

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Einleitung	3
2.1 Vorkommen und Funktion von Adenylatzyklasten und Phosphodiesterasen	3
2.2 Klassifizierung von Adenylatzyklasten und Phosphodiesterasen	7
2.3 Lebenszyklus von <i>T. brucei</i>	10
2.4 Rolle der tACs im cAMP-vermittelten Signaltransduktionsweg von <i>T. brucei</i>	12
2.5 Zielsetzung	13
3. Material und Methoden	15
3.1 Material	15
3.1.1 Bakterienstämme	15
3.1.2 Oligonukleotide	15
3.1.3 Herstellerfirmen der verwendeten Geräte und Chemikalien	17
3.2 Stammlösungen, Medien und Puffer	19
3.3 Molekularbiologische Methoden	21
3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
3.3.2 Propagierung und Aufbewahrung von <i>E. coli</i>	22
3.3.3 Präparation kompetenter Zellen	22
3.3.4 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	22
3.3.5 Restriktionsverdau von DNA	23
3.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten	23
3.3.7 Gelelektrophorese von DNA	23
3.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	24
3.3.9 DNA-Sequenzierung	24
3.3.10 Transformation von <i>E. coli</i>	24
3.3.11 Ortspezifische Mutagenese nach der Zwei-Schritt-PCR-Methode	25
3.4 Proteinchemische Methoden	25
3.4.1 Expression	25
3.4.2 Zellaufschluß	26
3.4.3 SDS-Gelelektrophorese	26
3.4.4 Färben von SDS-Gelen	27
3.4.5 Western Blot	28
3.4.6 Proteinbestimmung nach Bradford	28
3.4.7 Aufkonzentrierung von Proteinen	28
3.4.8 Rückfaltung von Proteinen durch Dialyse	29
3.4.9 Reinigung rekombinanter Proteine mittels immobilisierter Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC)	29
3.4.10 Reinigung rekombinanter Proteine durch Gelfiltration	30
3.4.11 Reinigung rekombinanter Proteine mit Ionenaustauscherchromatographie	31
3.4.12 Limitierte Proteolyse	32
3.4.13 Thrombinspaltung von PDE1/His ₆ -Fusionsproteinen	33
3.4.14 Proteinsequenzanalysen	33
3.4.15 Adenylatzyklase-Aktivitätstest	33
3.4.16 Phosphodieesterase-Aktivitätstest	34
3.4.17 Analytische Gelfiltration	34
3.5 Proteinkristallographische Methoden	34
3.5.1 Techniken der Proteinkristallisation	34
3.5.2 Kristallographische Datenerfassung	35
3.5.3 Datenprozessierung	36
3.5.4 Das Phasenproblem	37

3.6	Erzeugung strukturbasierter Sequenzvergleiche und Berechnung phylogenetischer Verwandtschaften	43
4.	<i>Ergebnisse</i>	44
4.1	Die trypanosomalen Adenylatzyklen GRESAG4.1, GRESAG4.3 und ESAG4	44
4.1.1	Rekombinante Produktion von katalytisch aktiven tAC-Fragmenten	44
4.1.2	Biochemische Charakterisierung von GRESAG4.1-(A884-Y1241), GRESAG 4.3-(A867-V1229) und ESAG4-(P897-R1269)	45
4.1.3	Röntgenstrukturanalyse von GRESAG4.1-(A884-T1131) und der GRESAG4.3-AC-Domäne	52
4.1.4	Aktivitätsstudien an Mutanten der katalytischen Oberfläche von GRESAG4.1	63
4.1.5	Der monomere Assoziationszustand der tACs	65
4.2	Die trypanosomale PDE 1	69
4.2.1	Rekombinante Produktion der trypanosomalen PDE1 sowie der N-terminalen Verkürzungen PDE1-(R189-T620) und PDE1-(K321-T620)	69
4.2.2	Biochemische Charakterisierung der PDE1-(R189-T620)	71
5.	<i>Diskussion</i>	75
5.1	Gegenwärtiger Stand der Struktur- Funktionsuntersuchungen von ACs	75
5.2	Rekombinante trypanosomale ACs: enzymologische Charakterisierung und Domänenkartierung	76
5.3	Strukturvergleich der tACs mit verwandten Proteinen	77
5.4	Der monomere Zustand der tACs	82
5.5	Die aktive Oberfläche der tACs und ihre Implikationen für den Katalysemechanismus von Nukleotidzyklen	88
5.6	Die D-DTT Bindungsstelle - ein Fall von molekularer Mimikry?	94
5.7	Hypothese einer metabolisch gekoppelten konstitutiven Regulation der tAC Aktivität	97
6.	<i>Zusammenfassung</i>	101
7.	<i>Anhang</i>	103
7.1	Abkürzungen	103
7.2	Sparse Matrix Screening	104
7.3	Aminosäuresequenzen	105
7.4	Sequenzalignment	109
7.5	GRESAG4.1-(A884-T1131) und der GRESAG4.3-AC-Domäne Datensätze	110
8.	<i>Danksagung</i>	112
9.	<i>Lebenslauf</i>	114
10.	<i>Literaturverzeichnis</i>	115

2. Einleitung

2.1 Vorkommen und Funktion von Adenylatzyklasten und Phosphodiesterasen

Im Jahre 1956 entdeckte Earl Sutherland zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ein Molekül, das sich seither als ein ubiquitärer, sowohl in Eukaryonten als auch Eubakterien verbreiteter sekundärer Botenstoff erwiesen hat (Sutherland & Rall, 1958). Stimulationen durch extrazelluläre Reize, Variationen des Nährstoffangebotes oder anderer Umweltbedingungen induzieren die Synthese dieses zellulären Signalmoleküls. cAMP greift regulativ in Prozesse auf molekularer Ebene ein und bewirkt so eine Zellantwort innerhalb weniger Sekunden bis Minuten. In Prokaryonten dient cAMP als Hungersignal, das über die Aktivierung des cAMP-bindenden Proteins (CRP-Protein) die Transkription von Operonen aktiviert, um alternative Metabolite nutzbar zu machen (Ullmann & Danchin, 1982; Zubay *et al.*, 1970). Von einigen Prokaryonten wie z. B. *Bordetella pertussis* und *Bacillus anthracis* werden hochaktive Adenylatzyklasten als Toxine eingesetzt, die von den Pathogenen sezerniert und über einen calciumabhängigen Mechanismus von den Wirtszellen internalisiert werden. Hier verursachen sie innerhalb von Sekunden einen 20-200 fachen cAMP Konzentrationsanstieg, der zu einer Kompromittierung der Immunantwort führt (Ladant & Ullmann, 1999). Des weiteren wirkt cAMP in einigen Eubakterien und Protozoen, wie *Stigmatella aurantiaca* und *Dictyostelium discoideum* als Hormon, das unter ungünstigen Lebensbedingungen sezerniert wird (Coudart-Cavalli *et al.*, 1997; Pitt *et al.*, 1992). Die Hauptfunktion von cAMP in Eukaryonten ist jedoch die eines sekundären Botenstoffes. Dieser ist an der Regulation metabolischer Abläufe, Synthese bzw. Degradation der cytoskelettalen Struktur (Grimaldi *et al.*, 1999; McConnell *et al.*, 1997; Naula & Seebeck, 2000) und der Genexpression über die Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren beteiligt. Dabei erfolgt die Steuerung dieser Prozesse nahezu ausschließlich über die Aktivierung der Proteinkinase A, dem Schlüsselenzym zahlreicher Phosphorylierungskaskaden (Francis & Corbin, 1994; Krebs, 1989; Taylor *et al.*, 1990; Welch &

Van Patten, 1994). Eukaryontische Adenylatzyklen (AC) nehmen eine Schlüsselstellung als Effektorproteine vieler Hormone ein, die über G-Protein gekoppelte Rezeptoren wirken. Dabei sind im allgemeinen die α -Untereinheiten trimerer G-Proteine die Mediatormoleküle, wobei die G_s Untereinheiten stimulatorischer G-Proteine (G_s) aktivierend, die G_i -Untereinheiten inhibitorischer G-Proteine (G_i) inhibierend wirken (Sunahara *et al.*, 1997). Die β -Untereinheiten selbst sind weniger starke Effektoren und üben lediglich in größeren Konzentrationen einen nennenswerten Effekt auf die ACs aus (Chen *et al.*, 1995; Tang & Gilman, 1991). Eine vorwiegende Lokalisation der Adenylatzyklen an der Zytoplasmamembran in der Nähe der Rezeptorproteine sorgt für eine Minimierung der Distanz, die von Effektormolekülen durch zweidimensionale Diffusion zurückgelegt werden muß, was die Effektivität der Reizantwort erhöht (Ross *et al.*, 1977).

Das Substrat der Adenylatzyklenreaktion ist Adenosintriphosphat (ATP), ein universell auftretendes, energieübertragendes Molekül, dessen ständige Verfügbarkeit von der Zelle gewährleistet wird. Die Synthese des cyclischen Phosphodiesters, der selbst in keinen Stoffwechselweg involviert ist, verläuft über eine endergonische intramolekulare Zyklisierungsreaktion, in der als weiteres Produkt Pyrophosphat freigesetzt wird. Da dieses durch ubiquitäre Pyrophosphatasen in einer exergonischen Reaktion hydrolysiert wird, verläuft die Bruttoreaktion der cAMP-Biosynthese exergonisch. Die Phosphoesterbindung zwischen der 3'-Hydroxyfunktion der Ribose und dem γ -Phosphat im cAMP ist metastabil, weshalb das Molekül nicht spontan zu AMP hydrolysiert, die von Phosphodiesterasen katalysierte Reaktion jedoch exergonisch verläuft (Abb. 1). Die kinetischen Eigenschaften von cAMP und die Thermodynamik sowohl seiner Synthese- als auch Hydrolysereaktion garantieren seine kurzfristige Verfügbarkeit, womit eine schnelle Adaptation des cAMP-Spiegels gewährleistet wird.

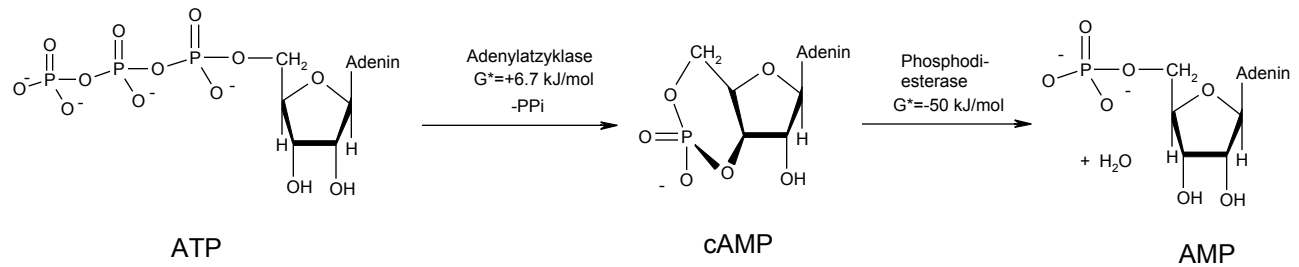
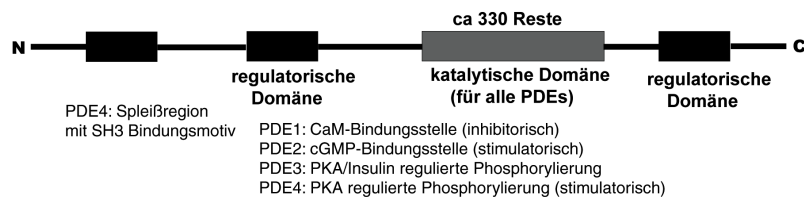


Abbildung 1: Reaktionsgleichungen der leicht endergonischen, von Adenylatzyklasen katalysierten cAMP-Synthese und der exergonischen, von Phosphodiesterasen katalysierten Hydrolyse zu AMP.

Die Fülle zellulärer Vorgänge, die einer Steuerung durch cAMP unterworfen sind, erfordern eine genaue Regulation des cAMP-Signals. Deshalb existieren in eukaryontischen Adenylatzyklasen neben der Steuerung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren eine Reihe weiterer Regulationsmechanismen durch zytosolisch lokalisierte Effektoren.

Phosphodiesterasen



Adenylatzyklasen

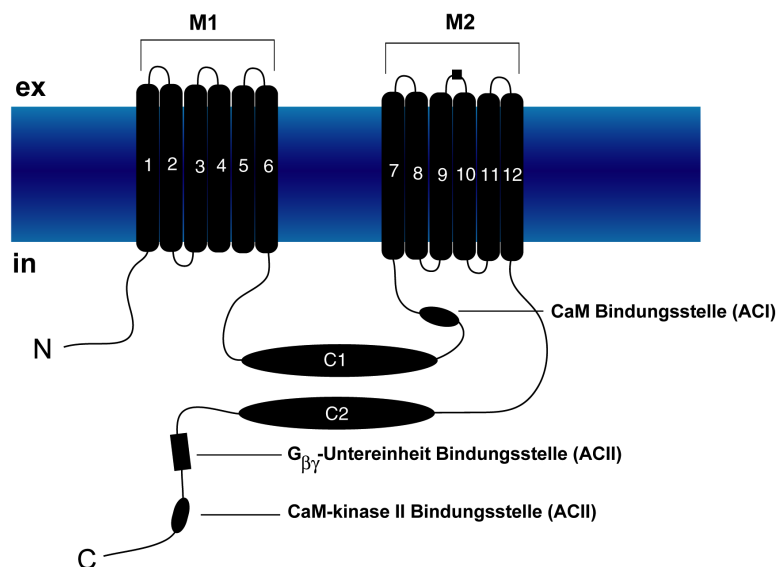


Abbildung 2: Überblick über die isozymspezifischen Regulationsmechanismen von Phosphodiesterasen und Adenylatzyklasen. Die Regionen, an denen die Wechselwirkungen der Enzyme mit ihren Effektormolekülen stattfinden, sind schematisch dargestellt. Interessanterweise finden die meisten Wechselwirkungen nicht direkt an den katalytischen Domänen, sondern vielmehr

Da es sich bei diesen selbst um sekundäre Botenstoffe wie Ca^{2+} /Calmodulin (Ca^{2+} /CaM) oder freies Calcium handeln kann, erfolgt auf diese Weise eine Vernetzung der cAMP-Signalkaskade mit anderen Signaltransduktionswegen, womit die cAMP-Signalkaskade in den Kontext des zellulären Signalhaushaltes eingegliedert wird. Ein weiterer Steuerungsmechanismus sind die durch Proteinkinasen vermittelten Phosphorylierungen spezifischer Regionen der Adenylatzyklasen. Im allgemeinen wirkt die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC) stimulatorisch, während die Proteinkinase A (PKA) durch Inhibition eine Rückkopplung in der cAMP-Synthese bewirkt (Sunahara *et al.*, 1996). Die Komplexizität der Steuerungsmechanismen wird in höheren Organismen über die gewebespezifische Expression von Isozymen zusätzlich gesteigert. In Säugern sind bisher neun verschiedene Isoformen (AC1-AC9) bekannt (Krupinski & Cali, 1998; Sunahara *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1998), die sich sowohl durch ihre Gewebespezifität als auch in ihren Regulationsmechanismen unterscheiden.

