 1997). Alle drei Positionen sind auch in *Lipj* entsprechend konserviert (R484 in Mammalia entspricht in *Lipj* R377, Mammalia R1029 entspricht in *Lipj* R406, K1065 entspricht in *Lipj* K442). Eine Veränderung in den kinetischen Parametern von R377A, insbesondere die Reduktion von  $v_{\max}$ , deutet darauf hin, dass auch dieses Arginin in gleicher Weise an der Bindung des Pyrophosphat-Restes beteiligt ist. Auch die reduzierte relative GC-Seitenaktivität beider Mutanten (K442A und R377A) weist darauf hin, dass diese Aminosäurereste ihre konservierte Funktion bewahrt haben

Weder die Mutation von **N342** zu Alanin noch zum kanonischen Lysin führt zu einer gravierenden Änderung der Adenylatcyclase-Aktivität. Die Substratspezifität erhöhte sich bei der Mutante N342K geringfügig. Während beim Wildtyp eine relative GC-Seitenaktivität von 7% gemessen wurde, konnte durch die Einführung des kanonischen Lysins nur noch 1% Seitenaktivität festgestellt werden. Dagegen führt eine Mutation zum in Guanylatcyclasen kanonischen Glutamat zu einer Verringerung der spezifischen AC-Aktivität, sowie zu einer

erhöhten GC-Seitenaktivität von 30%. Lysin (N342K) verringert offensichtlich die Spezifität für das Substrat GTP, während ein Austausch zum in Guanylatcyclasen konservierten Glutamat (N342E) eine erhöhte Spezifität für GTP verursacht.

Ein Lysin an Position 342 ist also nicht essentiell für die Katalyse als Adenylatcyclase, erhöht aber offensichtlich die Fähigkeit des Enzyms, zwischen ATP und GTP als Substrat zu differenzieren.

Eine weitere Aminosäure, die aufgrund des bekannten Modells an der Substratbindung beteiligt sein soll, ist ein Aspartat an Position 395 (**D395**). Dieses Aspartat ist auch in *Lipj* konserviert, allerdings findet sich in der Kristallstruktur kein eindeutiger Hinweis darauf, dass dieser Rest tatsächlich an der Bindung von ATP in der katalytischen Tasche beteiligt ist. Dies wird durch die Ergebnisse aus der Mutationsanalyse klar bestätigt. Eine Mutation nach Alanin (D395A) verursachte weder eine Verringerung der AC-Aktivität, noch eine Veränderung der relativen Seitenaktivität als Guanylatcyclase. Im Gegensatz zu den klassischen Klasse III-Adenylatcyclasen zeigte die Mutante *Lipj* D395A eine signifikant höhere Substrataffinität ( $SC_{50}$  80  $\mu$ M) und ist bereits bei niedrigen Proteinkonzentrationen hochdimerisiert. Sogar die Doppelmutante N342A/D395A, in der beide substratspezifisierenden Aminosäuren durch Alanin ersetzt sind, zeigt keine Veränderung in den kinetischen Parametern.

Um festzustellen, ob die Rolle des kanonischen Lysins eventuell durch eine andere Aminosäure in nächster Nähe zu N342 übernommen wird, wurden in dieser Schleife weitere Reste einzeln zu Alanin mutiert. Die Untersuchung der Mutanten **E340A**, **T343A**, **V341A** sowie **F348A** ergab allerdings keine Auffälligkeiten in den kinetischen Parametern, lediglich bei E340A ergab sich eine interessante Änderung. Die Proteinabhängigkeit des Proteins zeigt, dass diese Mutante hochdimerisiert ist. Allerdings darf man hier auch nicht vernachlässigen, dass es sich um *in vitro*-Daten bei einem pH-Wert von 8.1 handelt, unter physiologischen Bedingungen sind Mykobakterien in Makrophagen und Lysosomen aber einem deutlich sauren Milieu ausgesetzt.

Welche Aminosäuren in *Lipj* anstelle der bekannten kanonischen Aminosäuren Lys bzw. Asn deren Rolle übernehmen, bleibt unklar; aufgrund der durchgeführten Alaninscreens und der Kristallstruktur ist es am wahrscheinlichsten, dass nicht einzelne spezielle Aminosäuren wie in Mammalia ACs diese Aufgabe in *Lipj* übernehmen, sondern auch Bindungen eine Rolle spielen, die über das Peptidrückgrat gebildet werden. Nicht zuletzt könnten auch die verkürzten „Armregionen“ (s. Einleitung) des Proteins zu einer veränderten Bindung des Purinringes in der katalytischen Tasche beitragen. Aus diesen Daten kann man schließen, dass Substratbindung und

## DISKUSSION

---

–spezifizierung in *Lipj* nach einem neuartigen Mechanismus verlaufen, der sich stark von dem unterscheidet, was bis jetzt über die Katalyse von Adenylatcyclasen bekannt ist.

Untersucht man dagegen die Aminosäuren **D302 und D346**, die laut Modell essentiell für die Bindung des metallischen Cofaktors sind, zeigt *Lipj* ein klassisches Erscheinungsbild. Einzelne Austausche zu Alanin in diesen beiden Positionen (D302A und D346A) führen zum völligen Verlust der AC-Aktivität. Schon eine Veränderung der Seitenkette um eine CH<sub>2</sub>-Gruppe ruft eine drastische Reduzierung der Aktivität hervor: Eine Mutation an Position 302 von Aspartat nach Glutamat bewirkt eine Verringerung um den Faktor 1000. Dass eine Fehlfaltung der Proteine ausgeschlossen werden kann, beweisen die oben beschriebenen Komplementationsversuche; Rekonstitution zweier komplementärer und inaktiver Mutanten wurde bereits in der Literatur beschrieben (Guo et al., 2001; Kanacher et al., 2002).

Von den sechs so genannten kanonischen Aminosäuren scheinen also drei ihre klassische und somit für die AC-Katalyse essentielle Funktion beibehalten zu haben. Zwei Aspartatreste, D302 und D346, sind essentiell für die Bindung des Cofaktors Mn<sup>2+</sup>, R406 für die Stabilisierung des Übergangszustandes. N342 und D395 scheinen dagegen keine entscheidende Rolle bei der Bindung des Substrates ATP zu spielen, H402 zeigt ebenfalls keinerlei Einfluss auf die katalytische Funktion dieser Adenylatcyclase.

Auch die Untersuchung der Mutante E386A, die aufgrund von vorläufigen Kristallisationsdaten kloniert und exprimiert wurde, zeigt keine auffälligen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp.

Um den Reaktionsmechanismus näher zu untersuchen, wurde der Effekt des p-site-Inhibitors 2',3'-AMP auf die katalytische Domäne von *Lipj* untersucht. P-site-Inhibitoren enthalten einen Purinring und können daher in die katalytische Tasche von Adenylatcyclasen binden. Dort werden sie nicht umgesetzt, sondern blockieren kompetitiv die Abgangsstelle des Produktes cAMP und wirken somit hemmend (Dessauer u. Gilman, 1997; Hurley, 1999; Tesmer et al., 2000). Die Aktivität von *Lipj* wurde durch Zusatz von 1 mM 2',3'-AMP auf ein Drittel herabgesetzt. Säugeradenylatcyclasen werden durch P-site-Inhibitoren wesentlich stärker gehemmt; auch dies deutet darauf hin, dass der Katalysemechanismus in *Lipj* anders verläuft.

