

**HAMP Domänen-vermittelte Signalübertragung:
Mutagenese Untersuchungen
und biochemische Charakterisierung**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Laura García Mondéjar
aus Madrid, Spanien

Tübingen
2010

Tag der mündlichen Qualifikation:

21.02.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Joachim E. Schultz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

Berichte aus der Biochemie

Laura García Mondéjar

HAMP Domänen-vermittelte Signalübertragung:

Mutagenese Untersuchungen
und biochemische Charakterisierung

D 21 (Diss. Universität Tübingen)

Shaker Verlag
Aachen 2011

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Tübingen, Univ., Diss., 2011

Copyright Shaker Verlag 2011

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-9974-3

ISSN 1434-5536

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Joachim Schultz, möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, die guten Arbeitsbedingungen, die Möglichkeit der Teilnahme an Kongressen und für die hervorragende Unterstützung und sein Vertrauen in meine Arbeit ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Peter Ruth danke ich ganz herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Bei Frau Prof. Dr. Gisela Drews und Herrn Prof. Dr. Klaus Hantke möchte ich mich herzlich für die Abnahme meiner Promotionsprüfung bedanken. Herrn Klaus Hantke danke ich außerdem für die *in vivo* Untersuchungen und seine fachliche Diskussionsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andrei Lupas für die gute Zusammenarbeit und die vielen Ideen, die einen beträchtlichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beitragen haben. Ihm und seinem Team möchte ich ebenfalls für die erfolgreiche Kooperation auf dem Forschungsgebiet der HAMP Domäne danken. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Kornelius Zeth und Dr. Reinhard Albrecht für die Unterstützung bei den Kristallisationsvorhaben und für die zahlreichen Ratschläge bedanken.

Herr Dr. Sigisfredo Garnica und Frau Sabine Silberhorn möchte ich für die Unterstützung bei den Sequenzierungen danken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitskreise Ruth und Drews danke ich für die freundliche Atmosphäre und das schöne Miteinander im 7.Stock.

Herr Dr. Marco Gross-Langenhof möchte ich für die freundliche und nette Einführung in die Laborarbeiten und die hilfreichen Tipps herzlich danken.

Für die Bereitstellung der Triple Chimäre und für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge geht mein Dank an PD Dr. J. Linder.

Frau Anita Schultz möchte ich für ihre Hilfe bei den Klonierungen danken.

Frau Dr. Yinglan Guo danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre hilfreichen Tipps.

Bei Frau Ursula Kurz bedanke ich mich für jegliche Unterstützung im Labor sowie für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Freundschaft.

Meinen Laborkolleginnen Ana Banjac, Janani Natarajan, Kajal Kanchan und Karin Winkler, danke ich für ihre Freundschaft, für die schöne und lustige gemeinsame Zeit und für die netten Fachgespräche, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Darüber hinaus ein ganz liebes Dankeschön für die tollen Stunden in- und außerhalb des Labors, die diese Zeit so schön gemacht haben. Ihr seid mir ans Herz gewachsen!

Nochmal ein herzlichen Dankeschön an Frau Karin Winkler für ihre stetige Hilfe und für die zahlreichen Deutschkorrekturen, die mir sehr geholfen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Andreas Justen, der mich immer unterstützt hat und immer für mich da ist. Das Leben mit Dir ist einfach schöner und dafür danke ich Dir vom ganzen Herzen! Vielen Dank außerdem für das sorgfältige Korrekturlesen und die aufmunternden Worte. Dein Verständnis und Dein Rückhalt, vor allem in den letzten Monaten, haben diese Arbeit mit möglich gemacht.

También agradezco a mi familia y amigos su cariño y apoyo. Muy en especial quiero dar las gracias a mis padres Jose María y Mercedes y a mi hermano Ricardo que, a pesar de la distancia, han estado a mi lado cada día durante todos estos años apoyándome siempre, soportando las malas rachas y queriéndome tal y como soy. Muchísimas gracias por TODO! Os quiero!!!