Phosphodiesterasen für zyklische Nukleotide bilden eine große Multigenfamilie (Beavo, 1995; Conti *et al.*, 1995; Manganiello *et al.*, 1995), die eine essentielle Rolle in der cAMP-Signaltermination und der Etablierung einer gesteuerten Zellantwort spielen. Die Vertreter dieser Multigenfamilie unterscheiden sich zum einen durch ihre Substratspezifität, zum anderen durch die Regulationsmechanismen, denen sie unterliegen. Phosphodiesterasen können wie die Transducin-aktivierte PDE6 cGMP-spezifisch sein, cAMP-spezifisch wie die PDE3, -4, -7, oder aber sie sind wie PDE1 und PDE2 promiskuitiv bezüglich der Substratwahl (Houslay & Milligan, 1997). Für PDEs existieren eine Reihe von Regulationsmechanismen, die neben Effektormolekülen, wie Ca^{2+} /Calmodulin (Ca^{2+} /CaM) und cGMP auch Phosphorylierungsreaktionen mit einschließen (Beard *et al.*, 1984). Im Gegensatz zu den Adenylatzyklasen liegen Phosphodiesterasen zytosolisch, bzw. über Ankerproteine am Zytoskelett immobilisiert vor (Houslay & Milligan, 1997). Die räumliche Verteilung dieser antagonistischen Enzyme der cAMP-Signaltransduktionskaskade sowie ihre präzise Regulation

seinem Ursprungsort, der Plasmamembran. Somit wird die Aktivierung unerwünschter Prozesse vermieden und eine spezifische Zellantwort auf den das Signal auslösenden, extrazellulären Reiz erreicht.

2.2 Klassifizierung von Adenylatzyklen und Phosphodiesterasen

Aufgrund ihrer Topologie können Adenylatzyklen in vier Klassen unterteilt werden (Tang & Gilman, 1992; Abbildung 3).

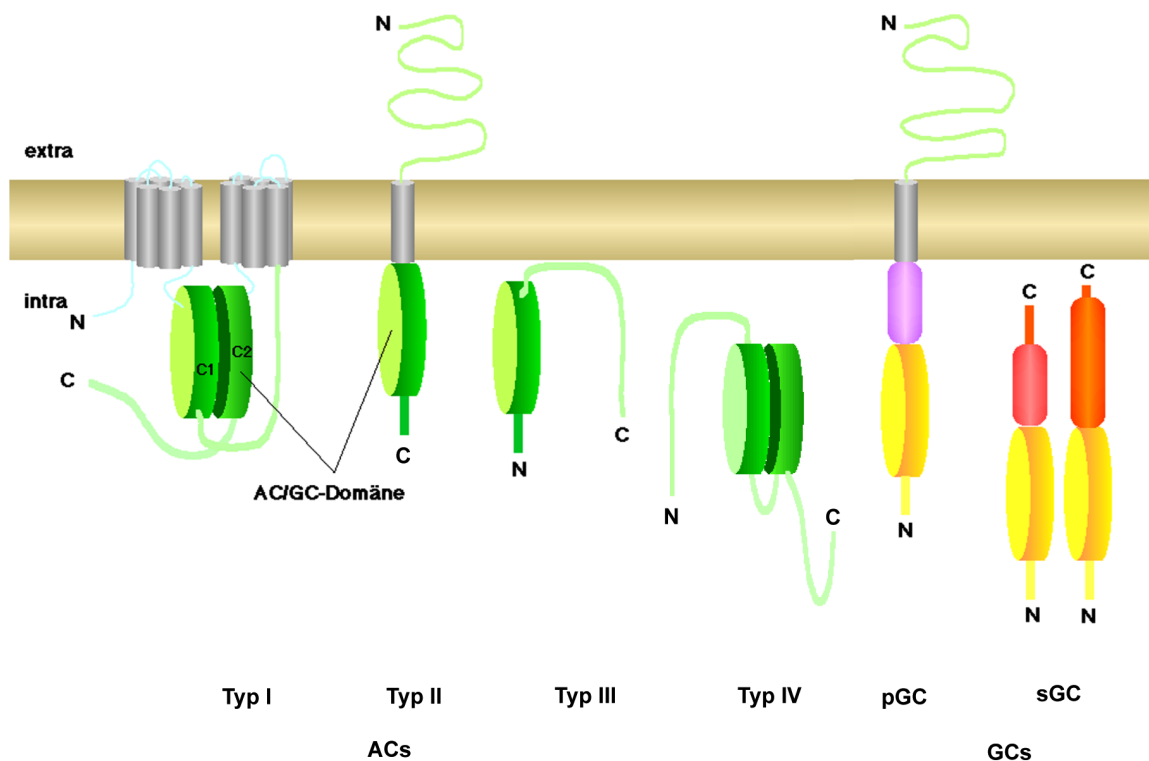


Abbildung 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Vertreter der Nukleotidzyklen. Die vier AC-Klassen werden anhand ihrer Topologie unterteilt. Der Vergleich der Klasse II ACs mit den pGCs macht die topologische Verwandtschaft dieser beiden Enzyme deutlich.

Klasse I Adenylatzyklen, wie die ACA aus *Dictyostelium discoideum*, sind vornehmlich in Metazoen vertretene, integrale, glykosylierte Membranproteine. Die ca. 120 kDa großen Proteine bestehen aus insgesamt 12 Transmembranhelices und zwei cytosolischen Regionen C1 und C2. C1 unterteilt die Transmembranhelices in zwei Cluster M1 und M2 á 6 TM-Helices und bildet mit der C-terminalen, cytosolischen Region C2 das katalytische Zentrum aus. Die Domänen

womit sie an der Steuerung der Enzymaktivität beteiligt sind (Tesmer & Sprang, 1998). Weiterhin wird vermutet, daß M1 und M2 als Spannungssensoren dienen, die konformell die katalytische Aktivität regulieren können (Reddy *et al.*, 1995). C1 und C2 sind zueinander und zu den katalytischen Domänen der Guanylatzyklen homolog und bilden die katalytische Einheit dieser ACs aus (Dessauer & Gilman, 1996; Whisnant *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996). C1 ist die Bindungsstelle für die inhibitorische G-Protein -Untereinheit G_i , während C2 die primäre Bindungsstelle für G_s und die putative Bindungsstelle für G ist (Chen *et al.*, 1995; Tang & Gilman, 1991). Desweiteren besitzt C2 Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC) und die Calmodulin(CaM)-abhängige Kinase II, CaM-Kinase IV und PKA (Anagli *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997; Wayman *et al.*, 1996).

Klasse II Adenylatzyklen sind in ihrem Vorkommen vornehmlich auf Protozoen beschränkte, integrale Transmembranproteine mit nur einer Transmembranhelix. Diese verbindet die ca. 80 kDa große extrazelluläre Region mit der zytosolischen Region, auf der die katalytische Domäne lokalisiert ist. Ein Sequenzvergleich zwischen Klasse II Adenylatzyklen und Klasse I Adenylatzyklen zeigt eine relativ geringe Homologie zwischen diesen beiden Vertretern, lediglich die katalytische Region beider AC-Klassen weist konservierte Reste auf. Desweiteren unterscheiden sich die beiden AC-Familien deutlich in ihren Regulationsmechanismen. Bei Klasse II Adenylatzyklen konnte bisher weder eine G-Protein gekoppelte Regulation beobachtet werden, noch haben Verbindungen, die als Aktivatoren der Klasse I Adenylatzyklen bekannt sind, wie z. B. GTP S, Gpp(NH)p, Forskolin, Cholera- und Pertussistoxine einen Einfluß auf ihre Aktivität. Hiermit verhalten sich die Klasse II Adenylatzyklen analog zu den G-Protein unabhängigen, membrangebundenen Guanylatzyklen (pGCs) (Danchin, 1993; Garbers, 1989; Pitt *et al.*, 1992). Zudem weisen Klasse II Adenylatzyklen topologisch eine engere Verwandtschaft zu den membrangebundenen rezeptorartigen Guanylatzyklen auf, als zu anderen Vertretern der AC Familie auf. Daher wird

zugesprochen, die für die extrazelluläre Region der pGCs bereits gezeigt wurde (Chinkers & Garbers, 1989; Schulz *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 1988).

Klasse III Adenylatzyklen sind lediglich peripher membranassoziierte Proteine in Pilzen, wie z.B. *S. cerevisiae*. Klasse IV Adenylatzyklen sind dagegen lösliche Proteine und kommen sowohl in Eubakterien wie *Stigmatella aurantiaca* (Coudart-Cavalli *et al.*, 1997), als auch in Hoden von Säugern sowie in Insektenzellen vor (Buck *et al.*, 1999; Kawabe *et al.*, 1996). Somit scheint diese Zyklenklasse ein Verbindungsglied zwischen bakteriellen und ACs aus Säugern zu sein (Ladant & Ullmann, 1999).

Allen Nukleotidzyklen gemeinsam - unabhängig von ihrer Lokalisation in der Zelle - ist eine 220-250 Aminosäurereste große katalytische Domäne, die sich durch einen hohen Konservierungsgrad gegenüber den übrigen Proteinregionen auszeichnet.

PDEs bestehen im allgemeinen aus einer ca. 330 Aminosäurereste großen katalytischen Domäne, einer N-terminalen regulatorischen Domäne für die Bindung von Kofaktoren und in manchen Fällen einer C-terminalen Domäne mit bisher unbekannter Funktion (Houslay & Milligan, 1997). Bisher sind neun PDE-Familien aufgrund von Sequenzhomologie, Substratspezifität, Affinität, Sensitivität gegenüber Kofaktoren bzw. Inhibitoren definiert worden (Beavo, 1995). Diese scheinbar willkürliche Unterteilung in neun Familien spiegelt sich auf der Ebene der Proteinsequenzen wieder. Die Sequenzidentität über den Bereich der katalytischen Domäne liegt bei ca. 30 % zwischen den einzelnen Familien, die Isozyme einer Familie weisen dagegen 85-95 % Sequenzidentität auf. Desweiteren liegt innerhalb einer Enzymfamilie auch außerhalb der katalytischen Domäne eine ausgeprägte Sequenzidentität (> 60 %) vor (Fisher *et al.*, 1998). Die Existenz einer multiplen PDE-Familie, vieler Isozyme und Spleißvarianten ermöglicht eine komplexe Regulation der zytosolischen cNMP-Konzentration.

2.3 Lebenszyklus von *T. brucei*

Trypanosomen sind parasitär lebende Protozoen, die durch die blutsaugenden Tse-Tse-Fliege auf Säugetiere übertragen werden (Vickerman, 1985). Sie verursachen eine Reihe chronischer Infektionen, wie die afrikanische durch *Trypanosoma brucei* verursachte Schlafkrankheit beim Menschen oder Nagana bei Rindern. Bei der Schlafkrankheit handelt es sich um eine verheerende Krankheit, die jährlich mehr als 50.000 Todesfälle verursacht, während die Bekämpfung der Viehseuche Nagana auch aus ökonomischen Gründen von großer Bedeutung ist. Als Konsequenz dieser Seuche sind mindestens 10 Millionen Quadratkilometer potentiellen Weidelandes in 37 Ländern Afrikas nicht nutzbar (Kuzoe, 1993).