Alle bisher untersuchten Klasse III Adenylatcyclasen setzten als Substrat ausschließlich ATP um. *Lipj* dagegen zeigt keine strenge Substratspezifität: auch GTP wird als Substrat akzeptiert und zu cGMP umgesetzt. Zwar handelt es sich hier lediglich um eine Seitenaktivität des Enzyms (7-12 % der gemessenen AC-Aktivität), dennoch können unter Standardbedingungen bis zu 150

nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> GC-Aktivität gemessen werden. Interessant ist diese Beobachtung nicht zuletzt deswegen, weil bis heute keine bakterielle Guanylatcyclase nachgewiesen werden konnte. In der Literatur finden sich dagegen einige Beispiele dazu, dass Guanylatcyclasen durch Aminosäureaustausche in Adenylatcyclasen umgewandelt wurden (Tucker et al., 1998; Beuve, 1999; Linder et al., 2000). Die Umwandlung einer AC in eine GC wurde 2001 von Kasahara et al. beschrieben. Die gemessene Guanylatcyclaseaktivität war allerdings sehr gering, eine gleichzeitige Aktivität des Proteins als Adenylatcyclase konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Möglicherweise kann die Katalyse von GTP zu cGMP in Bakterien auch durch bestimmte Adenylatcyclasen mit übernommen werden.

Welche Aminosäurereste diese Katalyse ermöglichen bzw. welcher Mechanismus die Reaktion von GTP zu cGMP ermöglicht, ist ebenfalls unklar. Die oben besprochenen Mutationsanalysen geben lediglich Hinweise darauf, welche Reste die GC-Aktivität des Enzyms beeinflussen könnten. Überraschenderweise zeigten die Mutanten H402N und N342K einen Rückgang in der GC-Seitenaktivität (von 7% beim Wildtyp auf 2% bzw. 1% relative Seitenaktivität), die Punktmutante N342E zeigt dagegen eine deutlich erhöhte GC-Seitenaktivität von 30%. Es ist unklar, warum diese Austausche zu den kanonischen Aminosäuren keine Veränderung der Affinität zum Substrat ATP ergaben, gleichzeitig aber die Affinität zu GTP veränderten. Offensichtlich spielt der Aminosäurerest an Position 342 bei der Erkennung des Substrates GTP eine größere Rolle als bei der Erkennung von ATP. Zwei weitere Mutanten zeigten eine verringerte GC-Seitenaktivität bei praktisch unveränderter AC-Aktivität: K442A und R377A. Auch dieses Ergebnis lässt sich nicht ohne weiteres erklären, da laut Modell diese Aminosäurereste an der Bindung des  $\gamma$ -Phosphates im ATP beteiligt sind. Der Triphosphatrest ist aber bekanntlich bei GTP ebenso vorhanden, eventuell tragen mögliche Konformations- und Ladungsänderungen in dieser Mutante dazu bei, dass GTP generell schlechter gebunden wird.

In vivo Expression von *Lipj* konnte in *Mycobacterium bovis* bewiesen werden. Im Westernblot von BCG-Zellen aus Zellkultur wurde mit spezifischen IgG gegen die katalytische Domäne ein Signal bei 20 kDa erhalten. Weitere Signale höheren Molekulargewichts können nicht eindeutig zugeordnet werden. Dass andere mycobakterielle Adenylatcyclasen aufgrund von Ähnlichkeiten im katalytischen Zentrum detektiert wurden, ist unwahrscheinlich. Im Westernblot mit allen 15 AC homologen Domänen aus *Mycobacterium* wurde nur für die katalytische Domäne von *Lipj* ein Signal erhalten. In der PCR-Analyse wurde mit genomischer BCG-DNA und Primern für die katalytische sowie die N-terminale Domäne von *Lipj* ein Produkt identischer Größe nachgewiesen. Dies zeigt, dass das Gen Rv1900c auch in BCG existiert und translatiert wird.

### 5.3 Charakterisierung des Holoenzym *Lipj*<sub>1-462</sub>

Das Gen Rv1900c wurde ursprünglich als *lipj* annotiert, als Esterase (Cole et al., 1998). Dies basierte auf einer möglichen N-terminalen  $\alpha/\beta$ -Hydrolase (Aminosäuren 9-285). Nähere Untersuchungen wiesen auf die C-terminale Adenylatcyclasedomäne hin (McCue et al., 2000). Proteine, die aus Kombinationen von Hydrolase- und AC-Domäne bestehen werden beispielsweise auch für einige Proteobakterien vorhergesagt, zum Beispiel in *Bradyrhizobium japonicum* (Genbank NP\_774651 und 774332). Letztgenannte  $\alpha/\beta$ -Hydrolase weist 39% Identität und 52% Ähnlichkeit zu *lipj* auf. Des Weiteren wurde eine 3-Oxoacetyl-CoA Enol-Lacton Hydrolase aus *Pseudomonas* biochemisch charakterisiert, die zu 25% identisch und zu 39% ähnlich zur Hydrolase-Domäne von *lipj* ist.

*Lipj*<sub>1-462</sub> konnte ebenfalls in *E. coli* kloniert und exprimiert werden, allerdings wurde nur sehr wenig lösliches Protein erhalten, der Löwenanteil fand sich in „inclusion bodies“ wieder. Dies zeigen auch die Immunogold-markierten Dünnschnitte von *E. coli* BL21 (DE3) [pRep4] mit exprimiertem *Lipj*<sub>1-462</sub> im Elektronenmikroskop. Diese Aufnahmen zeigen ebenfalls, dass *Lipj* in *E. coli* kein Ektoenzym ist. Diese Vermutung kam auf, da schon beim Resuspendieren von Zellen mit exprimiertem Holoenzym in EDTA-haltigem Puffer (ohne weitere Lyse) sehr hohe Aktivität gemessen werden konnte. Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ergibt sich allerdings kein Hinweis darauf, dass das Enzym im periplasmatischen Raum lokalisiert ist oder etwa ins Medium sezerniert wird. Mit Ni<sup>2+</sup>NTA-Affinitätsreinigung konnte nur wenig Protein im Eluat erhalten werden, das zudem verunreinigt war. Zur Verbesserung von Ausbeute und Reinheitsgrad wurden verschiedene Detergenzien eingesetzt, Parameter der Expression und der Reinigung variiert, unterschiedliche Lyseverfahren getestet sowie BL21 Star-Zellen als Expressionsstamm eingesetzt. Keine dieser Änderungen brachte eine wesentliche Verbesserung. Auch eine denaturierende Reinigung des Proteins war nicht sinnvoll, da sich das Protein durch Dialyse nicht renaturieren ließ.

Die besten Expressionsbedingungen, um möglichst viel lösliches Protein zu erhalten, bot das System pET16b/ BL21(DE3)[pLysS] der Firma Novagen. Die Ausbeute an relativ sauberem Protein durch Ni<sup>2+</sup>NTA-Reinigung ließ sich dadurch mehr als vierfach steigern. Dass es sich bei den im SDS-PAGE zusätzlich detektierten Proteinbanden nicht um Abbauprodukte von *Lipj*<sub>1-462</sub> handelt, zeigt die Western-Blot Analyse. Mit gereinigtem Enzym wird mit spezifischem Antikörper gegen die katalytische Domäne von *Lipj* nur ein Signal bei 51 kDa detektiert (s. zum Beispiel Abbildung 4-57).

*Lipj<sub>1-462</sub>* ist ebenfalls AC-aktiv. Mit gereinigtem Protein wurde eine  $V_{\max}$  von 300 nmol cAMP·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> gemessen, auf den ersten Blick eine deutlich niedrigere Aktivität verglichen mit der katalytischen Domäne (1.3 μmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>). Berücksichtigt man allerdings die unterschiedlichen Molekulargewichte der beiden Proteine und berechnet die jeweiligen Wechselzahlen, zeigt sich eine ähnliche Umsatzrate: Die katalytische Domäne setzt 0.4 Substratmoleküle pro Sekunde um, das Holoenzym 0.3/sec. Die kinetischen Messungen zeigen weiterhin keine gravierenden Unterschiede im Vergleich mit *Lipj<sub>291-462</sub>*. Die Kooperativität des Enzyms ist ebenfalls deutlich (Hillkoeffizient 1.4), die gemessene  $SC_{50}$  entspricht mit 350 μM der der isolierten katalytischen Domäne (300 μM). Auch die gemessene Proteinabhängigkeit ist ähnlich: mit steigender Proteinkonzentration (4 bis 420 nM) nimmt die spezifische AC-Aktivität um mehr als Faktor 15 zu. Die N-terminale Domäne beeinflusst auch die Substratspezifität des Enzyms offensichtlich nicht. Die Aktivität als Guanylatcyclase liegt mit 4% GC-Seitenaktivität im selben Bereich wie bei *Lipj<sub>291-462</sub>* (7% Seitenaktivität). Die Bestimmung des pH-Optimums zeigt, dass das Optimum von *Lipj<sub>1-462</sub>* leicht zu basischeren pH-Werten hin verschoben ist (*Lipj<sub>1-462</sub>*: pH 7.5 Tris/HCl-Puffer; *Lipj<sub>291-462</sub>* pH 6.4 MOPS/Tris-Puffer); allerdings spielt bei beiden Proteinen die eingesetzte Puffersubstanz eine Rolle, außerdem ist auch bei *Lipj<sub>1-462</sub>* der pH-Bereich für die Spitzenaktivität relativ breit. Dass dieser *in vitro* gemessene Unterschied im pH-Optimum physiologisch eine Rolle spielt, ist unwahrscheinlich.