Inhaltverzeichnis

Abkürzungen	IV
Domänenübersicht und Aminosäuresequenz der verwendeten Chimären	V
Nomenklatur der untersuchten Konstrukte	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Die HAMP Domäne.....	2
1.2 <i>E. coli</i> Chemorezeptoren.....	5
1.3 Adenylatcyclasen.....	7
1.4 Zielsetzung.....	9
2 Materialien.....	11
2.1 Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	11
2.2 Geräte.....	11
2.3 Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	12
2.4 Verwendete Plasmide.....	12
2.5 Oligonukleotide (Primer).....	12
2.5.1 Sequenzierprimer.....	12
2.5.2 Klonierungsprimer.....	13
2.6 Puffer und Lösungen.....	19
2.6.1 ... für molekularbiologische Methoden.....	19
2.6.1.1 Lösungen zum Arbeiten mit DNA.....	19
2.6.1.2 Nährmedien für <i>E. coli</i>	19
2.6.2 ... für Proteinchemische Methoden.....	20
2.6.2.1 SDS-Polyacrylamidelektrophorese.....	20
2.6.2.2 Western Blot.....	20
2.6.2.3 Zellernte und Membranpräparation.....	20
2.6.2.4 Proteinreinigung an Ni ²⁺ -IDA.....	21
2.6.2.5 Reinigung der GST-Fusionsproteine.....	21
2.6.2.6 Reinigung der Selenomethionin-markierten Adenylatcyclase.....	21
2.6.3 ... für Adenylatcyclase-Enzymtests.....	22
2.6.4 ... für Kristallisation.....	22
2.6.5 Sonstige Puffer.....	22
3 Methoden	23
3.1 Gentechnologische Methoden.....	23
3.1.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Miniprep).....	23
3.1.2 DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	23
3.1.3 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	23
3.1.4 Entsalzen von DNA.....	23
3.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	24
3.1.6 Restriktionsverdau von DNA.....	24
3.1.7 Glätten von überhängenden DNA-Enden.....	24
3.1.8 5'-DNA-Phosphorylierung.....	24
3.1.9 5'-DNA-Dephosphorylierung von Plasmid-Vektoren.....	25
3.1.10 Ligation von DNA.....	25
3.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
3.1.12 Sequenzierung von DNA.....	26
3.1.12.1 4-Spur-Technik und Auftrennung mittels Polyacrylamidgel.....	26

3.1.12.2 1-Spur-Technik und Auftrennung durch Kapillar-Gelelektrophorese	27
3.2 Mikrobiologische Methoden	28
3.2.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28
3.2.2 Standardtransformation von <i>E. coli</i> -Zellen	28
3.2.3 Schnelltransformation von <i>E. coli</i> -Zellen	28
3.2.4 <i>E. coli</i> -Dauerkulturen	29
3.2.5 Blau-Weiß-Screen (α -Komplementation)	29
3.2.6 MacConkey Assay	29
3.3 Proteinchemische Methoden	30
3.3.1 Proteinexpression	30
3.3.2 Zellernte	30
3.3.3 Zellyse	30
3.3.4 Proteinreinigung durch IMAC	30
3.3.4.1 ... mit Ni^{2+} -IDA	31
3.3.4.2 ... mit Ni^{2+} -NTA	31
3.3.5 Proteinreinigung der GST-Fusionsproteine.	31
3.3.6 Membranpräparation	32
3.3.7 Aufkonzentrierung und Umpufferung	32
3.3.8 Proteinbestimmung	32
3.3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
3.3.10 Western-Blot	33
3.3.11 Cross-Linking	34
3.3.12 Gelfiltrationschromatographie	34
3.3.13 Verdau mit der TEV-Protease	35
3.3.14 Selenomethionin Markierung	35
3.4 Adenylatcyclasetest	35
3.4.1 Nomenklatur und Statistik der Ergebnisse des AC-Tests	36
3.5 Kristallisation	37
3.6 Klonierungen	37
3.6.1 Vorhandene Ausgangsklone	38
3.6.2 Konnektor Mutanten	39
3.6.3 Tsr HAMP Mutanten	45
3.6.4 Afi503 HAMP Mutanten	48
3.6.5 Tsr-Afi503 HAMP Chimären	65
3.6.6 Tar Rezeptor Konstrukte	69
3.6.7 AC-Linker Mutanten	71
3.6.8 Afi503 Holo-Rv3645 Chimären	73
3.6.9 HAMP Kristallisationskonstrukte	74
4 Ergebnisse	75
4.1 Chimären für die biochemische Untersuchung der HAMP Domäne	75
4.1.1 Afi503 HAMP - Rv3645 CHD Chimäre	75
4.1.1.1 Expression, Reinigung und Kinetik der Afi503-Rv3645 Chimäre.	75
4.1.2 Triple-Chimäre	76
4.1.2.1 Expression und Charakterisierung der Tsr-Tsr-WT Chimäre.	77
4.1.2.2 Expression und Charakterisierung der Tsr-Afi503-WT Chimäre.	79
4.1.2.3 Spezifität der Hemmung in der Triple-Chimäre.	80
4.2 Untersuchung des Konnektors in der HAMP Domäne	81
4.2.1 Salzbrücken in Afi503 HAMP	81
4.2.1.1 E302 Mutanten	82
4.2.1.2 R308 Mutanten	84
4.2.1.3 H305 Mutante	85
4.2.1.4 E302/R308 Doppelmutanten	86
4.2.1.5 E302/H305 Doppelmutanten	87
4.2.1.6 H305/R308 Doppelmutanten	89
4.2.1.7 Untersuchung mit Hilfe der Tsr Triple-Chimäre	90
4.2.2 NAAIRS Mutante	91
4.2.3 TEV Mutante	92