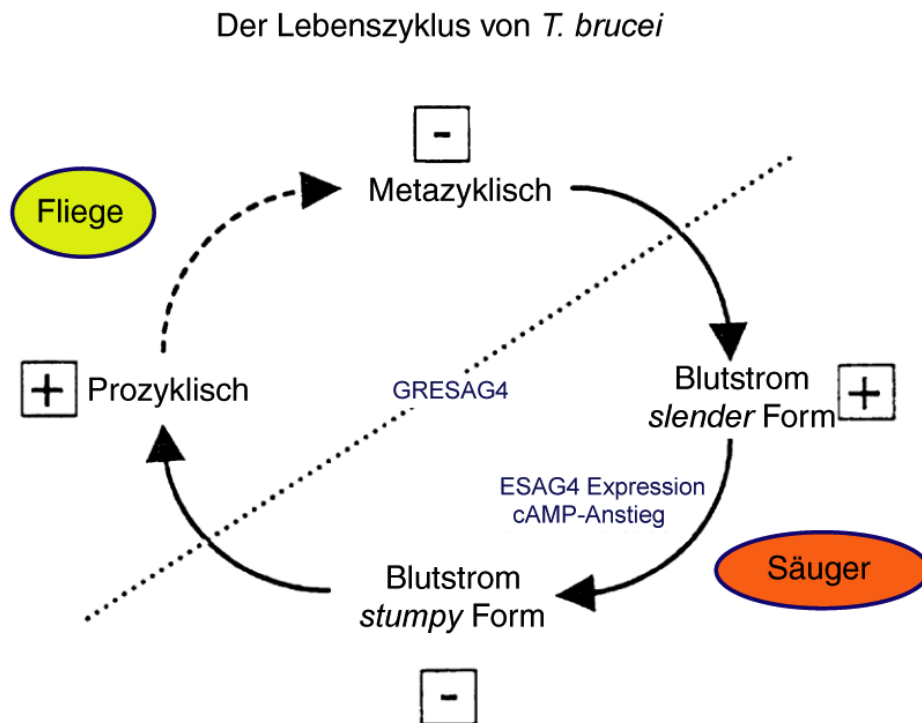


Abbildung 4: Der Lebenszyklus von *T. brucei* kennzeichnet sich durch einen zweimaligen Wirtswechsel aus (durch die gestrichelte Linie sind die Stadien in den jeweiligen Wirtinnen voneinander getrennt). Die Vorbereitung für den nächsten Wirtswechsel wird jeweils durch eine Zelltransformation von einer proliferierenden Form (+) in eine infektiöse Form (-) eingeleitet. Dabei wird die Transformation im Säuger durch einen Anstieg der cAMP

Die Plasmamembran des Parasiten erfüllt eine wichtige biologische Funktion. Sie isoliert das intrazelluläre Milieu des Parasiten von den verschiedenen extrazellulären Umweltbedingungen im Säugerwirt und dem arthropoiden Vektor, ist aber gleichzeitig zur Resorption von Nährstoffen und Ionen befähigt (Pays & Nolan, 1998). Im arthropoiden Vektor muß der parasitäre Einzeller vor dem lytischen Milieu in Speicheldrüse und Darmtrakt geschützt sein, während er im Blutstrom des Säugers eine Abwehr gegen das Immunsystem des Wirtes aufweisen muß. Dies erreicht der Parasit durch einen komplexen Lebenszyklus, der mit dem Wirtswechsel synergetisch verlaufenden, morphologischen Veränderungen verbunden ist (Abbildung 4). Während der Transformation des Parasiten findet eine erhebliche Modifikation der Proteinzusammensetzung der Plasmamembran statt, so daß sie den jeweiligen Bedingungen im Wirt optimal angepaßt ist. So ist die Plasmamembran der im Insektenvektor vorkommenden procyclischen Form des Parasiten größtenteils von einem einzigen hochkonservierten Protein dem sogenannten Procyclin, überzogen (Pays & Nolan, 1998). Procyclin ist aufgrund seiner Proteaseresistenz geeignet den Einzeller vor den in hohen Konzentrationen in Darmtrakt und Speicheldrüse vertretenen Proteasen zu schützen. Dagegen lebt die Blutstromform des Parasiten im Säugerwirt in einem gut gepufferten, Glukose-reichen Milieu. Die hauptsächliche Bedrohung rührt hier von dem Immunsystem des Wirtes her. Diesem entgeht der Parasit durch Variation seiner antigenen Zelloberfläche mittels sequentieller Expression eines immunodominanten variablen Oberflächenglykoproteins (VSG), das die antigene Hülle des Parasiten ausbildet (Pays & Nolan, 1998). Die für die VSG-Proteine kodierenden Gene existieren in bis zu 200-facher Kopienzahl in der Zelle, wobei jeweils nur eines der Gene pro Generation exprimiert wird. Während der chronischen Infektion des Säugerwirtes muß der Parasit Vorkehrungen für einen erneuten Wirtswechsel treffen, der mit einer sofortigen Änderung der Lebensbedingungen verbunden ist. Aus diesem Grund findet bei einem gewissen Anteil der Blutstrompopulation eine Zelltransformation statt, bei der die proliferierende, aufgrund ihres morphologischen

short-stumpy-Form differenziert. Die Transformation wird durch einen von allen *long-slender*-Zellen konstitutiv sezernierten Zelldichtefaktor (SIF) induziert, dessen Konzentration im Blutstrom von der Populationsdichte abhängt (Vassella *et al.*, 1997). Dies gewährleistet zum einen die ständige Gegenwart infektiöser Zellen innerhalb einer Parasitenpopulation, zum anderen wird Sorge dafür getragen, daß die Populationsdichte keine für den Wirt lethalen Wert erreicht. Zwar sind beide im Blutstrom lebende Zellformen zur Differentiation in die prozyklische Form befähigt, jedoch ist die *short-stumpy*-Form dazu weitaus besser adaptiert (Bass & Wang, 1991). Die Transformation in die nicht-proliferierende *short-stumpy*-Form wird durch die Aktivität der Klasse II Adenylatzyklasten des Organismus reguliert, die einen signifikanten Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration induzieren. Mit dem cAMP-Konzentrationsanstieg gehen grundlegende Änderungen im Metabolismus des Parasiten einher. Die *long-slender* Zellen verwenden aus dem Blutplasma resorbierte Glukose als einzige Energiequelle. Diese wird in Glykosomen anaerob zu 3-Phosphoglyzerat katabolisiert, welches anschließend im Zytosol zu Pyruvat verstoffwechselt und von den Zellen sezerniert wird. In der *short-stumpy*-Form, die eine stark verringerte Stoffwechselaktivität zeigt, werden Mitochondrien ausgebildet, die jedoch noch keine Stoffwechselaktivität zeigen. Innerhalb der ersten 15 min nach erfolgtem Wirtswechsel adaptiert sich der Parasit an die aeroben Lebensbedingungen, und die im Insekt lebende prozyklische Form ist somit zur oxidativen Phosphorylierung befähigt und katabolisiert Pyruvat aerob über den Krebszyklus (Matthews, 1999; Tielens & Van Hellemond, 1998).

2.4 Rolle der tACs im cAMP-vermittelten Signaltransduktionsweg von *T. brucei*

Mit der VSG-Genregion sind eine Reihe von Klasse II Adenylatzyklase Genen assoziiert, die somit ebenfalls in hoher Kopienzahl im Genom des Parasiten präsent (Alexandre *et al.*, 1996). Eines dieser Klasse II Adenylatzyklase-Gene, das in mindestens sechs Kopien in der Zelle

VSG-Promotors steht und wie alle VSG-Gene lediglich in der Blutstromform des Parasiten transkribiert und exprimiert wird. Dem ESAG4 Gen sind weitere für Klasse II Adenylatzyklen kodierende Gene GRESAG4.1-4.4 benachbart, die konstitutiv exprimiert werden und wie das GRESAG4.1-Gen, das in mindestens neun Kopien pro Zelle vorhanden ist, in mehreren Kopien in der Zelle vertreten sind (Paindavoine *et al.*, 1992; Naula *et al.*, in press). In vitro Studien an monomorphen *T. brucei*-Stämmen haben ergeben, daß der parasitäre Lebenszyklus über Variationen der intrazellulären cAMP-Konzentrationen gesteuert wird (Naula & Seebeck, 2000). Dabei tritt an zwei Stellen im parasitären Lebenszyklus ein signifikanter Aktivitätsanstieg der Adenylatzyklaseaktivität auf: Der erste erfolgt 6-10 h nach Induktion der Zelldifferentiation in die prozyklische Insektenform. Den zweiten Aktivitätsanstieg beobachtet man sofort nach der Scherung des VSG-Mantels und vor der ersten Zellteilung der prozyklischen Form. Die Adenylatzyklaseaktivität kann durch Inhibitor der PKC stimuliert werden, was zu einer Freisetzung des VSG-Oberflächenmantels führt. Trotzdem konnte gezeigt werden, daß diese beiden Effekte unabhängig voneinander sind. Jüngste Studien haben ergeben, daß der zytosolischen cAMP-Konzentration ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der Differentiation der long-slender-Form in die *short-stumpy*-Form zukommt. Diese Differentiation wird durch den Zelldichtefaktor SIF induziert, der ab einer bestimmten Populationsdichte von den Zellen sezerniert wird. Da sowohl membranpermeable cAMP-Analoga, als auch PDE-Inhibitoren wie Ethazolol, analog zu SIF die Zelldifferentiation einleiten (Vassella *et al.*, 1997) wird vermutet, daß der Zelldichtefaktor SIF *in vivo* über den cAMP-Signaltransduktionsweg die Zelldifferentiation einleitet.

2.5 Zielsetzung

Bisher wurden die meisten biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen an Säuger Klasse I Adenylatzyklen durchgeführt, vor allem seit der Entdeckung, daß lösliche Subsegmente dieser Enzyme den größten Teil des katalytischen und regulatorischen

Eigenschaften dieser Proteine besitzen (Yan et al., 1996). In Klasse I Adenylatzyklen konnte gezeigt werden, daß die intramolekulare Assoziation zweier homologer AC/GC-Domänen, C1 und C2 , zu einem Pseudo-Heterodimer für die Ausbildung des katalytischen Zentrums notwendig ist (Dessauer & Gilman, 1996; Whisnant et al., 1996). Trotz der guten Charakterisierung der Klasse I Adenylatzyklen, sowie ihrer strukturellen Analyse sind eine Reihe von Fragen hinsichtlich des katalytischen und regulatorischen Mechanismus ungeklärt, bzw. lediglich am Beispiel der Klasse I Adenylatzyklen genau studiert worden. Funktionelle und strukturelle Studien weiterer Familien dieser Enzymklasse sind daher notwendig, um einen für alle Nukleotidzyklen allgemeingültigen Regulations- und Katalysemechanismus aufzeigen zu können. In dieser Arbeit wurden die Klasse II Adenylatzyklen aus *T. brucei* aufgrund ihrer im Vergleich zu den Klasse I Adenylatzyklen weniger komplexen Architektur als Modell für funktionelle und strukturelle Studien gewählt. Diese parasitären Klasse II Adenylatzyklen sind außerdem aufgrund ihrer physiologischen Schlüsselstellung als Regulatorproteine des parasitären Lebenszyklus pharmakologisch besonders interessante Untersuchungsobjekte. Tatsächlich zielen nahezu die Hälfte der hundert meistverwendeten Pharmazeutika zur Bekämpfung der Schlafkrankheit in ihrer Wirkung auf die Signaltransduktionswege des Parasiten ab (Naula & Seebeck, 2000). Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit, mit Hilfe molekularbiologischer und proteinchemischer Methoden eine fundierte Charakterisierung der trypanosomalen Klasse II Adenylatzyklen ESAG4, GRESAG4.1 und GRESAG4.3 durchzuführen und weiterhin mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse Einblicke in die strukturellen Eigenschaften dieser Enzymfamilie zu gewinnen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden für die Klonierung und Plasmidisolierung verwendet.

XL1-Blue (Bullock et al, 1987) *E. coli* K12 Sicherheitsstamm

sup E44, hsdR17, recA1, gyrAS46, thi-1, relA1, lac⁻, [F' proAB⁺, lacI^qlacZ M15, Tn10(tet^r)]

BL21(DE3) *E. coli* B Stamm (Studier & Moffat, 1986)

F⁻, ompT, hsdS_B(r_B⁻m_B⁻), gal, dcm, (DE3)

3.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit einem automatischen DNA-Synthesegerät (Applied Biosystems 380 B) nach der Phosphoramidit-Methode hergestellt. Die Restriktionsschnittstellen in den Klonierungsprimern, bzw. das mutagenisierte Codon in den Mutageneseprimern sind unterstrichen.

Klonierungsprimer:

GRESAG4.1-(A884-Y1241)

gr41cat_fwd: 5'-GCTGTGATCAGCTAGCGGTGCGGAACGTCGTAACAAC (NheI)

gr41back: 5'-CTCGCTCGAGCTATCATTAGTATTCCTGAAGGTGCATGTG (XhoI)

GRESAG4.3-(A867-V1229)

gr43cat_fwd: 5'-GCGGATCCGCTAGCGGAAGTTGCGTGCTTCACTCTC (NheI)

gr43term: 5'-CTCGCTCGAGCACAATAAAGGGG (XhoI)

ESAG4-(P897-R1269)

esag4c1: 5'-GCGGATCCCATATGTGACACCGTCAATGATTTTCAG (NdeI)

esag4back: 5'-CTCGCTCGAGCTATTATCACGTAGTGCGCTGTCATTTTCCAAGCT (XhoI)

PDE1-(M1-T620)

PDE1back: 5'-CCGCTCGAGTCATTACTAGGTTCCCTGTCCAGTGTTACC (XhoI)

PDE1(R189-T620)

PDE1-(RDNI)fwd: 5'-GGGAATTCCATATGAGAGACAATATTTCCCGTTTATCAAATC (NdeI)

PDE1-(RDNI)back: 5'-CCGCTCGAGTCATTACTAGGTTCCCTGTCCAGTGTTACC (XhoI)

PDE1-(K321-T620)

PDE1-(KDN)fwd: 5'-GGGAATTCCATATGAAGAATGATCAATCTGGCTGCGGCGCAC (NdeI)

Mutageneseprimer für GRESAG4.1-(A884-Y1241):

D906A: 5'-GACACTAATATTTACTgcgATTGAGAGCAG

5'-CTGCTCTCAATcgcAGTAAATATTAGTGTC

D949A: 5'-GAAGTCAAACTGTTGGGgcgTCGTTTCATGATAGC

5'-GCTATCATGAACGAcgcCCCAACAGTTTTGACTTC

E1055A: 5'-CATGGCAGCAAGGACGgcgAGTGTAGCAAATGGTGGTC

5'-GACCACCATTTGCTACACTcgcCGTCCTTGCTGCCATG

E943A: 5'-GAGTATAAGTGCTACgcgGTCAAACTGTTGGG

5'-CCCAACAGTTTTGACcgcGTAGCACTTATACCTC

K945A: 5'-GTATAAGTGCTACGAAGTCgcgACTGTTGGGGATTTCGTTTCATG

5'-CATGAACGAATCCCCAACAGTcgcGACTTCGTAGCACTTATAC

R1022A: 5'-GGCCTGCGTGTAgcgGTTGGAATCCACACCG

5'-CGGTGTGGATTCCAAcgcTACACGCAGGCC

N1049A: 5'-GACTACTATGGGCGGACTCCAgcgATGGCAGCAAGGACGGAGAGTG

5'-CACTCTCCGTCCTTGCTGCCATcgcTGGAGTCCGCCCATAGTAGTC

R1053A: 5'-AAACATGGCAGCAgcgACGGAGAGTGTAGCAAAT

5'-ATTTGCTACACTCTCCGTcgcTGCTGCCATGTTT

Sequenzierungsprimer:

t7prom: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG

t7term: 5'-GCTAGTTATTGCTCA GCGG

gresag4.1_534-515: 5'-GTCCTTGCTGCCATGTTTGG

gresag4.1_821-842: 5'-ATTGCAACTGCACTACAGTCGC

gresag4.1_825-800_rev: 5'-GCAATTATCTGACCTGATTCACTCAC

gresag4.1_704-722: 5'-TTTGCTGCATTACGGCTGG

gresag4.3_838_rev: 5'-AAAGGGATTGAAGGGAGG

gresag4.3_552_rev: 5'-GACGACGATTTGCTAGAC

gresag4.3_735: 5'-CGATGGCGAAGATTGAAAC
 gresag4.3_313: 5'-GCACTTGATGAATCTTACC
 esag317-336: 5'-TGGAAGCGTCAACGTTTCAGG
 esag2100-2120: 5'-CTGTATGATCTGTTTGCCACG
 esag3108-3128: 5'-CGCCGCGATGAAGTAACGAAG
 esag1769-1789: 5'-TGTGATTTCATCTCTCGCCCAC
 esag2808-2829: 5'-CGCACATTGATTTCCAAGTATG
 esag2517-2538: 5'-CCGCTTACAAATCCCATGACAC
 tryppde1581: 5'-TTGTTGTCGTCCACTTCC
 tryppde716: 5'-GCAAGGAATACGATGTGG
 tryppde952rev: 5'-TATCGTCCCCATCAATAG
 tryppde318: 5'-GCTCTGCTTTCCCATTCAAAAAC
 tryppde419rev: 5'-ACTTCCTCTTCCAGCATTCTCACC
 tryppde738rev: 5'-AAGTTCCACATCGTATTCC
 tryppde1248rev: 5'-GAATAGCCGCCGCAAAAAG
 tryppde213rev: 5'-GTCAAAGAACAGTCCCCACC
 tryppde1759rev: 5'-GGAAGGGAATGAAGATATAG
 tryppde1291: 5'-TACAACGCCACGCTTTAC

3.1.3 Herstellerfirmen der verwendeten Geräte und Chemikalien

3.1.3.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien hatten die Qualitätsstufe “zur Analyse”. Sie wurden größtenteils von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (München) bezogen.