Da *Lipj<sub>1-462</sub>* ursprünglich als Esterase annotiert wurde und Ähnlichkeiten zu Hydrolasedomänen (vgl. 7.2) aufweist, sollte *Lipj<sub>1-462</sub>* auf diesbezügliche katalytische Aktivität geprüft werden. Weder Lipase- noch Phosphataseassays mit unterschiedlichen möglichen Substraten waren positiv, das Enzym zeigte keine Lipase- oder Hydrolaseaktivität. *Lipj<sub>1-462</sub>* weist also unter denselben Testbedingungen keine signifikanten Unterschiede zu *Lipj<sub>291-462</sub>* auf. Daher wurde durch Zusatz verschiedener Substanzen im AC-Test überprüft, ob eine Hemmung oder Stimulation von *Lipj<sub>1-462</sub>* erzielt werden kann. Da sich aus der DNA-Sequenz keine weiteren Hinweise auf eine zusätzliche katalytische Funktion von Rv1900c ergaben, wurden die getesteten Substanzen aus einem anderen Blickwinkel ausgewählt. Zum einen ist in der Literatur beschrieben, dass ungefähr 30 % der Gene von *Mycobacterium tuberculosis* an der Synthese oder dem Metabolismus von Lipiden beteiligt sind (Cole et al., 1998). Aus diesem Grund kamen Substanzen wie beispielsweise Palmitinsäure zum Einsatz. Auf der anderen Seite wurde berücksichtigt, welchen physiologischen Bedingungen Mykobakterien in Phagosomen ausgesetzt sind (Russel, 2001), es wurde daher die Wirkung von Nitroprussidnatrium oder Calcium untersucht. Keine der eingesetzten Substanzen zeigt unter den gewählten Testbedingungen eine

signifikante Wirkung auf die AC-Aktivität, es wurde maximal eine um den Faktor zwei erhöhte bzw. verminderte spezifische Aktivität gemessen.

Auch durch Mutation des Cysteins an Position 15 nach Alanin ergaben sich keine neuen Erkenntnisse über die Eigenschaften von *Lipj*<sub>1-462</sub>. Die Mutante C15A wurde vor dem Hintergrund kloniert und exprimiert, dass Cysteine im Protein Disulfidbrücken ausbilden und somit die Raumstruktur nachhaltig beeinflussen können. Cys15 ist in *lipj* gegenüber dem entsprechenden Gen in *M. smegmatis* konserviert. Das Protein wurde in *E. coli* dennoch größtenteils unlöslich exprimiert und ist nach wie vor als Adenylatcyclase aktiv. Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass *Lipj*<sub>1-462</sub> im Gegensatz zur katalytischen Domäne in *E. coli* partikulär exprimiert wird; es konnte weder eine eigene katalytische Funktion der N-terminalen Domäne gezeigt werden, noch wurde ein relevanter Einfluss der Hydrolase-ähnlichen Domäne auf die AC-Katalyse festgestellt. Wenn auch keine Lipase-Aktivität mit den eingesetzten Testverfahren gezeigt werden konnte, ist es dennoch möglich, dass das Protein unter anderen Bedingungen als den bisher getesteten katalytisch aktiv ist. Möglicherweise wird ein anderes Substrat umgesetzt oder ein weiteres Protein benötigt, um einen katalytisch aktiven Komplex zu bilden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die N-terminale Domäne von *Lipj* keine eigene katalytische Funktion besitzt oder diese im Zuge der Evolution verloren hat. Mykobakterien vergrößern ihre Zellwand mit einer stattlichen Menge an komplexen Lipidoglycanen (Russel, 2001), der N-Terminus des Proteins könnte auch schlicht als Erkennungssignal dienen, um den Transport des Enzyms ins Zielkompartiment der Zelle zu gewährleisten.

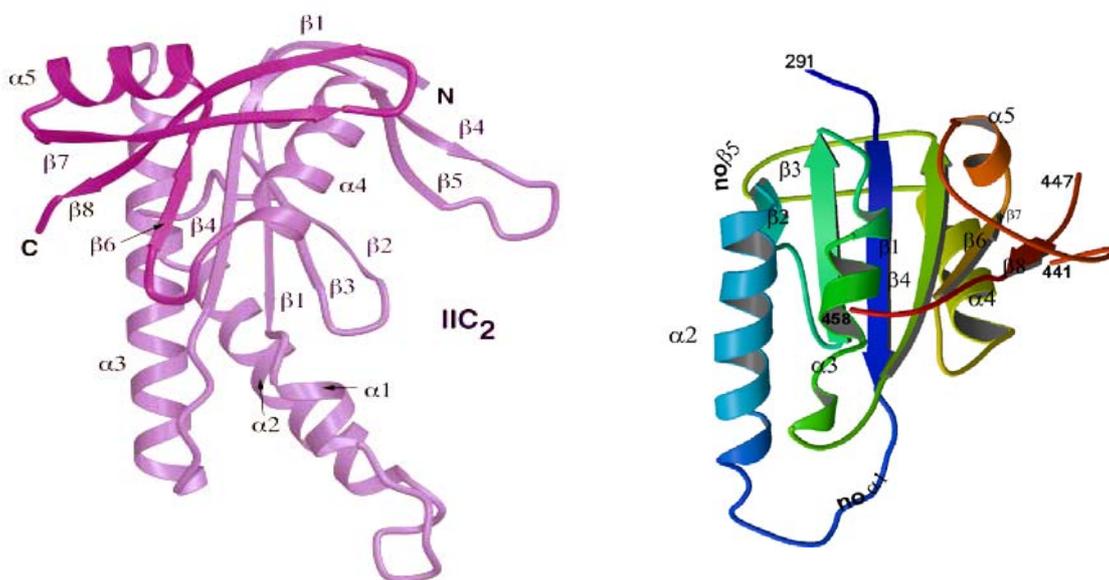
### 5.4 Die Kristallstruktur von *Lipj*<sub>291-462</sub>

Alle Daten zur Kristallisation von *Lipj* wurden von Dr. J. Linder, Dr. S. Sprang und Dr. S. Sinha erhalten und freundlicherweise vor Veröffentlichung zur Verfügung gestellt. Die Untersuchungen zur Struktur von *Lipj* sind noch nicht völlig abgeschlossen. Zur Strukturermittlung wurde gereinigtes Protein von *Lipj*<sub>291-462</sub> (s. 3.4 und 3.7) eingesetzt, die Aufkonzentrierung und gegebenenfalls Umpufferung erfolgte über *Pall* Proteinkonzentratoren. Es wurden zwei verschiedene Proteinkristalle erhalten und vermessen: Zum einen *Lipj*<sub>291-462</sub> ohne Zusatz von Substrat oder einem ähnlichen Molekül (Auflösung 2.2 Å), zum anderen ein Kristall mit gebundenem Substratanalogon AMPCPP•Mn<sup>2+</sup> (Auflösung 2.6 Å).