4.3 Tsr/Afl503 HAMP Vergleich	95
4.3.1 Austausch der Helices	95
4.3.2 Konserviertes Glutamat	97
4.3.3 Austausch der konservierten Regionen	99
4.3.4 Anpassung der Ladungen	100
4.3.5 Kanonischer Leu-Ile Kern, die LILI Mutanten	102
4.3.6 Austausch der x-da Reste	103
4.3.6.1 I226S und I229A in der Tsr HAMP Domäne	104
4.3.6.2 S288I und A291I in der Afl503 HAMP Domäne	105
4.3.6.2.1 Kinetik der S288I/A291I und der A291I Mutanten	106
4.3.6.2.2 S288I und S288I/A291I Mutationen in Afl503-Rv3645	107
4.4 Mutationen in der Afl503 HAMP Domäne	108
4.4.1 Flankierende Reste	108
4.4.2 Kleine Konnektor-Kontakte	112
4.4.3 Weitere Untersuchung an der A291 Position	114
4.4.3.1 Die Mutante A291F	116
4.4.4 Reste der hydrophilen Dimer-Kontaktfläche	118
4.5 Tar Triple-Chimäre	119
4.6 Untersuchung des Linkers der AC	121
4.8 Kristallisationsversuche	124
4.8.1 S288I und S288I/A291I Mutanten	124
4.8.2 Selenomethionin-Markierung der Rv3645 CHD	126
5 Diskussion	129
5.1 Die Rolle des Konnektors	129
5.2 Die Wechselwirkungen in der Afl503 HAMP Domäne	131
5.3 Das grüne Netzwerk	132
5.4 Interessante Reste in der Afl503 HAMP Domäne	134
5.4.1 Die Bedeutung der x-da Positionen	135
5.4.2 Die Bedeutung der flankierenden Positionen	136
5.4.3 Die Bedeutung der x Position A291	138
5.4.4 Die Bedeutung der Konnektor-Kontakte	140
5.5 Die Rolle des Linkers in der Signalübertragung an der CHD	141
6 Zusammenfassung und Schlussfolgerung	143
7 Anhang	145
A. Datenbanken und Bioinformatik	145
B. Zugriffsnummern der verwendete Gene	145
Literaturverzeichnis	147

Abkürzungen

AC(n)	Adenylatcyclase(n)
<i>A. fulgidus</i> (Af)	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
AS	Amphiphatische Helix (<i>amphiphatic sequence</i>) ¹
AA(s)	Aminosäure(n) ²
CHD	<i>Cyclase Homology Domain</i>
CTR	Konnektor (<i>Connector</i>) ¹
IPTG	Isopropylthiogalactosid
LB–Medium	Luria–Bertani Kulturmedium
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Ni²⁺-IDA	<i>Nickel-Iminodiacetic acid</i>
Ni²⁺-NTA	<i>Nickel-Nitrilotriacetic acid</i>
OD	optische Dichte
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>Standard Error of the Mean</i>)
TEV	Tobacco Etch Virus
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembran
Tsr	Serin-Rezeptor von <i>E. coli</i>
Tar	Aspartat-Rezeptor von <i>E. coli</i>

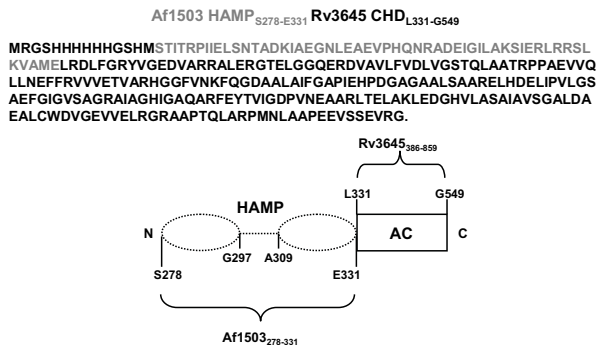
¹ in der Literatur verwendete Bezeichnung.