Ausnahmen wurden im folgenden aufgeführt:

Chemikalien

Acrylamid
 Agarose
 AgNO₃
 Anti-Rabbit-IgG AP
 Bacto-Agar
 Bacto-Trypton
 Bromphenolblau
 Coomassie Brilliantblau R-250
 Desoxyribonukleotide (dNTPs)
 DNA-Längenstandards
 DNA-Ligase, T4
 Ethanol
 Ethidiumbromid

Hersteller

Biorad (Richmond, USA)
 Biozym (Oldendorf)
 Riedel-de Haën
 Boehringer Mannheim GmbH
 Difco (Detroit, USA)
 Difco (Detroit, USA)
 Serva Feinbiochemica (Heidelberg)
 Serva Feinbiochemica (Heidelberg)
 Pharmacia (Freiburg)
 Boehringer Mannheim GmbH
 New England Biolabs (Beverly, USA)
 Riedel-de Haën
 Boehringer Mannheim GmbH

IPTG

Methanol

Molekulargewichtsstandard (M6)

Natriumdodecylsulfat

Pfu DNA-Polymerase

Protogel-Lösung

Salzsäure, 37% (w/v)

Szintillationscocktail Rotiszint Eco Plus

"Taq Dye DeoxyTM Terminator

Cycle Sequencing Kit"

Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Triton X-100

Tris

Gerbu

Riedel-de Haën

Pharmacia (Freiburg)

Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

Stratagene GmbH (Heidelberg)

National Diagnostics

Riedel-de Haën

Carl Roth, GmbH (Karlsruhe)

Applied Biosystems (Weiterstadt)

Biorad (Richmond, USA)

Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

Riedel-de Haën

3.1.3.2 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammern

ÄKTApurifier 100

Blot-Apparatur Trans-Blot SD

French Pressure Cell Press

Fast Desalting Columns HR 10/10

FPLC Station LCC-501

Fraktionssammler

Hiload 26/10 Q Sepharose HP

Hiload 16/60 Superdex 75 prep grade

Hiload 16/60 Superdex 200 prep grade

Hiload 26/60 Superdex 200 prep grade

Hiload 16/60 Superdex prep grade

Kühlzentrifuge SIGMA 4K15

MonoQ HR 5/5 Anionenaustauschersäule

Peristaltik-Pumpe P1

Photometer Ultrospec 3000

DNA Thermal cycler

Tischzentrifuge

UV-Durchflußphotometer

UV/VIS Spektralphotometer Lambda 5

UV/VIS Spektralphotometer LKB UltrospecII

PD-10 Desalting Columns

ResourceS Kationenaustauschersäule

ResourceQ Anionenaustauschersäule

Eigenbau des MPI f. Biochemie, Martinsried

Pharmacia Biotech

BioRad

Aminco SLM Instruments Inc., Urbana, USA

Pharmacia Biotech

Pharmacia Biotech

Pharmacia Biotech

Pharmacia Biotech

Pharmacia Biotech

Pharmacia Biotech

Pharmacia Biotech

Pharmacia Biotech

SIGMA, Osterode

Pharmacia Biotech

Pharmacia Biotech

Pharmacia Biotech

Perkin Elmer

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH

Pharmacia Biotech

Perkin Elmer GmbH

Pharmacia Biotech

Pharmacia Biotech

Pharmacia Biotech

Pharmacia Biotech

Multiple Gel Caster	Eigenbau des MPI f. Biochemie, Martinsried
SDS-Gellaufkammer SE250 Mighty Small II	Hoefer / Pharmacia Biotech
Szintillationszähler LS 7500	Beckman
Zentrifuge Avanti J25	Beckman

mit den Rotoren JA10.500, JA25.500

Die übrigen verwendeten Geräte und Materialien sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

3.2 Stammlösungen, Medien und Puffer

10 x PBS

150 mM NaCl
495 mM KCl
130 mM Na₂HPO₄
20 mM NaH₂PO₄

Mit H₂O auffüllen auf 9/10 des Totalvolumens, pH 7.35 einstellen und auf das Endvolumen mit 0.5 M NaH₂PO₄ auffüllen.

10 x TBS

250 mM Tris/HCl, pH 7.4
1500 mM NaCl

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 8.0
1 mM EDTA
autoklaviert

10x DNA-Probenpuffer

0.25 % w/v Bromphenolblau
50 % v/v Glycerin

4 x Trenngelpuffer für SDS-PAGE

1.5 M Tris/HCl, pH 8.8
0.5 mM EDTA
0.4 % w/v SDS

Sammelgelpuffer für SDS-PAGE

0.5 M Tris/HCl, pH 6.8
0.5 mM EDTA
0.4 % w/v SDS

5x SDS-PAGE Probenpuffer:

2.3 % w/v SDS
0.5 M Tris/HCl, pH 6.8
0.1% w/v Bromphenolblau
5 % w/v DTT
10 % w/v Glyzerin

SDS-Gelelektrophoresepuffer nach Fling & Gregerson (Fling & Gregerson, 1986):

25 mM Tris-Base
250 mM Glycin-HCl
0.1% w/v SDS

Transferpuffer für Westernblot

153 mM Glyzin/HCl
20 mM Tris-Base
20 % v/v Methanol

Anfärbepuffer für Westernblot

100 mM Tris/HCl, pH 8.8
100 mM NaCl
10 mM MgCl_2
1 mM ZnCl_2

Elutionspuffer für Nickel-NTA Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

20 mM Tris
8 M Harnstoff
250 mM Imidazol
pH 8.0 mit HCl eingestellt.

Waschpuffer für Nickel-NTA Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

20 mM Tris
8 M Harnstoff
pH 8.0 mit HCl eingestellt.

Elutionspuffer für Nickel-NTA Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen

1 x PBS
500 mM NaCl
500 mM Imidazol
pH 7.5 mit HCl eingestellt.

Waschpuffer für Nickel-NTA Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen

1 x PBS
500 mM NaCl
pH 7.5 mit HCl eingestellt.

Laufpuffer für S200-Gelfiltration

20 mM Tris/HCl, pH 8.0
600 mM NaCl

Bradford Reagenz

0.01 % w/v Coomassie Brilliant Blau R-250
5 % v/v Ethanol
8.5 % v/v Phosphorsäure

LB-Medium (Luria-Bertani Medium)

1 % w/v Bacto-Trypton
0.5 % w/v Bacto-Yeastextract

pH 7.0, mit NaOH eingestellt, autoklaviert.

TB-Medium (Terrific broth Medium)

1.2 % w/v Bacto-Trypton

2.4 % w/v Bacto-Hefeextract

0.4 % v/v Glycerin

nach dem Autoklavieren mit 100 mM autoklaviertem

$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer auf pH 7.5 eingestellt.

Resuspensionspuffer für Bakterien-Pellets

0.36 M NaCl

1 mM EDTA

0.2 mM PMSF

1 mM DTT

in 1x PBS

Substratlösung für Adenylatzyklase-Aktivitätstest

20 mM Tris/HCl pH 8.0

2.0 mM ATP

10 mM DTT

0.5 mM MnCl_2

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen wurden im Gene Amp PCR-System von Perkin Elmer durchgeführt. Für die Ansätze wurden sowohl Taq-, als auch Pfu-Polymerase verwendet. In einem typischen Ansatz zur Gewinnung von Genfragmenten aus genomischer DNA wurden ca. 150 ng Template-DNA eingesetzt. Die eingesetzte Menge der Primer wurde so gewählt, daß im Ansatz 2.5 pmol vorhanden sind.

PCR-Standardansatz:

150 ng genomische DNA x μl

je 2.5 pmol Primer A/B y μl

10x Pfu bzw. Taq Puffer 5 μl

dNTP's (je 25 mM) 10 μl

auf 50 μl mit bidest. H_2O aufgefüllt

Erwärmen auf 95 °C und anschließende Zugabe von 0.5 μl Polymerase (2.5-5 U/ μl).

Das Standardprotokoll zur Amplifizierung mit 35 Zyklen hat folgende Einstellungen:

Elongation: 72 °C (68 °C); 60-420 sec

Die Hybridisierungstemperatur T_m errechnet sich näherungsweise wie folgt aus der Länge und Sequenz der verwendeten Primer: $T_m = ([G/C] \times 4 \text{ °C} + [A/T] \times 2 \text{ °C}) - 4 \text{ °C}$

3.3.2 Propagierung und Aufbewahrung von *E. coli*

Für die Aufbewahrung von *E. coli*-Stämmen über einen längeren Zeitraum wurden 0.5 ml einer stationären Übernachtskultur mit 1 ml 87 % v/v Glycerin gemischt und bei -20 °C gelagert. Bei 4 °C aufbewahrte Bakterienkolonien auf Agarplatten können einige Tage bis Wochen zum erneuten Inokulieren von Flüssigkulturen verwendet werden.

3.3.3 Präparation kompetenter Zellen

Für die Präparation kompetenter Zellen wurden Übernachtskulturen der entsprechenden *E. coli* Stämme in LB-Medium mit den jeweils erforderlichen Antibiotika bei 37 °C, 200 upm herangezogen. Dann wurde im Verhältnis 1:100 in 50 ml frisches Medium überimpft und bis zu einer OD₅₉₅ von 0.7-1.0 schüttelnd weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min bei 4 °C gekühlt und zentrifugiert (7500 upm im JA10-Rotor, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen und die Zellen zunächst in 1 l, nach erneuter Zentrifugation in 0.5 l eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem 10 % v/v Glycerin aufgenommen. Nach abschließender Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem 10 % v/v Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in 100 µl-Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

3.3.4 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden 3 ml Übernachtskulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C, 200 upm angezogen und anschließend bei 4000 g, 20 min zentrifugiert. Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit

die Plasmid-DNA mittels hydrophober Interaktionschromatographie von der genomischen DNA und den übrigen Zellbestandteilen getrennt wurde. Die Ausbeuten dieser Methode liegen bei 2-10 µg Plasmid-DNA.

3.3.5 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsspaltung von DNA erfolgte in Volumina zwischen 10 und 50 µl unter der Verwendung von 10-20 U Restriktionsenzym und den von den Firmen mitgelieferten entsprechenden 10x Reaktionspuffern. Der Reaktionsansatz wurde 1.5-2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt.

3.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden in Ansätzen bis zu 50 µl und DNA-Mengen zwischen 100-500 ng durchgeführt. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor betrug dabei im allgemeinen 3:1. Ligationen wurden mit 1-2 U T4 DNA-Ligase und dem entsprechenden von der Firma mitgeliefertem 10 x Ligasepuffer angesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

3.3.7 Gelelektrophorese von DNA

Die DNA-Gelelektrophorese erfolgte in 1-1.5 %igen Agarosegelen mit 1x TAE als Laufpuffer. Die Gelpräparation erfolgte durch kurzes Aufkochen von Agarose im Laufpuffer mittels Mikrowelle, Zugabe von 1/20000 Volumina einer 10 mg/ml Ethidiumbromid Stammlösung und Gießen des Gels in einer dafür vorgesehenen horizontalen Gelkammer. Nach dem Erstarren des Gels wurde mit 1xTAE überschichtet und die Geltaschen mit Proben und Größenstandard in 1x DNA-Probenpuffer beladen. Anschließend wurden die Proben bei 50-80 V nach ihrer Größe getrennt und die DNA-Banden bei 312 nm auf einem UV-Transilluminator detektiert.

3.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick-Gel-Extraction-Kits der Firma *Qiagen* unter Anwendung des von der Firma angegebenen Protokolls.

3.3.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Terminationsmethode. Hierzu wurde eine PCR-Reaktion angesetzt, bei der außer dNTP's auch noch mit Fluoreszenzfarbstoffen spezifisch gekoppelte dideoxynTP's im Reaktionsansatz vorhanden waren. Diese wirkten als Terminatoren und sorgten so für den Abbruch der Polymerasereaktion. Da die Termination statistisch erfolgte, entstanden DNA-Fragmente unterschiedlicher Kettenlänge, die chromatographisch nach ihrer Größe getrennt und anhand des anhaftenden Fluoreszenzfarbstoffes detektiert werden können. Da jedes dideoxy-dNTP mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, läßt sich somit die DNA-Sequenz der Template-DNA bestimmen.