Die Aufklärung von Strukturen mittels Vergleichen von Proteinkristallen und Kristallen mit gebundenem Substratanalogon oder P-site-Inhibitoren ist eine gängige Methode (Tesmer et al.,

1999; Tesmer et al., 1997). Die bisher erhaltenen Daten lassen einen vorsichtigen Vergleich über Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen *Lipj* und Mammalia Adenylatcyclasen zu.

Wie aufgrund der proteinchemischen Daten erwartet, kristallisierte *Lipj* ebenfalls als Dimer; eine Kristallisationseinheit bestand aus je zwei Dimeren. Auch die Sekundärstruktur stimmt mit der Mammalia AC im Groben überein: In beiden Strukturen findet man das so genannte „palm“ (Handflächen) Motiv, eine bestimmte Abfolge von  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ ). Allerdings sind in *Lipj* Teile der in Mammalia vorgefundenen Sekundärstruktur nicht oder nur wenig stark ausgeprägt vorhanden:  $\alpha$ 1-Schleife und  $\beta$ -Faltblatt 5 fehlen ganz, die „Armregionen“, die bei Mammalia AC im Bereich des  $\beta$ 4- $\beta$ 5-loops liegen, sind daher wesentlich kompakter. Den „Armregionen“ wird eine entscheidende Rolle im Dimerisierungsprozess zugeschrieben (Tesmer et al., 1997), sie sind in Klasse IIIc Adenylatcyclasen oft verkürzt. In *Lipj* liegen statt 15 nur 11 Aminosäuren zwischen dem konservierten Glycin (Gly 383) und dem substratspezifizierenden Aspartat (D395), in anderen Klasse IIIc Adenylatcyclasen sind es nur sieben Aminosäuren (Linder und Schultz, 2003). Vergleicht man die Kristallstruktur der C2-Schleife der ACII mit der von *Lipj*, bemerkt man die insgesamt wesentlich kompaktere Raumstruktur von *Lipj*.



**Abbildung 5-3:** links: Struktur C2-Schleife ACII, Tesmer et al., Science 1997; rechts: Modell des katalytischen Zentrums von *Lipj*<sub>291-462</sub>, modifiziert nach Dr. S. Sprang, Dallas (Vortrag in Tübingen, März 2004)

Die Anzahl der Kontakte, die in der ermittelten Struktur von *Lipj* zwischen den einzelnen Dimeren bestehen, ist allerdings eher spärlich, die Raumstruktur zwischen den Domänen ist relativ offen. Dies kann auch dadurch zustande kommen, dass die Kristallisationsbedingungen nicht immer den natürlichen Zustand des Proteins während der Katalyse widerspiegeln. Die

Elektronendichteverteilung zeigt, dass die beiden metallbindenden Aspartate (Position 302/346) nicht nur sehr nahe am Substratanalogen lokalisiert sind, sondern erwartungsgemäß auch an den Mangan-Ionen. Dies unterstreicht die Ergebnisse aus der Mutationsanalyse (beide Aspartate sind für die Bindung des metallischen Cofaktors verantwortlich und damit essentiell für Katalyse als AC). Auf eine Beteiligung der Aminosäurereste N342 und H402 deutet auch die vorläufige Struktur von *Lipj* nicht hin. Die Elektronendichteverteilung zeigt relativ große Abstände zwischen einmodelliertem Substrat und den beiden Aminosäureresten, d.h. weit mehr als 5Å Distanz zwischen den Atomen des Substrates und den Atomen der Aminosäure-Seitenketten. Zudem weist die Seitenkette von N342 in *Lipj* räumlich gesehen vom einmodellierten Substrat weg, während man für das entsprechende Lysin in Mammalia AC (Lys 938) eine Wasserstoffbrückenbindung zum N1-Atom des Purinrings beobachtet (Tesmer et al., 1997).

Aus diesem Blickwinkel gesehen könnten weitere Aminosäurepositionen in *Lipj* eine Rolle in Substratbindung bzw. Katalyse spielen. Betrachtet man im vorläufigen Strukturmodell die Positionen im Protein, die eine möglichst geringe räumliche Distanz zum Substrat aufweisen, fällt Glycin 305 ins Auge. Der Abstand zwischen dem Stickstoffatom in Gly305 und dem Sauerstoff-Brückenatom im ATP beträgt weniger als 3Å. Dies könnte ein deutlicher Hinweis auf eine Wechselwirkung mit dem Phosphatrest des Substrates sein. Auch in der Mammalia AC ist die entsprechende Position für die Bindung des Pyrophosphats mitverantwortlich. In der C1-Schleife findet sich ein konserviertes Motiv aus 3 Aminosäuren (GFT), die N-terminal in der  $\alpha$ 1-Schleife einen p-Loop ausbilden und den Phosphatrest positionieren (Tesmer et al., 1997). Die entsprechenden Aminosäuren in *Lipj* sind GST- dass diese drei Aminosäuren also dieselbe Funktion wie in der Mammalia AC übernehmen, ist sehr wahrscheinlich. Zwischen den Atomen der Seitenketten von E386 und R316 wird ebenfalls ein Abstand von 3Å gemessen. E386 und R316 könnten daher möglicherweise in Wechselwirkung stehen und für die korrekte Faltung des Proteins wichtig sein. Wie aber bereits gezeigt, bewirkte die Mutation von Glutamat 386 zu Alanin aber keine wesentlichen Änderungen in den gemessenen kinetischen Parametern. Ähnlich verhält es sich mit Thr 343, auch hier zeigt das Strukturmodell mögliche Wechselwirkungen mit dem Purinring des Substrates, der Alaninscreen ergab aber keinen Hinweis auf eine essentielle Funktion dieses Restes in der Katalyse. Geringe Abstände im vorläufigen Modell von *Lipj* können also nur als Hinweise dienen, sie sind kein Beweis für essentielle Wechselwirkungen innerhalb des Proteins oder aber zwischen Substrat und Protein.

## 5.5 Modellvorstellung von Struktur und Mechanismus

Mit den bisher erhaltenen Daten aus der Kristallisation und der proteinchemischen Analyse von *Lipj* kann kein sicheres Modell für Struktur und den Katalysemechanismus des Proteins erstellt werden. Es wurden einige Gemeinsamkeiten mit Mammalia AC festgestellt, deren Struktur und Mechanismus aufgeklärt wurden, aber auch gravierende Unterschiede. Die Ergebnisse bieten Raum für vorsichtige Spekulation, wie das Substrat in der katalytischen Tasche des Enzyms gebunden und umgesetzt wird. Ein fiktives Modell könnte aufgrund der bisherigen Erkenntnisse in etwa folgendermaßen aussehen:

Aus zwei Monomeren wird ein Homodimer ausgebildet. In die dadurch entstandene katalytische Tasche können zwei ATP-Moleküle binden, die jeweils mit zwei Mangan-Ionen als metallischem Cofaktor assoziiert sind. Hier ist die treibende Kraft für eine erhöhte Umsatzgeschwindigkeit die Proteinkonzentration: Je höher die Proteinkonzentration ist, desto mehr Homodimere bilden sich aus und umso höher ist der Umsatz von ATP. Es wird kein Aktivator mit eingebunden, wie beispielsweise Forskolin in Mammalia AC. Die Aminosäurereste Aspartat 302 und 346 koordinieren über negativ geladene Carboxylgruppen die Mangankationen, die wiederum mit den negativ geladenen Sauerstoffgruppen im Phosphatrest des Substratrestes wechselwirken. Der Ribose-Purin-Rest des Substrates wird in der gebildeten Tasche vor allem über Wechselwirkungen mit dem Peptidrückgrat des Proteins gebunden und aufgrund der Stereochemie lose positioniert. Da nur der Phosphatrest über spezielle Aminosäuren gebunden wird, kann sowohl ATP als auch GTP gebunden werden. Die Aminosäureposition 342 spielt für die Bindung des Substrates GTP eine größere Rolle als bei der ATP-Bindung. Die Aktivierungsenergie wird herabgesetzt und die Abspaltung des Pyrophosphatrestes sowie die Cyclisierung zu cAMP ermöglicht. Das entstandene Pyrophosphat wird über ein konserviertes GST-Motiv in der  $\alpha$ 1-Schleife stabilisiert und aus dem katalytischen Zentrum entlassen, die im entstandenen Produkt cAMP verbliebene Phosphatgruppe wird während des Übergangszustandes über Arg 406 positioniert. Das Produkt cAMP verlässt anschließend das katalytische Zentrum, weitere Substratmoleküle können binden und umgesetzt werden.