² die 20 proteinogenen Aminosäuren wurden in der drei-Buchstaben-Abkürzung angegeben. In Kombination mit einer Positionsangabe, bei zwei und mehr aufeinanderfolgenden Aminosäuren und in Namen von Konstrukten wurde das Ein-Buchstaben-Symbol verwendet.

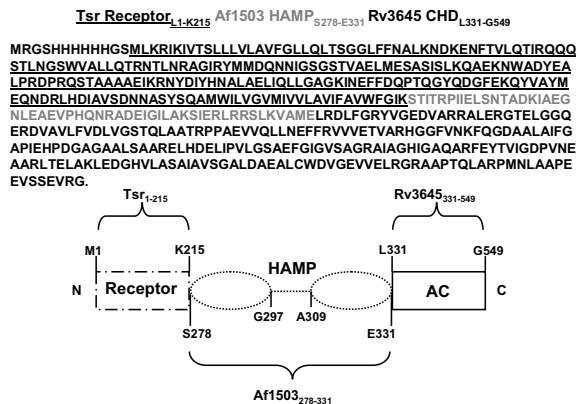
Domänenübersicht und Aminosäuresequenz der verwendeten Chimären

Die Klammern markieren die verschiedenen verwendeten Sequenzbereiche. Die genaue Herkunft und Position in der jeweiligen Ausgangssequenz ist angegeben. Die gestrichelte Linie zeigt Segmente aus Tsr, die gepunktete Linie aus Af1503, die durchgestrichene Linie aus Tar und die durchgehende Linie aus Rv3645.

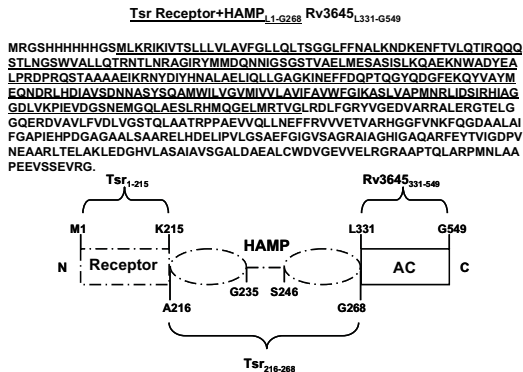
Af1503-Rv3645 Chimäre (Af1503-WT)



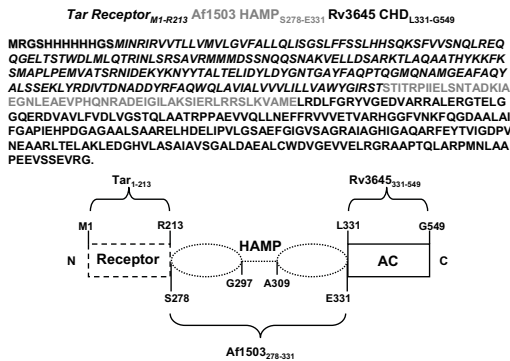
Tsr-Af1503-Rv3645 Chimäre Tsr-Af1503-WT



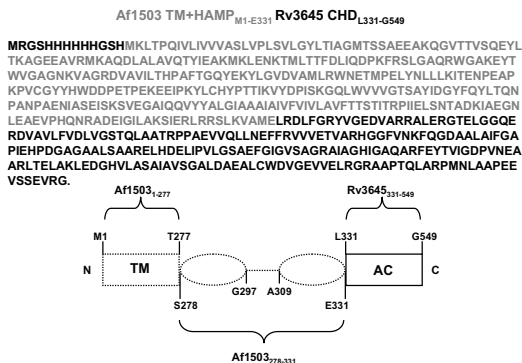
Tsr-Tsr-Rv3645 Chimäre Tsr-Tsr-WT



Tar-Af1503-Rv3645 Chimäre Tar-Af1503-WT



Af1503Holo-Rv3645 Chimäre



Nomenklatur der untersuchten Konstrukte

Für eine bessere Lesbarkeit wurden die untersuchten Konstrukte mit Kurznamen versehen. Konstrukte mit mehreren Mutationen erhielten lediglich eine Nummer (z.B. Mutante 3). Die von A. Lupas entworfenen Konstrukte wurden auch mit Nummern versehen, zusätzlich wurde die Abkürzung LM vorangestellt, um Verwechslungen zu vermeiden.