PCR-Programm für die Sequenzierung:

1: 96 °C; 30 sec	
2: T _m ; 15 sec	T _m = primerspezifische Hybridisierungstemperatur
3: 60 °C; 4 min	
30 Zyklen	

3.3.10 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation. Hierzu wurden 100 µl kompetente, bei -70 °C aufbewahrte Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 0.5 µl (bei Ligationsansätzen 1 µl) Plasmid-DNA 15 min in Elektroporationsküvetten auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 1.5 kV und 200 Ω, wobei die Zellsuspension anschließend sofort mit 3 ml LB-Medium gemischt und bei 37°C, 200 upm, 45 min inkubiert wurde. Dann wurden jeweils 10 µl und 100 µl des Elektroporationsansatzes auf Agarplatten entsprechender Resistenz ausgestrichen und bei 37 °C

3.3.11 Ortsspezifische Mutagenese nach der Zwei-Schritt-PCR-Methode

Die Einführung ortsspezifischer Punktmutationen erfolgte nach der zwei-Schritt-PCR-Methode (Ho *et al.*, 1989). Hierzu wurden zwei komplementäre Primer erstellt, in denen das mutierte Codon jeweils von 18-20 Nukleotiden flankiert war. Diese Oligonukleotide wurden mit den jeweiligen terminalen Oligonukleotiden des zu mutierenden Genfragments in zwei PCR-Reaktionsansätzen, die gemäß dem in Kap. 3.3.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt wurden, eingesetzt. Die beiden PCR-Produkte, die in einem Bereich von 18-20 Nukleotiden komplementär zueinander waren, wurden in einem zweiten PCR-Reaktionsansatz fusioniert. Das somit erzeugte punktmutierte Genfragment wurde schließlich über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen in den gewünschten Expressionsvektor kloniert.

PCR-Ansatz für die Fusionsreaktion:

Produkt 1	5-20 µl
Produkt 2	5-20 µl
10x Pfu-Reaktionspuffer	5 µl
dd H ₂ O	x µl
dNTP's (je 25 mM)	10 µl
Aufgefüllt mit ddH ₂ O auf	50 µl
add Pfu Polymerase (2.5-5 U/µl)	0.5 µl

PCR-Programm für die Fusionierung:

- 1: 96 °C; 30 sec
- 2: 54 °C; 30 sec
- 3: 72 °C; 2 min
- 30 Zyklen

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Expression

Für die Expression wurden Kulturen des gewünschten Bakterienstammes in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika über Nacht angezogen. Dann wurden 1-3 l TB-Mediums 1:30 inokuliert und bis zu einer OD₅₉₅ von 0.5-2.0 inkubiert (200 upm, 30°C). Anschließend erfolgte die Induktion durch Zugabe einer 1 M IPTG-Stammlösung, so daß die Endkonzentration an

IPTG im Medium 0.5-1.0 mM betrug. Nach entsprechender Expressionsdauer wurden die Bakterien abzentrifugiert (10000 upm im JA 10.500 Rotor, 5 min, 4 °C).

3.4.2 Zellaufschluß

Die nach der Expression durch Zentrifugation pelletierten Zellen wurden mit Resuspensionspuffer (1x PBS, 10 mM DTT, 0.2 mM PMSF) bei 4 °C resuspendiert, so daß das Endvolumen 1/100 des Kulturvolumens entsprach. Dann wurden die Zellen in der Aminco French Press bei einem Druck von 16 000 psi (pounds per square inch) aufgeschlossen. Der Zellaufschluß wurde zentrifugiert (25 000 upm im JA 25.500 Rotor, 30 min, 4 °C). Je nachdem, ob das gewünschte Protein in Form von *inclusion bodies* oder löslich vorlag, wurde entweder das Zellpellet oder die Zytosolfraktion für die weitere Proteinaufreinigung verwendet.

3.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese wurden Proteine durch Behandlung mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und die dabei entstandenen Protein-SDS-Komplexe im elektrischen Feld aufgetrennt. Um eine möglichst effiziente Auftrennung zu gewährleisten, wurde die Proteinprobe in einem Sammelgel (pH 6.8) zu engen Banden aufkonzentriert, bevor im Trenngel (pH 8.8) die eigentliche Proteinauftrennung erfolgte. Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Fling & Gregerson (Fling & Gregerson, 1986) mit Biorad Minigelapparaturen durchgeführt. Üblicherweise wurden 13.5 %ige Gele verwendet.

Gelrezeptur:

Trenngelrezept (für 10 Minigele), 13.5 %:

27 ml 30 % Protogel (30 % Acrylamid / 0.8 % Bisacrylamid)

15 ml 4x Trenngelpuffer

9 ml bidest. H₂O

9 ml Glyzerin

26 µl TEMED

Sammelgelrezept (für 10 Minigele), 5.4 %:

4.8 ml 30 % Protogel (30 % Acrylamid / 0.8 % Bisacrylamid)

8 ml 4x Sammelgelpuffer

13.6 ml bidest. H₂O

100 µl 10 % w/v APS

13 µl TEMED

3.4.4 Färben von SDS-Gelen

In dieser Arbeit wurden zwei Methoden der SDS-Gelfärbung verwandt. Die eine Methode ist die Färbung mit dem sich an Arginylreste anlagernden Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R-250, wobei bis zu 0.1 µg Protein pro Bande detektiert werden konnten. Die andere Möglichkeit ist die Silberfärbung, deren Nachweisempfindlichkeit etwa um den Faktor 100 höher liegt.

Coomassie-Färbung:

Das Proteingel wurde mindestens 30 Minuten lang in der Färbelösung (0.1 % Coomassie Brilliant Blau R-250, 50 % MeOH, 10 % Eisessig, 40 % H₂O) schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde mit 20 % MeOH, 10 % Eisessig entfärbt.

Silberfärbung:

Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Methode für den Nachweis von Proteinen im ng Bereich. Hierzu wurde das Polyacrylamidgel zweimal in 10 % Ethanol für 10 Minuten gewaschen, dann in 0.1 % AgNO₃-Lösung für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mehrmals kurz mit bidest. H₂O gewaschen und mit frischer Entwicklerlösung (280 mM NaHCO₃, 0.0185 % Formaldehyd) entwickelt, bis keine weiteren Proteinbanden mehr sichtbar wurden. Dann wurde durch Waschen mit 1 % Essigsäure die Silberfärbung fixiert.

3.4.5 Western Blot

Das Blotten von Proteinen, die zuvor in SDS-Gelen aufgetrennt wurden, erfolgte im halbtrockenen Blotverfahren. Hierzu wurde das nicht gefärbte, in Blotpuffer inkubierte Gel auf die ebenfalls in Blotpuffer getränkte Blotmembran aus PVDF (Immobilon-P Transfermembran, *Millipore*) transferiert. In der hierfür verwendeten Semidry-Blot-Apparatur der Firma *Sartorius* wurde von der Kathodenseite ausgehend ein *sandwich* bestehend aus 3 Lagen Whatmanpapier, Gel, Blotmembran und weiteren 3 Lagen Whatmanpapier aufgebaut. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Protein/SDS-Komplexe somit Richtung Anode in die Membran. Im allgemeinen dauert der Transfer 1-2 h, wobei Stromdichten von 2.0 mA/cm^2 verwendet wurden.

3.4.6 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Eine sehr schnelle und einfache Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen ist der Test nach Bradford. Das hierzu verwendete Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250, welcher an Arginylreste von Proteinen bindet. Die hierdurch zu beobachtende Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm nach 595 nm, kann zur Proteinquantifizierung genutzt werden. Die Ursache der Verschiebung des Absorptionsmaximums ist die Überführung des Farbstoffes von der kationischen in die anionische Form.

Meßansatz:

990 µl Bradfordreagenz wurden mit 10 µl Testlösung versehen und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und anhand einer mit BSA aufgenommenen Eichgerade die entsprechende Proteinkonzentration bestimmt.

3.4.7 Aufkonzentrierung von Proteinen

Das Aufkonzentrieren und Umpuffern von Proteinen erfolgte im präparativen Maßstab

Konzentratoren von der Firma vorgegebenen g-Wert durch Zentrifugation aufkonzentriert. Im analytischen Maßstab erfolgte die Aufkonzentrierung in Centricon 10 und 30 Konzentrationszellen (*Amicon*) bei der zulässigen g-Zahl und 4 °C. Die Bestimmung der Endkonzentration erfolgte mit Bradford-Reagenz durch Entnahme einer Probe und entsprechender Verdünnung.

3.4.8 Rückfaltung von Proteinen durch Dialyse

Die nach Zentrifugation des Zellaufschlusses (30 min, 4 °C, 25 000 upm im JA25.500 Rotor) erhaltenen *inclusion bodies* wurden in 6 M Guanidiniumchlorid, pH 8.0, 0.1 M DL-DTT (alternativ Mercaptoethanol) solubilisiert und über Nacht bei 4 °C gegen 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 dialysiert. Dabei wurde der Verdünnungsfaktor so gewählt, daß während der Dialyse die Guanidiniumchloridkonzentration langsam auf eine nicht mehr chaotrop wirkende Konzentration absank, so daß sich das rekombinante Protein in seine native Form zurückfalten konnte.

3.4.9 Reinigung rekombinanter Proteine mittels immobilisierter Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC)

Bei der Metallaffinitätschromatographie auf Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure)-Sephrose macht man sich die relativ spezifische Bindung von Nickel an Imidazolgruppen zunutze. Das Nickelion ist über Nitrilotriessigsäure, einem vierzähligen Liganden, der vier der sechs Koordinationsplätze am Nickelion besetzt, an die Säulenmatrix aus Sepharose immobilisiert. Die beiden freien Koordinationsplätze können von den Stickstoffatomen der Imidazolringe histidinreicher Proteine besetzt werden, wodurch diese an der Säulenmatrix binden, während histidinarme Proteine ausgewaschen werden.

Die Säulendimension der IMAC wurde so gewählt, daß für einen Zellaufschluß aus 1 l Kultur 2-25 ml Säulenmaterial (Ni-NTA-Superflow der Firma *Qiagen*) verwendet wurden. Das Volumen des nach dem Waschschrift folgenden linearen Imidazolgradienten entsprach dem 8-40 fachen Säulenvolumen, wobei die Flußrate so gewählt wurde, daß der Gradient innerhalb von 4 h

von 0 mM auf 500 mM Imidazol anstieg. Bei einer typischen IMAC-Aufreinigung wurden die Bakterien aus 7-15 l Kultur mittels French Press (*Aminco*) aufgebrochen, Festbestandteile durch Zentrifugation (30 min, 4 °C, 25 000 upm im JA25.500 Rotor) abgetrennt und der zytosolische Überstand auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit Auftragspuffer gewaschen, bis kein Protein im Durchlauf mehr detektiert werden konnte. Der Auftragspuffer enthielt dabei 20 mM Imidazol um unspezifische Proteinbindungen zu minimieren. Sodann wurde der Imidazolgradient angelegt um das gewünschte Protein von der Säule zu eluieren. Mittels SDS-Gelelektrophorese wurden die einzelnen Fraktionen, die während der Elution aufgefangen wurden, auf ihre Reinheit überprüft und entsprechend vereinigt. Typische Ausbeuten bei diesem Reinigungsschritt liegen bei 2-4 mg Protein / l Kulturmedium.

3.4.10 Reinigung rekombinanter Proteine durch Gelfiltration

Bei der Gelfiltration erfolgte eine Auftrennung der Proteine nach ihrem hydrodynamischen Durchmesser. Die Matrix einer Gelfiltrationssäule besteht aus porösen Gelpartikeln, in deren Hohlräume kleinere Makromoleküle eindringen können, während größere Makromoleküle sich nur in dem Medium zwischen den einzelnen Gelpartikeln aufhalten können. Infolgedessen ist das Elutionsvolumen für große Makromoleküle geringer als für kleine. Um eine gute Auftrennung zu gewährleisten ist es wichtig, daß die Probe in möglichst konzentrierter Form auf die Säule aufgetragen wird und das Probenvolumen max. 1-5 % des Gelbettvolumens beträgt. Weiterhin hängt die Qualität der Auftrennung von der Laufstrecke ab, wobei eine lange, dünne Säulendimension einer kurzen, breiten vorzuziehen ist.

In dieser Arbeit wurden Superdex S200 und Superdex S75 Gelfiltrationssäulen der Firma *Pharmacia Biotech* verwendet, deren Trennbereich mit entsprechenden Eichmarkern überprüft wurde.

Eichprotein	MG [kDa]	log MG	Elutionsvolumen [ml]
Blue Dextran	2000	6.30	46
Alkohol Dehydrogenase	66	5.18	67
Albumin	42	4.82	75
Carboanhydrase	29	4.46	88.5

Tabelle 1: Eichung der Superdex S200 26/60 Gelfiltrationssäule. Als Laufpuffer diente der für die Proteinreinigung verwendete Elutionspuffer 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 600 mM NaCl, die Flußrate betrug 1.3 ml/min.

Eichprotein	MG [kDa]	log MG	Elutionsvolumen [ml]
Blue Dextran	2000	6.30	43
Albumin	66	4.82	50.5
Chymotrypsinogen	42	4.63	58.5
Carboanhydrase	29	4.46	67.5
RNase A	14	4.15	78.75

Tabelle 2: Eichung der Superdex S75 16/60 Gelfiltrationssäule. Als Laufpuffer diente der für die Proteinreinigung verwendete Elutionspuffer 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 600 mM NaCl, die Flußrate betrug 0.5 ml/min.