### 5.6 Offene Fragen und Ausblick

Hauptsächlich zwei Fragen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden:

- Was für eine Rolle spielt die N-terminale, mögliche Hydrolase-Domäne von Rv1900c?  
Die bisher durchgeführten Experimente zeigen weder eine Aktivität als Hydrolase oder Esterase, auch ein hemmender oder stimulierender Effekt auf die AC-Domäne konnte nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise dient dieser Teil des Proteins in *M. tuberculosis* als Transportsignal, um das Protein im Zielkompartiment der Zelle zu positionieren. Um untersuchen zu können, wo *Lipj* in der mykobakteriellen Zelle lokalisiert ist, wurden Zellkulturen von BCG kryofixiert und sollen nachfolgend als Ultradünnschnitte im Elektronenmikroskop untersucht werden. Über eine Immunogold-Markierung mit spezifischem *Lipj*-Antikörper könnte das Protein in der mycobakteriellen Zelle lokalisiert werden; mittels PCR- und Western-Blot-Analyse wurde nachgewiesen, dass *lipj* in BCG als Gen vorhanden ist und exprimiert wird.
- Welcher Katalysemechanismus liegt in der AC-Domäne zugrunde und wie wird das Substrat spezifiziert?  
Eine Weiterentwicklung der Kristallstruktur von *Lipj* (Dr. S. Sprang/ Dr. S. Sinha, Dallas) kann weitere Hinweise auf den katalytischen Mechanismus geben. Über Elektronendichte-Karten kann beispielsweise eine Vorhersage gemacht werden, welche Aminosäurereste in direkter Wechselwirkung mit dem Substrat stehen und welche Bindungen dabei eine Rolle spielen. Auch die Klonierung einer weiteren Mutante kann dazu beitragen, diese Fragen zu klären. Durch Klonierung der Doppelmutante N342E /D395C könnte untersucht werden, welche Rollen diesen Positionen bei der Spezifizierung des Substrats zukommen. Die Mutanten N342A und N342K zeigten keinen Unterschied in der AC-Katalyse, allerdings verursachte die Mutation zum kanonischen Lysin einen Rückgang in der GC-Seitenaktivität. Die Punktmutante N342E zeigte dagegen eine reduzierte spezifische AC-Aktivität und eine erhöhte relative GC-Seitenaktivität von 30%. In Guanylatcyclasen wird das Substrat GTP entsprechend durch ein Glutamat/Cystein-Tandem an diesen Positionen spezifiziert (Liu et al., 1997), es wurde weiterhin gezeigt, dass Guanylatcyclasen durch einen Austausch beider substratspezifizierenden Aminosäuren AC-aktiv sind (Tucker et al., 1998; Beuve, 1999; Linder et al., 2000).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

*Lipj<sub>1-462</sub>* ist ein Protein aus *Mycobacterium tuberculosis*, das aus zwei Domänen besteht. C-terminal befindet sich eine Adenylatcyclase-Domäne, N-terminal eine mögliche Hydrolasedomäne. Vergleicht man die Cyclasedomäne mit einer Mammalia-AC, zeigen sich Unterschiede in Struktur und Katalysemechanismus. Von den sechs kanonischen Aminosäuren sind in *lipj* lediglich vier konserviert. Anstelle des substratspezifizierenden Lysins findet man in *Lipj* ein Asparagin, ein Asparagin zur Stabilisierung des Übergangszustandes ist durch ein Histidin ersetzt. Trotz dieser Austausch zeigt *Lipj<sub>291-462</sub>* für eine bakterielle Adenylatcyclase eine relativ hohe spezifische AC-Aktivität von  $1.8 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Die Katalyse von ATP zu cAMP erfolgt durch Ausbildung eines Homodimers und ist ausschließlich in Gegenwart von Mangan-Ionen nachgewiesen worden. Neben ATP wird auch GTP als Substrat erkannt und mit einer Geschwindigkeit von  $150 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  umgesetzt. Mutationsanalysen beweisen die essentielle Rolle der Aspartatreste 302 und 346 zur Bindung des Cofaktors, auch für Arginin 406 wurde die erwartungsgemäß wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Übergangszustandes gezeigt. Im Gegensatz dazu wurde die AC-Aktivität weder durch Mutation von His 402 zum kanonischen Asparagin, noch zu Alanin beeinträchtigt. Weitere Mutationsanalysen zeigten darüber hinaus, dass weder Asp 395 noch Asn 342 ihre vorhergesagte Rolle bei der Erkennung des Substrates ATP einnehmen. Diese Ergebnisse werden auch durch die vorläufige Kristallstruktur von *Lipj<sub>1-462</sub>* (Dr. S. Sprang/ Dr. S. Sinha, Dallas) bestätigt. Aus diesen Daten kann man folgern, dass die katalytische Aktivität nur an drei von sechs kanonischen Aminosäurereste der Klasse III Adenylatcyclasen gekoppelt ist. Für die katalytische Domäne von *Lipj* muss also ein neuer Mechanismus für Substraterkennung und Katalyse vorliegen. Zu klären bleibt die Funktion der N-terminalen Domäne des Holoenzym. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit weder eine eigene katalytische Funktion als Hydrolase oder Lipase festgestellt werden, noch konnte ein hemmender oder stimulierender Effekt auf die Cyclasedomäne nachgewiesen werden.

## 7 ANHANG

### 7.1 DNA- und Proteinsequenz Rv1900c

Sanger Institute MTCY180.18

[Some similarity to esterases and hypothetical M. tuberculosis proteins. FASTA results: Q43936 BETA- KETOADIPATE ENOL-LACTONE HYDROLASE (267aa) opt: 217; E(): 1.7e-07; 29.2% identity in 260 aa overlap]

[http://www.sanger.uk/Projects/M\\_tuberculosis/Gene\\_list/CDS/](http://www.sanger.uk/Projects/M_tuberculosis/Gene_list/CDS/)

```

1 atggcgcaggctccccacattcacaggaccgctacgcaaatgcggcgacatggatac
1 M A Q A P H I H R T R Y A K C G D M D I

61 gcctaccaggtgctgggtgacgggtccgacggatctgctggtgtgccggggccgctcgtg
21 A Y Q V L G D G P T D L L V L P G P F V

121 ccgatcgactcgatcgacgacgagccatcgctgtaccgtttccatgccgtcttgcgtca
41 P I D S I D D E P S L Y R F H R R L A S

181 ttcagcagggtgatccgcctcgaccatcgtggggtcggcctgtcgtcacggctcgccgcg
61 F S R V I R L D H R G V G L S S R L A A

241 ataaccacgctggggccgaagtctgggcccaggacgcgatcgcggtgatggacgcggtc
81 I T T L G P K F W A Q D A I A V M D A V

301 ggatgcgagcaggcgcacaattttcgcgcccagttccacgccatgaacggacttgtctc
101 G C E Q A T I F A P S F H A M N G L V L

361 gccgccgactaccccgagcgggtgcgcagcctgatcgtcgtcaacggctcggcgcgccc
121 A A D Y P E R V R S L I V V N G S A R P

421 ctatgggcgcccgactacccggtaggcgcgccaggttcgtcgagctgaccggttctgacg
141 L W A P D Y P V G A Q V R R A D P F L T