Kurzname	Klon Beschreibung
Afl503-Rv3645 (Afl503-WT)	HAMP Domäne der Afl503 (278-331) und katalytische Domäne der Rv3645 (331-549)
Tsr-Rv3645 (Tsr-WT)	HAMP Domäne der Tsr (216-268) und katalytische Domäne der Rv3645 (331-549)
Tsr-Afl503-Rv3645 (Tsr-Afl503-WT)	Sensor Domäne der Tsr (1-215), HAMP Domäne der Afl503 (278-331) und katalytische Domäne der Rv3645 (331-549)
Tsr-Tsr-Rv3645 (Tsr-Tsr-WT)	Sensor Domäne der Tsr (1-215), HAMP Domäne der Tsr (216-268) und katalytische Domäne der Rv3645 (331-549)
Tar-Afl503-Rv3645 (Tar-Afl503-WT)	Sensor Domäne der Tar (1-213), HAMP Domäne der Afl503 (278-331) und katalytische Domäne der Rv3645 (331-549)
Afl503 Holo-Rv3645	Transmembranbereich der Afl503 (1-277), HAMP Domäne der Afl503 (278-331) und katalytische Domäne der Rv3645 (331-549)
NAAIRS Mutante	NAAIRS Sequenz zwischen D244 und G245 in der Tsr-Tsr-Rv3645 Chimäre
TEV Mutante	TEV Schnittstelle (ENLYFQG) zwischen D244 und G245 in Tsr-Tsr-Rv3645 Chimäre
Afl503-LILI Mutante	a/d Reste canonical (a=l/d=i) in der Tsr-Afl503-Rv3645 Chimäre; Mutationen: I284L-L287I-A291L-I312-L315I-I319L-L322I
Tsr-LILI Mutante	a/d Reste canonical (a=l/d=i) in der Tsr-Tsr-Rv3645 Chimäre; Mutationen: L218I/M222L/L225/I229L/M249L/L252I/M259I
Mutante 2	Reduktion der Ladungen in Afl503 HAMP in der Tsr-Afl503-Rv3645 Chimäre; Mutationen: E296G-D310N-K317A-R323Q-R324G
Mutante 3	Erhöhung der Ladungen in Tsr HAMP in der Tsr-Tsr-Rv3645 Chimäre; Mutationen: A220R-G234E-N247D-Q260R-G261R
Mutante 4 (Tsr x-da Mutante)	Tsr-Tsr-Rv3645 mit x-da Reste aus Afl503; Mutationen: L218I/M222I/I226S/I229A/M249I/L256I/M259L
Mutante 5	Sensor Domäne der Tsr (1-215), AS1 Tsr (216-234)-CTR Tsr (235-246)-AS2 Afl503 (310-331) und CHD der Rv3645 (331-549)
Mutante 6	Sensor Domäne der Tsr (1-215), AS1 Afl503 (278-296)-CTR Tsr (235-246)-AS2 Tsr (247-268) und CHD der Rv3645 (331-549)
Mutante 7	Sensor Domäne der Tsr (1-215), AS1 Afl503 (278-297)-CTR Afl503 (235-246)-AS2 Tsr (247-268) und CHD der Rv3645 (331-549)

Kurzname	Klon Beschreibung
Mutante 8	Sensor Domäne der Tsr (1-215), AS1 Tsr (216-234)-Linker Af1503 (297-309)-AS2 Af1503 (310-331) und CHD der Rv3645 (331-549)
Mutante 10	Tsr-Tsr-Rv3645 mit Konservierten Regionen aus Af1503; Mutationen: V219T-A220R- M222I-N223I-N347D-M350I
Mutante 11 (Af1503 x-da Mutante)	Tsr-Af1503-Rv3645 mit x-da Reste aus Tsr; Mutationen: I280L-I284M-S288I-A291I-I312M-I319L-L322M
Tar- x-da Tsr Mutante	Tar-Af1503-Rv3645 mit x-da Reste aus Tsr; Mutationen: I280L-I284M-S288I-A291I-I312M-I319L-L322M
Tar- x-da Tar Mutante	Tar-Af1503-Rv3645 mit x-da Reste aus Tar; Mutationen: I280L-I284L-L287I-S288I-A291I-I312M-I319V-L322M
Mutante LM3	Tsr-Af1503-Rv3645 mit „grünem Netzwerk“ aus Tsr; Mutationen: I280L-T281V-I284M-R308G-A309S-D310N-I312M
Mutante LM4	Tsr-Tsr-Rv3645 mit „grünem Netzwerk“ aus Af1503; Mutationen: L218I-V219T-M222I-G345R-S346A-N347D-M350I
Rv3645 CHD	Katalytische Domäne der Rv3645 ab GQE (356-549)
Rv3645 CHD mit linker	Katalytische Domäne der Rv3645 ab DL (333-549)
HAMP-CHD Rv3645	HAMP und katalytische Domäne der Rv3645 ab GKE (278-549)