3.4.11 Reinigung rekombinanter Proteine mit Ionenaustauscherchromatographie

Bei der Ionenaustauscherchromatographie werden Makromoleküle in Abhängigkeit ihrer Nettoladung unterschiedlich stark auf der Säulenmatrix immobilisiert und anschließend von einem dem Waschschrift folgenden Salzgradienten wieder eluiert. Dabei werden durch die Erhöhung der Salzkonzentration die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Matrix und Makromolekül soweit abgeschwächt, bis das Makromolekül nicht mehr an die Säulenmatrix bindet und eluiert. Kationenaustauscher besitzen negativ geladene Reste als Austauschergruppen, Anionenaustauscher positiv geladene. Man unterscheidet zwischen harten und weichen Ionenaustauschermaterialien in Abhängigkeit davon, ob die Austauschergruppen ihre Ladungen über einen weiten pH-Bereich behalten oder nicht. Harte Anionenaustauschermaterialien verfügen zum Beispiel über quartäre Aminogruppen, wie in MonoQ- oder SepharoseQ-Materialien. Da es bei der Ionenaustauscherchromatographie zu einer starken Aufkonzentration der Proteine kommt, kann die Probe auch in stark verdünnter Form aufgetragen werden. Hierbei muß die Salzkonzentration im Probenauftrag unter der Konzentration liegen, bei der das Protein von der Säule eluiert. In dieser Arbeit wurden ausschließlich harte Anionen- und

Protein	Elutionspunkt (% Puffer B)
GRESAG4.1-(A884-Y1241)	25
GRESAG4.3-(A867-V1229)	25
ESAG4-(P897-R1269)	25
GRESAG4.1-(A884-Y1241)	35
GRESAG4.3-AC-Domäne	35
ESAG4-AC-Domäne	35
PDE1-(R189-T620)	30

Tabelle 3: Alle in dieser Arbeit mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigten Proteine wurden auf einer 1 ml Recourse Q Säule (Pharmacia) bei 12 °C, mit einer Flußrate von 4 ml/min durchgeführt, wobei als Auftragspuffer (Puffer A) 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 und als Elutionspuffer (Puffer B) 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1.0 M NaCl verwendet wurden. Die Proteine wurden standartmäßig in einem zwei Stufen Gradienten (0-500, 500-1000 mM NaCl) durchgeführt, wobei das Elutionsvolumen der ersten Stufe 35 Säulenvolumina, das der zweiten Stufe 10 Säulenvolumina betrug. Die Tabelle gibt den prozentualen Anteil von Puffer B im Gradienten wieder, bei dem die jeweiligen Proteine eluierten.

3.4.12 Limitierte Proteolyse

Durch limitierte Proteolyse mit unspezifischen Proteasen war es möglich ungefaltene bzw. wenig kompakte Anteile von Proteinen abzuverdauen. Dazu wurden die auf Eis vorgekühlten Protease- und Protein-Lösungen im Volumenverhältnis 1:1 gemischt, wobei der Reaktionsansatz im allgemeinen im analytischen Maßstab in einem Totalvolumen von 20 µl, im präparativen Maßstab in einem Totalvolumen von 50 ml durchgeführt wurde. Dabei betrug die Proteinkonzentration der eingesetzten Protein-Lösung 1mg/ml, während die Proteasekonzentration der eingesetzten Protease-Lösung zwischen 1 mg/ml – 0.1 µg/ml variiert wurde. Die Proteolyse wurde nach 30 min durch Zugabe von PMSF (5 mM) gestoppt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mittels SDS-PAGE auf die Gegenwart proteaseresistenter Fragmente untersucht. Bei konstanter Zeit, Temperatur und Protein-Konzentration wurden verschiedene Protease-Konzentrationen getestet, um limitierende Proteolysebedingungen auszutitrieren.

tAC-Domäne	Protease	Massenverhältnis von tAC-Domäne zu Protease
GRESAG4.1-(A884-Y1241)	Subtilisin	1 mg : 0.1 mg
GRESAG4.3-(A867-V1229)	Proteinase K	1 mg : 0.1 mg
ESAG4-(P897-R1269)	Proteinase K	1 mg : 0.1 mg

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt die für die jeweilige tAC-Domäne benötigten Proteasen und die entsprechenden Massenverhältnisse, die benötigt wurden um während der limitierten Proteolyse proteaseresistente Fragmente isolieren zu können. Die limitierte Proteolyse wurde in 1xPBS durchgeführt.

3.4.13 Thrombinspaltung von PDE1/His₆-Fusionsproteinen

Die chromatographisch aufgereinigten PDE1/His₆-Fusionsproteine wurden über Nacht bei 4 °C gegen Thrombinspaltpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) dialysiert. Anschließend wurde die Spaltungsreaktion bei 25 °C über Nacht durchgeführt, wobei 1 U Thrombin (Pharmacia) für die Spaltung von 1.0 mg PDE1/His₆-Fusionsprotein verwendet wurde. Um die His₆-Fusion, sowie unverdautes Substrat zu entfernen, wurde die Reaktionslösung anschließend auf eine 5 ml große Ni-NTA-Sepharose Säule (Quiagen), die mit 1x PBS-Puffer äquilibriert war, aufgetragen. Der Durchfluß wurde gesammelt und über Nacht bei 4 °C dialysiert (5 mM Tris/HCl, pH 8.0), bevor das Protein für Aktivitätsstudien verwendet wurde.

3.4.14 Proteinsequenzanalysen

Die Analysen von N-terminalen Proteinsequenzen wurden in der Proteinanalytikgruppe von Herrn Prof. Lottspeich nach der Edman-Methode durchgeführt. Für die Probenvorbereitung wurden die zu sequenzierenden Proteine zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend, wie oben beschrieben, auf eine PVDF-Transfermembran (Immobilon P) überführt. Die Proteine wurden auf dieser Membran durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht; als Entfärbelösung dient eine Lösung aus 20 % Essigsäure, 80 % Methanol.

3.4.15 Adenylatzyklase-Aktivitätstest

Für die Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Adenylatzyklasen wurde ein von Schaap et al etablierter Assay verwendet (Schaap *et al.*, 1995). Für Untersuchungen der Enzymaktivität in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern, wie Salzkonzentration und pH-Wert, wurde der Ansatz entsprechend variiert. Zu 0.5-2.0 µg Protein in 100 µl Pufferlösung (20 mM Tris/HCl, pH 8.0) wurden 50 µl einer Substratlösung (2.5 mM ATP, 2 mM DL-DTT oder 1.0 mM Ascorbinsäure, 5.0 mM MnCl₂) hinzugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 25 °C

anschließend abzentrifugiert (10.000 upm, 1 min, RT). Die cAMP-Produktion wurde mit Hilfe eines cAMP-Isotopenverdünnungstests (Amersham) quantifiziert.

3.4.16 Phosphodiesterase-Aktivitätstest

5-20 µg Enzym in 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 wurden in 100 µl Pufferlösung vorgegeben und die Esterasereaktion wurde durch Zugabe von 50 µl eines Reaktionsgemisches (1.0 mM cAMP, 2.5 mM DL-DTT, 5.0 mM MnCl₂) gestartet. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 25 °C inkubiert und anschließend mit 200 µl eines 1:1 Gemisches CHCl₃/MeOH (Voss & Wallner, 1992) abgestoppt. Nach Zentrifugation (10.000 upm, 1 min, RT) wurde der Ansatz entsprechend verdünnt, um im linearen Meßbereich den cAMP-Umsatz durch einen cAMP-Isotopenverdünnungstest (Amersham) zu quantifizieren.

3.4.17 Analytische Gelfiltration

Analytische Gelfiltrationsexperimente wurden mit einer S75 3/20 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) durchgeführt. Zuvor wurde das aufgereinigte Protein gegen 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 dialysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung (50 µl Probenvolumen, Proteinkonzentration 1.0 mg/ml) auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit Elutionspuffer verschiedener Ionenstärken (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0-600 mM NaCl) eluiert. Anhand des Elutionsvolumens wurde der R_f-Wert kalkuliert. Das apparente Molekulargewicht wurde anhand einer Eichgerade bei der entsprechenden Ionenstärke bestimmt.

3.5 Proteinkristallographische Methoden

3.5.1 Techniken der Proteinkristallisation

Kristallisationsansätze wurden nach der Methode des hängenden Tropfens durchgeführt (Davis & Seagal, 1971). Da die Kristallisation von Proteinen von einer Vielzahl von Parametern abhing, deren Variationen in Abhängigkeit zueinander ausgetestet werden mussten, war der

systematischen und materialintensiven zweidimensionalen Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen die *sparse matrix* Strategie vorzuziehen. Hierbei handelte es sich um einen Satz von 50-100 Präzipitationspuffern (Zusammensetzung der Präzipitationspuffer siehe Anhang), in denen mehrere Parameter, wie pH-Wert, Fällungsreagenz, Metallionen und Salzkonzentration unabhängig voneinander variiert wurden. Die Zusammenstellung der *sparse matrix* Ansätze beruhte auf einer Reihe empirischer Erfahrungen, die von bereits veröffentlichten Kristallisationsbedingungen herrührten (Jancarik & Kim, 1991). Nach Analyse des Fällungsverhaltens der Proteine im *sparse matrix* Ansatz ließen sich weitere systematische zweidimensionale Suchgitter erstellen, in denen die Kristallisationsparameter enger eingegrenzt und optimiert werden konnten.

3.5.2 Kristallographische Datenerfassung

Die Datensammlung erfolgte nach der Oszillationsmethode (Arndt & Wonacott, 1977), wobei die zu vermessenden Kristalle in einer Kryoschleife bei 100 K schockgefroren und derart auf einem Goniometerkopf montiert wurden, daß sie um eine Spindelachse senkrecht zum einfallenden Röntgenstrahl gedreht werden konnten. Der Winkelbereich, der pro Oszillationsaufnahme durchlaufen wurde, war so gewählt (im allgemeinen 0.25-0.5°), daß bei vorgegebenen Zellmaßen, Mosaizität und Kristall-Detektordistanz keine Überlappung der Reflexe erfolgte und ein möglichst optimales Signal/Rauschen-Verhältnis erzielt wurde. Der für einen vollständigen Datensatz insgesamt durchfahrene Winkelbereich hing von der Kristallsymmetrie sowie der Kristallorientierung im Experiment ab und wurde in der Regel mit der STRATEGY-Option des MOSFLM-Programmpaketes (Leslie, 1992 während der laufenden Datensammlung bestmöglich ausgewählt. Als Röntgenquellen standen eine RU-200 CuK - Drehanode (Rigaku, CuK : $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) bzw. die *Wiggler beamline* BW6 der MPG-GBF Außenstelle, Deutsches Elektronen Synchrotron Hamburg (DESY), sowie die ID14/3 *Quadrige beamline* des ESPE in Grenoble zur Verfügung. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen

röntgenkristallographischen Daten wurden auf MAR Research *imaging plates* bzw. CCD-Kameras als Detektoren ausgemessen. Ersteres System nutzt das “photostimulierende Lumineszenzphänomen“ (PSL) für die positionsabhängige Detektion von Röntgenquanten (Amemiya *et al.*, 1987).

3.5.3 Datenprozessierung

Die Prozessierung der erhaltenen Oszillationsaufnahmen erfolgte mittels der Programmpakete HKL (Otwinowski & Minor, 1997), MOSFLM (Leslie, 1992; Leslie *et al.*, 1988) und CCP4 (CCP4, 1994). Dabei wurden zuerst die Kristallorientierung, die Raumgruppe und Zellparameter mit DENZO oder MOSFLM bestimmt. Anschliessend erfolgte die Integration der Reflexintensitäten aus den einzelnen Oszillationsaufnahmen, unter gleichzeitiger Verfeinerung der Filmorientierungsparameter und des Kristall-Detektorabstandes. Bei diesem Schritt war darauf zu achten, daß Form und Grösse der Messbox der Reflexgrösse, -form und separation entsprachen um das Verhältnis von Hintergrund zu Signal zu optimieren und eine grösstmögliche Datenqualität zu erzielen. Nach der Datenintegration erfolgte die Gesamtskalierung des Datensatzes anhand äquivalenter Reflexe mit den Programmen SCALEPACK bzw. SCALA. Ein Maß für die Qualität eines Datensatzes ist der R_{merge} -Wert (Gleichung 1)

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl) - I_i(hkl)|}{\sum_{hkl} I_i(hkl)} \quad \text{Gleichung 1}$$

Mit dem Programm TRUNCATE (French & Wilson, 1978) wurden die Strukturfaktoramplituden aus den Intensitäten der aufgenommenen Reflexe bestimmt. Dabei wurde die Intensitätsverteilung der Reflexe mittels Bayesian-Statistik auf eine Wilsonverteilung (Wilson, 1949) abgebildet. Neben der Nichtnegativität aller beobachteten Reflexe werden

dadurch besonders für schwache Reflexe mit $I < 3$ (I) bessere Schatzwerte für die Strukturfaktoramplituden F_{obs} erhalten.

3.5.4 Das Phasenproblem

Die Elektronendichte am Ort xyz innerhalb eines Kristalls kann mittels Fouriertransformation nach Gleichung 2 erhalten werden. Dabei ist $F(hkl)$ die Strukturfaktoramplitude und $\phi(hkl)$ der Phasenwinkel des Reflexes (hkl) . Nach Gleichung 3 läßt sich $F(hkl)$ aus den Reflexintensitäten anhand von Diffraktionsbildern der aufgenommenen Reflexe $I(hkl)$ ermitteln. Die Information über den Phasenwinkel $\phi(hkl)$ ist jedoch aus röntgenkristallographischen Messungen nicht ohne weiteres zugänglich.

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\phi(hkl)} \quad \text{Gleichung 2}$$

$$|F(hkl)| = \sqrt{I(hkl)}, \text{ mit } I(hkl) \text{ als Reflexintensitäten} \quad \text{Gleichung 3}$$

In der Proteinkristallographie gibt es prinzipiell vier Techniken für die Lösung des Phasenproblems (Green et al. 1954):

1.) Die Methode des multiplen isomorphen Ersatzes (MIR), bei der Schwermetallatome hoher Ordnungszahlen an spezifischen Positionen im Kristallgitter angelagert werden. Dies führt unter der Voraussetzung der Erhaltung der Isomorphie zu Variationen in den Strukturfaktoramplituden, die für die Phasenkalkulation genutzt werden kann.

2.) Die Methode der multiplen anomalen Dispersion (MAD) nutzt die anomale Streuung von schweren Atomen, die entsteht, wenn die Wellenlänge der einfallenden Röntgenstrahlung so gewählt wurde, daß inelastische Wechselwirkungen mit den kernnahen Elektronen auftreten.

Dies führt dazu, daß die Strukturfaktoramplituden $|F(hkl)|$ und des Bijovet-Zwillings $|F(\bar{h}\bar{k}\bar{l})|$ nicht länger identisch sind, was für die Phasenbestimmung genutzt werden kann (Hendrickson, 1991).

3.) Die Methode des molekularen Ersatzes (molecular replacement, MR) nutzt die Phaseninformation bereits bekannter Strukturen als Ausgangspunkt für die Berechnung der Phasen des zu lösenden Strukturmodells (Hoppe, 1957; Huber, 1965; Rossmann & Blow, 1962).

4.) Direkte Methoden sind momentan noch in der Entwicklungsphase und konnten bisher nur für die Lösung sehr weniger, hochauflösender Strukturen, verwendet werden (Sheldrick *et al.*, 1993).