```

481 gtggcgctggaaccggatgccgtcgagcggggcttcgacgtgctgagcatcgtggctcct

161 V A L E P D A V E R G F D V L S I V A P

541 accgtggccggagatgacgtgtttcgagcctggtgggatctcgccggcaaccgtgccgga

181 T V A G D D V F R A W W D L A G N R A G

601 ccgccgagcattgccctgccgtttcaaaggctatagccgaggccgacgtacgagatgtc

201 P P S I A R A V S K V I A E A D V R D V

661 ttgggacacatcgaggctccaacactgatcttgaccgtgtcggatcgacgtacatccc

221 L G H I E A P T L I L H R V G S T Y I P

BamHI

721 gtgggacatggtcgtacctcgccgagcacatcgctggatcccgttggtcgaactacc

241 V G H G R Y L A E H I A G S R L V E L P

781 ggcaccgataccctgtactgggttggcgacaccgggcccgatgctcgatgaaatcgaggaa

261 G T D T L Y W V G D T G P M L D E I E E

Start AC

841 ttcataccggcgtgcgcggcggtgacgccgagcgcgatgcttgcaccatcatgttt

281 F I T G V R G G A D A E R M L A T I M F

901 accgacatcgtcggtcgaccagcacgccgccgcgctcggcgacgaccgatggcgcgac

301 T **D** I V G S T Q H A A A L G D D R W R D

961 ctgttgacaaccacgacaccatcgtgtgccacgaaatccagcggttcggcggtcgcgaa

321 L L D N H D T I V C H E I Q R F G G R E

EagI

1021 gtgaaca**cgccgg**tgacggtttcgtcgcgacgttcaccagtcggatgcccgatcgcg

341 V **N** T A G **D** G F V A T F T S P S A A I A

1081 tgcgcggacgacatcgtcgacgcggtcggcgctgggtattgaggtccggatcggatt

361 C A D D I V D A V A A L G I E V **R I G I**

KpnI

1141 catgcgggcgaggctcgaggctgcgcatgcctcgcac**ggtaaccg**acgtcgccggcgtggcc

381 H A G E V E V R D A S H G T **D** V A G V A

1201 gtgcatatcggctgcgcgctctgcgcgctggccggaccagtgaggctggtgtcctcg

401 V **H** I G A R V C A L A G P S E V L V S S

PinAI

1261 accgtgcgagacatcgtcgccggatcacggc**accggt**tcgccgagcgtggtgagcaggaa

421 T V R D I V A G S R H R F A E R G E Q E

1321 ctcaagggcgtaccgggcagatggcggctatgcgtgctcatgcgcgacgacgccaccgc

441 L **K** G V P G R W R L C V L M R D D A T R

XmaCI

1381 acgcgctaatgt**cccggg**

461 T R • C P G

## 7.2 Ergebnisse aus DNA-DNA BLAST Search

Über NCBI wurde mit der kompletten Sequenz von Rv1900c (Holoenzym) ein DNA-DNA-BLAST Search durchgeführt (Jan-05-2004; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul et al., 1997; Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF). Die sechs höchsten Treffer sind angezeigt, die letzten drei auch im Alignment mit Rv1900c (Query = Rv1900c).

	Score	E
	(bits)	Value
gi   15609037   ref   NP 216416.1   lipJ [Mycobacterium tuberculos...	895	0.0
gi   15841371   ref   NP 336408.1   hydrolase, alpha / beta hydrolas...	894	0.0
gi   31793093   ref   NP 855586.1   Probable Lignin Peroxidase lip...	892	0.0
gi   27383122   ref   NP 774651.1   bll8011 [ bradyrhizobium japoni...	301	4e-80
gi   27382803   ref   NP 774332.1   bll7692 [ bradyrhizobium japoni...	256	1e-66
gi   13474495   ref   NP 106064.1   hypothetical protein mll5392 [...	211	5e-53

gi|27383122|ref|NP\_774651.1| bll18011 [Bradyrhizobium japonicum]  
 gi|27356296|dbj|BAC53276.1| bll18011 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]  
 Length = 445

Score = 301 bits (770), Expect = 4e-80  
 Identities = 182/459 (39%), Positives = 248/459 (54%), Gaps = 18/459 (3%)  
 Frame = +3

Query: 228 TRYAKCGDMDIAYQVLGDGPTDLLVLPGPFPIDSIDDEPSLYRFHRRLASFSRVIRLDH 407  
 T+YA+ GD IAYQV+G GP D++++PG ID + P + RR+A FSRV+ D  
 Sbjct: 9 TQYAQSGDFSIAYQVMGSGPVDIILVPGIISHIDYQHELPGYTQILRRMARFSRVVTFDK 68

Query: 408 RGVGLSSRLAAITTLGPKFWAQDAIAVMDAVGCEQATIFAPSFHAMNGLVLAADYPERVR 587  
 RG GLS RLA + +L + D AVMDA+G +A + S A ++ A YP+RV  
 Sbjct: 69 RGQGLSDRLADVPSLEDRI--DDVRAVMDAIGSRRRAVLVGFSEGASMSVLFATTYPDRVS 126

Query: 588 SLIVVNGSAR-----PLWAP---DYPVGAQVRR-----ADPFLTVALEPDAVERGFD 719  
 L++ G AR P ++P D + V+R A+ F + A PDA R  
 Sbjct: 127 HLVLFGGLARIADLFPPSFPAEADERLANLVKRWGSGSFLANVFASEASNPDAAR--- 183

Query: 720 VLSIVAPTAVGDDVFRWWDLAGNRAGPPSIARAVSKVIAEADVRDVLGHIEAPTLILHR 899  
 ++ R++ + NR DV +L + APTLILHR  
 Sbjct: 184 -IAKFEKLACSPGAIRSY--IISNR-----RIDVNAILPCVRAPTLILHR 225

Query: 900 VGSTYIPVGHGRYLAEHIAGSRLVELPGTDTLYWVGDTPMLDEIEEFITGVR--GGADA 1073  
 +PV GR +A I G++ +E P D +W GDT ++ +IEEF+TG R G D  
 Sbjct: 226 ATDAQVPVALGRKMAAGIPGAKYIEYPSGDHAFWTGDTETLVGDIEEFVTGHRQAGDSDL 285

Query: 1074 ERMLATIMFTDIVGSTQHAAALGDDRWRDLLNHDITVCHIEIQRFGGREVNTAGDGFVAT 1253  
 ER+LAT+MFTDIV ST+ AA +GD RWR LD HD + I R G V T GDG +AT  
 Sbjct: 286 ERILATVMFTDIVDSTRQAAEIGDQRWRGRLDEHDALARQFIDRHRGNLVKTTGDGVLAT 345

Query: 1254 FTSPSXXXXXXXXXXXXXXXXXGLGIEVRIGIHAGEVEVRDASHGTDVAGVAVHIGARVCALA 1433  
 F P +G+ VR G+H GE+E+R G+D+ G+AVH ARV + +  
 Sbjct: 346 FDGPGRAIRCALSFSAAARQIGLPVRAGLHTGEIEMR----GSDIGGIAVHAAARVMSQS 401

Query: 1434 GPSEVLVSSTVRDIVAGSRHRFAERGEQELKGVPGRWRL 1550  
 P EVLVS V D+VAG+ RF+ERG ELKG+PG+W L  
 Sbjct: 402 APDEVLSRVVTDLVAGAGLRFSEGRSYELKGLPGKWDL 440

gi|27382803|ref|NP\_774332.1| bll17692 [Bradyrhizobium japonicum]  
 gi|27355976|dbj|BAC52957.1| bll17692 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]  
 Length = 351

Score = 256 bits (654), Expect = 1e-66  
 Identities = 148/349 (42%), Positives = 199/349 (57%), Gaps = 2/349 (0%)  
 Frame = +3

Query: 228 TRYAKCGDMDIAYQVLGDGPTDLLVLPGPFPIDSIDDEPSLYRFHRRLASFSRVIRLDH 407  
 T YAK GD+ IAYQV+GDGP DL+++ G ++ ++P+L RF RLASF+R+I D  
 Sbjct: 5 THYAKSGDVHIAIQVVGDPIDLVLVHGWISHLEYQWEDPALARFLNRLASF+SRLIVFDK 64

Query: 408 RGVGLSSRLA--AITTLGPKFWAQDAIAVMDAVGCEQATIFAPSFHAMNGLVLAADYPER 581  
 RG GLS R+A A+ TL + D AVMDA G +A IF S + AA YP R  
 Sbjct: 65 RGTGLSDRVAESALPTLEMRM--DDIRAVMDAAGSNRAVIFGISEGGPLSTLFAATYPGR 122

Query: 582 VRSLIVVNGSARPLWAPDYPVGAQVRRADPFLTVALEPDAVERGFDVLSIVAPTAVGDDV 761  
 +LI+ A+ + DYP G + + + G L +AP+ A D+  
 Sbjct: 123 TAALIMYGAYAKWIRTDYDYPWGPTRQHEAAFNAYEKHWGTPIG---LKTLPASAANDER 179

**ANHANG**

---

Query: 762 FRAWWDLAGNRAGPPSIARAVSKVIAEADVRDVLGHIEAPTLILHRVGSTYIPVGHGRYL 941  
R WW A P + ++ E D+R +L I PTLILHR G P RY+  
Sbjct: 180 VRQWWAQFMRIAASPGAGITLYRMNVEVDIRAILPTIRVPTLILHRRGDRLQPCEGARYM 239

Query: 942 AEHIAGSRLVELPGTDTLYWVGDTGPMLDEIEEFITGVRGGADAERMLATIMFTDIVGST 1121  
A I G++ VELPG D + W+GD +L EI+EF+TG +A+R+LAT++F D+V ST  
Sbjct: 240 AGQIPGAKFVELPGDDHMLWIGDADSLAEIQEFLTGETPMLEADRVLATVLFIDVVQST 299

Query: 1122 QHAAALGDDRWRDLNHDNHTIVCHEIQRFGGREVNTAGDGFVATFTSPS 1268  
Q A +GD RWRDL+DN+ +V E+ R GGR VNTAGDG ATF P+  
Sbjct: 300 QRATEIGDSRWRDLVDNYHQLVSKVEARLGGRRVNTAGDGVFATFDGPA 348

gi|13474495|ref|NP\_106064.1| hypothetical protein mll5392 [Mesorhizobium loti MAFF303099]  
gi|14025249|dbj|BAB51850.1| hypothetical protein [Mesorhizobium loti]  
Length = 517

Score = 211 bits (537), Expect = 5e-53  
Identities = 140/427 (32%), Positives = 205/427 (48%), Gaps = 1/427 (0%)  
Frame = +3

Query: 228 TRYAKCGDMDIAYQVLGDGPTDLLVLPFPFVPIDSIDDEPSLYRFHRRLASFSRVIRLDH 407  
TRYA G+ IAYQV+G G DL+ +PG +D ++ R RRL++FSR+I D  
Sbjct: 6 TRYALSGEARIAYQVVGQSLDLVFPVGFISNLDLHWEDEGYTRLLRRLSAFSRLILFDK 65

Query: 408 RGVGLSSRLAAITTLGPKFWAQDAIAVMDAVGCEQATIFAPSFHAMNGLVLAADYPERVR 587  
RG GLS R+ A + D AVMDA G +A + S A ++ AA YPER R  
Sbjct: 66 RGTGLSDRVDAHNLPLETRMDDVRAVMDAAGSGRAALLGASEGAPMAMLFAATYPERTR 125

Query: 588 SLIVVNGSAR-PLWAPDYPVGAQVRRADPFLTVALEPDAVERGFDVLSIVAPTAVAGDDVF 764  
+L + G A W R + F+ A + L AP D F  
Sbjct: 126 ALALYGGYAHFHKWV-----MPPERLNAFIATA---ETAWGTGATLPNFAPGRVDDAHF 176

Query: 765 RAWWDLAGNRAGPPSIARAVSKVIAEADVRDVLGHIEAPTLILHRVGSTYIPVGHGRYLA 944  
WW + P+ A A++++ AE DVR VL I APTL++HR + R+LA  
Sbjct: 177 TQWWARFERLSASPTAAAALARMNAEIDVRGVLAAISAPTLIIHRRNDARVDPDASRFLA 236

Query: 945 EHIAGSRLVELPGTDTLYWVGDTGPMLDEIEEFITGVRGGADAERMLATIMFTDIVGSTQ 1124  
+ I +RLVE+PG D W GD + D IEEF+TG R A+A+R+LA ++ T I +T+  
Sbjct: 237 KKIPNARLVEIPGRDHPITWTDVDRVADLIEEFLTGTTRAVAEADRVLAALLVTRIIDTTR 296

Query: 1125 HAAALGDDRWRDLNHDNHTIVCHEIQRFGGREVNTAGDGFVATFTSPSXXXXXXXXXXXXX 1304  
+GD W + + + R GGR + T G+ ++ F P+  
Sbjct: 297 ----MGDRMWSERSERFQETWRLLVGRHGGRALGTQGEMMISRFDGPARIAIRCAAALREA 352

Query: 1305 XXXLGIIEVRIGIHAGEVEVRDASHGTDVAGVAVHIGARVCALAGPSEVLVSSTVRDIVAG 1484  
+G+ G+H GE+E+R G+ + ++ A A S++L S V D+ G  
Sbjct: 353 AQGIGVASAQGVHVGEIELRGPP-----VGLTARVTMQLAAHASRSDILASRLVADLATG 407

Query: 1485 SRHRFAE 1505  
S F +  
Sbjct: 408 SGLHFED 414

### 7.3 Vergleich Rv1900c *M. tuberculosis* / *M. smegmatis*

```

tub.:          7 IHRTRYAKCGDMDIAYQVLGDGPTDLLVLPGFVFP-IDSIDDEPSLYRFHRRLASFSRVI
              + T YA CGD+ +AYQ+ GDGP L V GPFV ++ P F +LASF RV
smegm.: 931248 VAETSYASCGLDSLAYQLFGDGPIPL-VFVGPVFGHVLELFWTVPEFKSFFDQLASFCRVA

              66 RLDHRGVGLSSRLAAITTLGPKFQDAIAVMDAVGCEQATIFAPSFHAMNGLVLAADYP
              D G GLS + + TL + A + AVMDAVG + A + A S ++ AA+ P
931425 IFDKAGTGLSDPVPKVRTLDDR--AAEIEAVMDAVGFDDAVVLAMSEGGPASILFAANRP

              126 ERVRSILIVVNGSARPL---WAP--DYPVGAQVRRRA----DPFLTVALEPDAVERGFDVLS
              RVR+L+ A W PV + R D + + + +
931599 GRVRTLVAYGSFATMAGCRWEDLDGDPVDIRARSVAEMGDEYAPTVEQ--VIHFQEQARA

              177 IVAPTIVAGDDVFRAWWDLAGNR-----AGPPSIARAVSKVIAEADVRDVLGHIEAPT
              + +G V A + R P +ARA + DVR +L I APT
931773 VRGQWGSAAVRCAMPMSMGSMRQLGMFERLCASPGMARATFEAAFRIDVRPILPTIAAPT

              229 LILHRVGSTYIPVGHGRYLAEHIAGSRLVELPGTDTLYWVGDTGPMLDEIEEFITGVRGG
              L++H +PV RYLA+HI+G+R +E+ G D W + +L EIEEF+TG
931953 LVIHARDDPAVPVQCSTRYLADHISGARWLEVDGVDHAPWFTEADRVLTEIEEFVTGNHAA

              289 A-DAERMLATIMFTDIVGSTQHAAALGDDRWRDLDNHDITVTCHEIQRFGGREVN TAGDG
              ++ R L T++FTDIV STQHAA+ GD+RWR +L + RFGG V + GDG
932133 PHNSHRALRTVLFTEIVASTQHAASNGDERWRVAVLQRFGEVTEELSGRFGGVVVKSTGDG

              348 FVATFTSPSAAIACADDIVDAVAALGIEVRIGIHAGEVEVRDASHGTDVAGVAVHIGARV
              ++TF P+ AI A+ + LGI++R IH GE E+ G D+ G+AVHI AR+
932313 HLSTFEGPTHAIKYAEALRSDAETLGIQIRAAIHTGECCELL----GDDIGGIAVHIAARI

              408 CALAGPSEVLVSSTVTRDIVAGSRHRFAERGEQELKGVPGRWRL 450
              A E+LVS TVRD+V GS FA+RG EL+GVPG W+L
932481 LGQARAGEILVSRTVTRDLVVGSGTSFADRGVVELRGVPGTWQL 932609