Da in dieser Arbeit Strukturlösungen sowohl mittels MIR als auch MR erfolgten, soll auf diese beiden Methoden im folgenden genauer eingegangen werden.

3.5.4.1 Die Methode des isomorphen Ersatzes

Das klassische, auf Perutz (Perutz, 1956) zurückgehende Verfahren zur Ermittlung der fehlenden Phaseninformation ist die Methode des multiplen isomorphen Ersatzes (MIR), die darauf beruht, daß mit Schwermetallatomen derivatisierte Proteinkristalle Veränderungen der dazugehörigen Strukturfaktoramplituden aufweisen. Diese können unter der Voraussetzung, daß Kristallisomorphie vorliegt, dazu verwendet werden, die fehlende Phaseninformation zu erhalten. Die Verwendung von nur einem Schwermetallderivat für die Phasierung reicht aufgrund der Phasenzweideutigkeit zumeist nicht aus, weshalb mindestens zwei, aufgrund der hohen Fehlerhaftigkeit experimentell bestimmter Phasen aber meist mehrere, Schwermetallderivate für die Phasenbestimmung benötigt werden. Die Schwermetallatompositionen weiterer Schwermetallatomderivate können mittels Differenzfouriersynthese unter Verwendung der Strukturfaktoramplituden des nativen Datensatzes und den mit dem ersten Schwermetallderivat berechneten Phasen erhalten werden. Diese experimentellen Phasen werden soweit verfeinert, bis die Qualität der Phaseninformation ausreicht schließlich interpretierbare Elektronendichtekarten zu berechnen. Für die Schwermetallderivatisierung wurden Kristalle systematisch in Lösungen verschiedener

Reaktivität der Schwermetallverbindung dauerte die Inkubation wenige Minuten, einige Stunden oder mehrere Tage. Nach der Datensammlung eines putativen Schwermetallderivats erfolgte die Skalierung relativ zum nativen Datensatz und eine Derivatisierung wurde anhand der isomorphen Differenz beurteilt, die im Auflösungsbereich von 25-1.6 Å etwa 10-25 % betrugen. Die Skalierung von Datensätzen erfolgte mit dem in das Programmpaket CCP4 integrierte Programm SCALEIT. Eine Lokalisation der Schwermetallatompositionen erfolgte durch Interpretation der Harker-Schicht entsprechender Differenzpattersonkarten. Weitere Schwermetallatompositionen wurden mittels Differenzfourieranalyse identifiziert. Die anschließende Phasenverfeinerung erfolgte mit den Programmen SHARP (La Fortelle & Bricogne, 1997) und SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996), bis schließlich eine gut interpretierbare MIR Elektronendichtekarten erhalten wurde, die einen semi-automatischen Modellbau mit dem Programm WARP (Lamzin & Wilson, 1997) erlaubten.

3.5.4.2 Die Methode des Molekularen Ersatzes (MR)

Die Phasenbestimmung nach der Methode des MR macht sich ein möglichst strukturverwandtes Modell für die Gewinnung der Phaseninformation der zu lösenden Struktur zunutze (Huber, 1965). Dabei wird nach der Patterson-Suchmethode (Hoppe, 1957; Rossmann & Blow, 1962) verfahren, welche das sechsdimensionale Suchproblem in zwei dreidimensionale Suchen verwandelt. Die Grundlage dieser Methode ist die Pattersonfunktion mit deren Hilfe das Suchmodell in der Elementarzelle durch eine Rotationssuche und eine sich anschließende Translationssuche mit maximaler Korrelation auf die Molekülpositionen im Kristallgitter abgebildet wird. Die Pattersonfunktion ist eine Vektorkarte, in der alle interatomaren Abstände zwischen den Atomen vom Ursprung aus aufgetragen werden. Dabei bezeichnet man intramolekulare Atomabstandsvektoren als Selbstvektoren, während intermolekulare als Kreuzvektoren bezeichnet werden.

Die Rotationsfunktion

Information der gemessenen Intensitäten, nicht aber die Phaseninformation für die Suche benötigt werden. Als Autokorrelationsfunktion enthält die Pattersonsuchfunktion (Gleichung 4) nur Informationen über die relativen Atomabstände innerhalb der Elementarzelle. Ziel der Rotationssuche ist es, die Vektorkarten des Suchmodells mit maximale Korrelation auf die des zu lösenden Moleküls abzubilden.

$$P_{obs}(uvw) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \quad \text{Gleichung 4}$$

Die Translationsfunktion

Nachdem die Selbstvektoren aufeinander abgebildet wurden, erfolgte die Translation des Suchmodells durch die asymmetrische Einheit des Kristalls. Hierbei wurden nach Positionierung des Suchmodells Strukturfaktoramplituden F_{calc} berechnet und mit den beobachteten Strukturfaktoramplituden F_{obs} verglichen. Dabei war zum einen der R-Faktor (Gleichung 5), zum anderen der Korrelationskoeffizient C (Gleichung 6) als Funktion der Molekülposition ein Maß für die Qualität der gefundenen Translationslösung.

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl) - kF_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|} \quad \text{Gleichung 5}$$

$$C = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2}) (|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2})}{\sqrt{\sum_{hkl} (|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2})^2 \sum_{hkl} (|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2})^2}} \quad \text{Gleichung 6}$$

Die Struktur von der GRESAG4.3--AC-Domäne wurde nach der MR-Methode mit dem Programm AMORE gelöst, wobei das Strukturmodell von GRESAG4.1-(A884-Tl132) als Suchmodell diente.

3.5.5 Modellbau und Verfeinerung

Die während der Strukturlösung erhaltenen experimentellen Phasen sind zumeist ungenau

schließlich aus den kristallographischen Daten ein stereochemisch korrektes Strukturmodell zu gewinnen. Die Verfeinerung der Strukturmodelle von GRESAG4.1-(A884-T1131) und GRESAG4.3-AC-Domäne erfolgte mit den Programmen X-PLOR (Version 3.851) und CNS (Brünger, 1990b; Brunger *et al.*, 1997) nach der *conjugate gradient*-Methode. Dabei war das Ziel die beobachteten Strukturfaktoramplituden (F_{obs}) an die berechneten Strukturfaktoramplituden (F_{calc}) anzugleichen. Als Zielfunktion wurde dabei der kristallographische R-Faktor (Gleichung 5), der den Korrelationsgrad zwischen (F_{obs}) und (F_{calc}) beschrieb, unter Berücksichtigung der geometrischen Parameter (Engh & Huber, 1991) minimiert.

Um einer Überverfeinerung entgegenzuwirken, die von einem zu hohen Bias durch das Modell verursacht wurde, erstellte man per Zufallsgenerator ein Testset, das aus ca. 5 % der gemessenen Strukturfaktoramplituden besteht. Dieses Testset wurde nicht für die Modellverfeinerung herangezogen (Brünger, 1990b), sondern diente unter analoger Benutzung von Gleichung 5 der Berechnung des freien R-Faktors (R_{free}), einem objektivem Maß für Qualität des Strukturmodells. Während der konvergenten Strukturverfeinerung war darauf zu achten, daß der Arbeits R-Faktor und der freie R-Faktor nicht mehr als 5 % divergierten, da sonst erheblicher Bias durch das Modell bzw. Überverfeinerung vorlag.

Zu Beginn der Verfeinerung der Modelle von GRESAG4.1-(A884-T1131) und GRESAG4.3-AC-Domäne erfolgte eine *rigid body*-Minimierung, bei der die Strukturmodelle zunächst als starre Einheiten betrachtet und mit Temperaturfaktoren von 15 \AA^2 und Daten in einem Auflösungsbereich von $10\text{-}3 \text{ \AA}$ korrekt positioniert wurden. Während des automatischen Verfeinerungsprozesses wurden die Atompositionen für 200 Zyklen und die Temperaturfaktoren für 50 Zyklen iterativ verfeinert. Dabei wurde der Gewichtungsparemeter zwischen Röntgen- und chemischen Energieterm für die Positionsminimierung der Qualität des Modells angepaßt. War die automatische Verfeinerung bis zur Konvergenz durchgeführt, erfolgte die manuelle Korrektur von außerhalb des Konvergenzradius der automatischen Verfeinerungsprotokolle

Modells. Lagen die Werte der R-Faktoren oberhalb 30 % wurden optional *simulated annealing*-Protokolle in den Verfeinerungsprozeß eingeschoben, besonders wenn zuvor ausgiebige manuelle Korrekturen durchgeführt wurden. Aufgrund der geringen Qualität der Elektronendichte in Modellregionen mit hohen Temperaturfaktoren, vor allem in den Schleifenregionen, konnten manche Teile des Modells erst nach verbesserter Qualität der Elektronendichtekarte sinnvoll in das Modell eingepaßt werden. Nachdem alle fehlenden Seitenketten modelliert waren und der freie R-Faktor einen Wert von ca 30 % erreicht hatte, wurden Wassermoleküle in das Modell eingesetzt. In einem Protokoll zur Suche von Wassermolekülen wurden positive Dichtemaxima in einer SIGMAA gewichteten $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte derart ausgewählt, daß nie mehr als 50-80 Wassermoleküle pro Zyklus unter Berücksichtigung von Bindungs- und Distanzparametern eingesetzt wurden. Nach erneuter automatischer Verfeinerung der Atompositionen, sowie der Temperaturfaktoren, wurden die Wassermoleküle anhand Ihrer B-Faktoren, Positionen und assoziierten $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichte auf Konsistenz überprüft und eventuell entfernt. Die Verfeinerung der Modellstrukturen wurde als konvergent betrachtet, sobald die freien R-Faktoren durch automatische Verfeinerungsprotokolle nicht weiter minimiert werden konnten und in der $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte keine Differenzdichtemaxima > 3.0 vorhanden waren.

3.5.5.1 Graphische Darstellungen

Atomare Modelle wurden auf einer Grafikstation der Firma *Silicon Graphics* mit dem objektorientierten Computergrafikprogramm O dargestellt (Jones *et al.*, 1991). Zur graphischen Darstellung der Modelle wurden die Programme MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und RASTER3D (Bacon *et al.*, 1993) verwendet. Proteinoberflächen, sowie Oberflächenpotentiale wurden mit dem Programm GRASP (Nicholls, 1992) berechnet und dargestellt.

3.5.5.2 Analyse von Atommodellen

Die statistische Analyse von Bindungslängen und -winkeln sowie der Temperaturfaktoren der atomaren Modelle erfolgte mit den Programmen X-PLOR (Version 3.851) sowie CNS ,Version 1.0, (Brunger et al., 1997). Weitere Qualitätsanalysen von Molekülgeometrien erfolgten mit dem Programm PROCHECK ,Version 2.0, (Laskowski *et al.*, 1993).

3.6 Erzeugung strukturbasierter Sequenzvergleiche und Berechnung phylogenetischer Verwandtschaften

Für die Kalkulation der phylogenetischen Verwandtschaft verschiedener Vertreter der Nukleotidzyklen wurden 40 Proteinsequenzen mit dem Programm Seal (Version 1.0) (A. Rambaut, Oxford, personal communication) aligniert. Dabei wurde der strukturelle Sequenzvergleich zwischen den Säuger C1 und C2 Domänen und GRESAG4.1, welches unter Zuhilfenahme des Programmes GA-FIT erstellt wurde als Basis genommen. Ein nicht redundantes Satz von 22 Nukleotidzyklen wurde aus dem erstellten Sequenzvergleich ausgewählt und mit dem Programm PHYLIP, Version 3.57 die phylogenetische Verwandtschaft berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Die trypanosomalen Adenylatzyklasen GRESAG4.1, GRESAG4.3 und ESAG4

4.1.1 Rekombinante Produktion von katalytisch aktiven tAC-Fragmenten

4.1.1.1 Klonierung von GRESAG4.1, GRESAG4.3 und ESAG4

Die Genfragmente, die für die zytosolischen Regionen von GRESAG4.1 (Reste A884-Y1241; 1.11kBp) bzw. (Reste A884-D1117; 1.04kBp), GRESAG4.3 (Reste A867-V1229; 1.09 kBp) und ESAG4 (Reste P897-R1269; 1.11 kBp) kodieren, wurden aus genomischer DNA des *T. brucei* Stammes 927 amplifiziert und in den Expressionsvektor pET28a (Invitrogen) unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *NheI* und *XhoI* (GRESAG4.1, GRESAG4.3) bzw. *NdeI* und *XhoI* (ESAG4) kloniert. Die erzeugten Expressionskonstrukte petGR41-(A884-Y1241) bzw. petGR41-(A884-D1117), petGR43-(A867-V1229) und petES4-(P897-R1269) wiesen folgende Sequenzunterschiede zu den korrespondierenden SWISSPROT Datenbankeinträgen CY41_TRYBB, CY43_TRYBB, CYA4_TRYBB auf:

petGR41-(A884-Y1241) bzw. petGR41-(A884-D1117): Y1120I, Codon für I1032 fehlt.

petGR43-(A867-V1229): R959C, H994S, M995L, N1098S, C1164R und G1165R

petES4-(P897-R1269): K937M, C969R, Q990R, S1047P und R1101Q

4.1.1.2 Rekombinante Expression, Renaturierung und Aufreinigung

Für die rekombinante Expression wurden die Expressionsplasmide petGR41-(A884-Y1241), petGR43-(A867-V1229) und petES4-(P897-R1269) in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert. Testexpressionen ergaben für alle drei rekombinanten tAC-Fragmente optimale Ausbeuten nach 6 h Expression bei 30 °C, wobei die Proteine unlöslich in Form von *inclusion bodies* erhalten wurden. Die tAC-Fragmente wurden in 6 M Guanidiniumchlorid, pH 8.0 solubilisiert und durch Dialyse gegen 20 mM Tris/HCl, 0.1 M DL-DTT, pH 8.0 bei 4°C über

mittels Nickel-NTA Affinitätschromatographie nach einem Waschschrift mit 20 mM Imidazol haltigem Elutionspuffer in einem Stufengradienten bei 250 mM Imidazol eluiert. Nach zwei weiteren, chromatographischen Aufreinigungsschritten, Anionenaustausch über eine Resource Q Säule bzw. Gelfiltration über eine Superdex 26/60 S200 Gelfiltrationssäule, konnten die rekombinanten tAC-Fragmente mit > 95 % Reinheit in Ausbeuten von 4-10 mg/l Kultur erhalten werden. Der Reinheitsgrad wurde anhand von 15 %igen coomassiegefärbten SDS-PAGEs abgeschätzt (Abb. 5).