```

## 8 LITERATUR

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402.
- Aravind, L. and Koonin, E.V. (1999) DNA polymerase  $\beta$ -like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1609-1618.
- Artymiuk, P.J., Poirrette, A.R., Rice, D.W. and Willet, P. (1997) A polymerase I palm in adenylyl cyclase? *Nature*, **388**, 33-34.
- Barzu, O. and Danchin, A. (1994) Adenylyl Cyclases: A Heterogeneous Class of ATP-Utilizing Enzymes. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **49**, 241-283.
- Beuve, A. (1999) Conversion of a guanylyl cyclase to an adenylyl cyclase. *Methods*, **19**, 545-550.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E. 3rd, Tekaiia, 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. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**, 537-544.
- Danchin, A. (1993) Phylogeny of adenylyl cyclases. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, **27**, 109-162.
- Dessauer, C.W. and Gilman, A.G. (1996) Purification and characterization of a soluble form of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16967-16974.
- Dessauer, C.W., Scully, T.T. and Gilman, A.G. (1997) Interactions of forskolin and ATP with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22272-22277.
- Dessauer, C.W. and Gilman, A.G. (1997) The catalytic mechanism of mammalian adenylyl cyclase. Equilibrium binding and kinetic analysis of P-site-inhibition. *J. Biol. Chem.*, **272**, 27787-27795.

- Guo, Y.L., Seebacher, T., Kurz, U., Linder, J.U. and Schultz, J.E. (2001) Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases. *EMBO J.*, **20**, 3667-3675.
- Hanoune, J., Pouille, Y., Tzavara, E., Shen, T., Lipskaya, L., Miyamoto, N., Suzuki, Y. and Defer, N. (1997) Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Mol. Cell Endocrinol.*, **128**, 179-194.
- Hurley, J.H. (1998) The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. *Current Opinion in Structural Biology*, **8**, 770-777.
- Hurley, J.H. (1999) Structure, mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 7599-7602.
- Johnson, R.A. and Shoshani, I. (1990) Kinetics of "P"-site-mediated inhibition of adenylyl cyclase and the requirements for substrate. *J. Biol. Chem.*, **265**, 11595-11600.
- Kanacher, T., Schultz, A., Linder, J.U. and Schultz, J.E. (2002) A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. *EMBO J.*, **21**, 3672-3680.
- Kanacher, T. (2003) Die Adenylatcyclase aus *Anabaena* sp.PCC7120 ist ein cAMP-sensitives Protein. Dissertation Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Linder, J.U., Engel, P., Reimer, A., Krüger, T., Plattner H., Schultz, A. and Schultz, J.E. (1999) Guanylyl cyclases with the topology of mammalian adenylyl cyclases and an N-terminal P-Type ATPase-like domain in *Paramecium*, *Tetrahymena* and *Plasmodium*. *EMBO J.*, **18**, 4222-4232.
- Linder, J.U., Schultz, A., and Schultz, J.E. (2002) Adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* has an autoinhibitory N-terminal domain. *J. Biol. Chem.*, **277**, 15271-15276.
- Linder, J.U. and Schultz, J.E. (2003) The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cellular Signalling*, **15**, 1081-1089.
- Linder, J.U., Hammer, A. and Schultz, J.E. (2004) The effect of HAMP domains on class IIIb adenylyl cyclases from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, *in press*.
- Lowrie, D.B., Jackett, P.S. and Ratcliffe, N.A. (1975) *Mycobacterium microti* may protect itself from intracellular destruction by releasing cyclic AMP into phagosomes. *Nature*, **254**, 600-602.

- McCue, L.A., McDonough, K.A. and Lawrence, C.E. (2000) Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.*, **10**, 204-219.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**, 335-350.
- Peterkovsky, A., Reizer, A., Reizer, J., Gollop, N., Zhu, P.P. and Amin, N. (1993) Bacterial adenylyl cyclases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **44**, 31-65.
- Reddy, S.K., Kamireddi, M., Dhanireddy, K., Young, L., Davis, A. and Reddy, P.T. (2001) Eukaryotic-like adenylyl cyclase in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J. Biol. Chem.*, **276**, 35141-35149.
- Russel, D.G. (2001) *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 569-577.
- Salomon, Y., Londos, C. and Rodbell, M. (1974) A highly sensitive adenylyl cyclase assay. *Anal. Biochem.*, **58**, 85-91.
- Sinha, Sangita and Sprang, S.R. (2003) *Mitteilung an J.E. Schultz*
- Shenoy, A.R., Srinivasan, N. and Visweswariah, S.S. (2002) The ascent of nucleotide cyclases: conservation and evolution of a theme. *J. Biosci.*, **27**, 85-91.
- Sunahara, R.K., Dessauer, C.W. and Gilman, A.G. (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 461-480.
- Sunahara, R.K., Beuve, A., Tesmer, J.J.G., Sprang, S.R., Garbers, D.L. and Gilman, A.G. (1998) Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.*, **273**, 16332-16338.
- Tang, W.J. and Gilman, A.G. (1995) Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs $\alpha$  and forskolin. *Science*, **268**, 1769-1772.
- Tang, W.J. and Hurley, J.H. (1998) Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Mol. Pharm.*, **54**, 231-240.
- Taussig, R. and Gilman, A.G. (1995) Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 1-4.
- Tesmer, J.J.G., Sunahara, R.K., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gs $\alpha$ •GTP $\gamma$ S. *Science*, **278**, 1907-1916.
- Tesmer, J.J.G., Sunahara, R.K., Johnson, R.A., Gosselin, G., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1999) Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science*, **285**, 756-760.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Doktoren:

Ammon, H.P.T. (Pharmakologie und Toxikologie)

Beyer, C. (Pharmazeutische Chemie)

Drews, G. (Pharmakologie und Toxikologie)

Heide, L. (Pharmazeutische Biologie)

Kovar, K.A. (Pharmazeutische Chemie)

Laufer, S. (Pharmazeutische Chemie)

Schmidt, P.C. (Pharmazeutische Technologie)

Schultz, J.E. (Pharmazeutische Chemie)

Wahl, M.A. (Pharmakologie und Toxikologie)

Wankmüller, A. (Pharmazeutische Terminologie)

Zimmermann, W. (Pharmazeutische Chemie)

# LEBENS LAUF

## zur Person

Martina Wetterer  
geboren am 19. März 1976 in Esslingen a. N.

## Schul Ausbildung

1982 – 1986	Grundschule
1986 – 1995 23.06.1995	Otto-Hahn-Gymnasium Ostfildern Abitur

## Studium

1996 – 2001	Studium der Pharmazie Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10.04.2000	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

## Praktische Ausbildung

05/2000 - 10/2000	Fa. HEUMANN PHARMA GmbH Nürnberg
11/2000 - 10/2000	Kosmas-Apotheke Ostfildern
02.07.2001	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
02.07.2001	Approbation als Apothekerin

## Promotion

09/2001 - 04/2004	Durchführung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit „Rv1900c: Eine unorthodoxe Klasse IIIc Adenylatcyclase aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i> “ am Institut für Pharmazeutische Biochemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. J. E. Schultz
----------------------	---