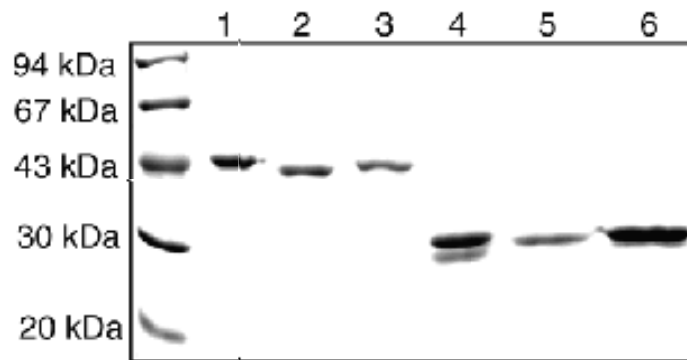


Abbildung 5: 15 %iges SDS-PAGE von GRESAG4.1-(A884-Y1241), GRESAG4.3-(L866-V1229) und ESAG4-(P897-R1296) (Bahnen 1-3), sowie der nach limitierter Proteolyse erhaltenen AC-Domänen GRESAG4.1-(A884-T1131), GRESAG4.3-AC-Domäne und ESAG4-AC-Domäne (Bahnen 4-6). 10 µg Protein wurden in 20 µl Totalvolumen pro Bahn aufgetragen und bei 150 V der Gelelektrophorese unterzogen. Die für das Proteolyseprodukt von GRESAG4.1-(A884-Y1241) beobachteten Doppelbande deutet auf eine Heterogenität des Proteins hin, wie sie durch N-terminale Sequenzierung und ESI-MS, wie in Kap. 4.1.2.3 beschrieben, bestätigt wurde.

4.1.2 Biochemische Charakterisierung von GRESAG4.1-(A884-Y1241), GRESAG 4.3-(A867-V1229) und ESAG4-(P897-R1269)

4.1.2.1 Bestimmung der spezifischen Aktivitäten, Michaelis-Menten-Kinetik und Hill-Koeffizienten

Die aufgereinigten tAC-Fragmente GRESAG4.1-(A884-Y1241), GRESAG4.3-(A867-V1229) und ESAG4-(P897-R1269) wiesen vergleichbare enzymologische Kennwerte auf. Die spezifischen Aktivitäten betrugen 4-5 nmol/mg/min (Tab. 5), womit sie deutlich über der

(Zhang *et al.*, 1997a)), jedoch um ca. drei Größenordnungen unter den spezifischen Aktivitäten eines durch Forskolin und G_s stimulierten C1-C2 Heterodimers lagen ($12.8 \mu\text{M}/\text{min} \cdot \text{mg}$; (Dessauer & Gilman, 1996). Die von den drei tACs katalysierte Reaktion folgte hierbei einer typischen Michaelis-Menten-Kinetik. Aus einem Lineweaver-Burk Plot wurden K_M -Werte von $17\text{-}30 \mu\text{M}$ für das Substrat ATP ermittelt, sowie apparente V_{\max} -Werte von $3\text{-}10 \text{ nmol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ (Tab. 5). Ähnliche kinetische Parameter wurden auch für Klasse I Adenylatzyklen beschrieben (Dessauer & Gilman, 1996; Tang & Gilman, 1995). Die für ATP bestimmten Hill-Koeffizienten der tACs variierten zwischen 0.75 und 0.94, was auf eine leichte Antikooperativität hindeutete, während die Hill-Koeffizienten anderer Nukleotidzyklen mit Werten von 1.0-1.3 eher mit leichter Kooperativität konform sind (Wedel *et al.*, 1997). Somit deuten die Hill-Koeffizienten eine relativ weitgehende Unabhängigkeit der katalytischen Zentren der tACs voneinander an.

Protein	$K_{M(\text{ATP})}$ [μM]	V_{\max} [nmol/min*mg]	Hill- Koeffizient	Molekular- gewicht [kDa]	Spez. Aktivität [nmol/min*mg]
ESAG4-(P897-R1296)	24.7 ± 2.3	9.7 ± 1.1	0.90 ± 0.00	40.9	4.7 ± 0.3
ESAG4-AC-Domäne	-	-	-	25.9	4.5 ± 0.3
GRESAG4.3-(L866-V1229)	24.0 ± 2.0	8.3 ± 1.0	0.94 ± 0.20	41.3	4.6 ± 0.1
GRESAG4.3-AC-Domäne	-	-	-	27.6	4.3 ± 0.0
GRESAG4.1-(A884-Y1241)	16.6 ± 0.1	2.9 ± 0.1	0.75 ± 0.10	40.2	4.2 ± 0.4
GRESAG4.1-(A884-T1131)	29.5 ± 0.4	2.6 ± 0.2	0.78 ± 0.10	27.9	3.9 ± 0.2
GRESAG4.1-(A884-D1117)	-	-	-	26.7	5.2 ± 0.3

Tabelle 5: Enzymologische Kennwerte der in dieser Arbeit untersuchten tACs sowie der proteolytisch generierten AC-Domäne von GRESAG4.1. Die bestimmten kinetischen Parameter liegen in ähnlichen Größenordnungen, was die hohe Verwandtschaft der Isozyme untereinander widerspiegelt. Weiterhin wird aus dem Vergleich der enzymologischen Daten der beiden GRESAG4.1-Fragmente deutlich, daß die C-terminal lokalisierte, trypanosomale variable Domäne für die Katalyse bedeutungslos ist. Untersuchungen der Aktivität in Gegenwart von 2.5 mM GTP zeigten keinen meßbaren Umsatz. Für die Bestimmung des K_M -Wertes wurden die linearen Anfangsgeschwindigkeiten bei einer Proteinkonzentration von $0.25 \mu\text{M}$ bei 25°C und pH 8.0 durchgeführt, wobei das Zeitfenster der linearen Anfangsgeschwindigkeit zwischen 0 und 60 s lag. Die linearen Anfangsgeschwindigkeiten wurden mit Substratkonzentrationen zwischen 5 und $500 \mu\text{M}$ bestimmt. Die Messungen der spezifischen Aktivitäten wurden bei einer Proteinkonzentration von 0.5 nM, bei 25°C , pH 8.0, 2.5 mM ATP in Triplikatbestimmungen durchgeführt.

Die Untersuchung des Einflusses zunehmender Salzkonzentration auf die spezifische Aktivität von GRESAG4.1-(A884-Y1241) ergab den in Abb. 6 gezeigten Kurvenverlauf, wobei mit zunehmender Salzkonzentration ein Anstieg der spezifische Aktivität beobachtet wurde.

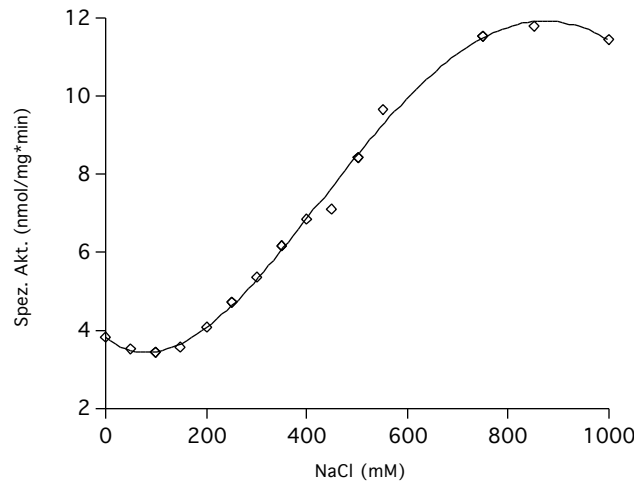


Abbildung 6: Effekt der Salzkonzentration auf die spezifische Aktivität von GRESAG4.1-(A884-Y1241). Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 0.5 nM, bei 25 °C und pH 8.0 in einer Duplikatbestimmung durchgeführt.

4.1.2.2 Einfluß zweiwertiger Ionen auf die tAC-Aktivität

Adenylatzyklasten und Guanylatzyklasten sind im allgemeinen in ihrer Aktivität von der Gegenwart zweiwertiger Ionen abhängig. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der tACs von Mg^{2+} und Mn^{2+} wurde im Bereich zwischen 0 und 150 mM ermittelt (Abb. 7). Die IC_{50} -Werte für die Aktivierung betragen für Mg^{2+} : 5.6 ± 3.9 mM, für Mn^{2+} : 2.6 ± 1.8 mM. Damit zeigte GRESAG4.1-(A884-Y1241) eine um den Faktor 7 erhöhte maximale spezifische Aktivität mit Mangan als Cofaktor als mit Magnesium. Eine höhere spezifische Aktivität in Gegenwart von Mn^{2+} wurde auch bei Untersuchungen an Membranfraktionen trypanosomaler Zellen (Martin *et al.*, 1978) beobachtet. Insgesamt zeigten die tACs damit wie alle bisher charakterisierten ACs eine Präferenz für Mangan als katalytischen Kofaktor (Dessauer & Gilman, 1996; Tang & Gilman, 1995).

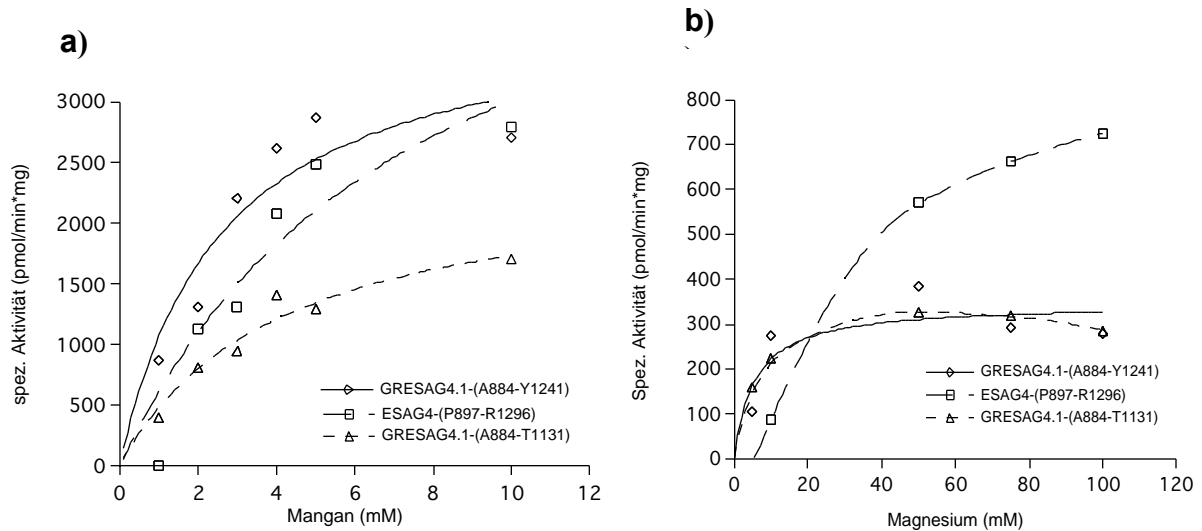


Abbildung 7: Effekt der divalenten Kationen Mangan a) und Magnesium b) auf die spezifische Aktivität der tACs. Wie aus den Diagrammen ersichtlich ist, zeigen die tACs eine Präferenz für Mangan als Kofaktor, womit sie mit allen bisher untersuchten Nukleotidzyklen konform gehen. Die beiden GRESAG4.1 Fragmente weisen einen Aktivitätsverlauf auf, der unbeeinflusst von der Gegenwart der trypanosomalen Domäne ist. Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 0.5 nM, bei 25 °C und pH 8.0 in einer Duplikatbestimmung durchgeführt.

4.1.2.3 Kartierung der Domänengrenzen von GRESAG4.1

Ein Sequenzvergleich zwischen den tACs und den C1 und C2 Domänen der Klasse I Adenylatzyklen aus Säugern (Abb. 36, siehe Anhang) zeigte, daß der höchste Konservierungsgrad mit einer Sequenzidentität von etwa 20 % für einen 230-240 Aminosäurereste umfassenden zytosolischen Bereich zu finden war. Hierbei handelt es sich um die katalytische AC/GC-Domäne, die sich bei den tACs direkt an die putative Transmembranhelix anschließt. Bei den tACs sowie den Klasse II ACs aus *Leishmania donovani* folgt diesem Bereich C-terminal eine etwa 110 Aminosäurereste umfassende trypanosomale variable Domäne, die mit 54-78 % Sequenzidentität verglichen mit 83-87 % Sequenzidentität im Bereich der AC-Domäne eine deutlich verringerte Homologie aufweist. Die Funktion dieser für trypanosomale ACs charakteristischen Region ist bisher unbekannt, weshalb näher untersucht wurde ob die Abwesenheit dieser Domäne einen Einfluß auf die katalytische

Domäne durch limitierten Proteolyseverdau von der katalytischen Domäne quantitativ abgespalten werden konnte. Im Fall von GRESAG4.1-(A884-Y1241) konnte bei einer Proteinkonzentration von 0.5 mg/ml in Gegenwart von 0.05 mg/ml Subtilisin, bei GRESAG4.3-(A867-V1229) und ESAG4-(P897-R1269) unter den gleichen Bedingungen mit Proteinase K distinkte Verdauprodukte mit apparenten Molekulargewichten von ca. 28 kDa beobachtet werden. Mittels Anionenaustauscherchromatographie konnten diese Spaltprodukte bis zur Homogenität gereinigt werden (Abbildung 5; Bahnen 4-6). N-terminale Proteinsequenzierung nach Edman und massenspektrometrische Analyse (ESI-MS) des von GRESAG4.1 erhaltenen Proteolyseprodukts zeigten, daß durch limitierte Proteolyse ein Spaltprodukt entstand, dessen C-Terminus mit dem Rest T1131 endete, der somit als der C-Terminus der AC/GC-Domäne identifiziert wurde. Der N-Terminus beinhaltete den vorhergesagten Anfang der AC/GC-Domäne, A884, wobei eine leichte Heterogenität durch unvollständigen Abverdau des His₆-Thrombinlinker-Peptids innerhalb des N-Terminus von GRESAG4.1 vorlag (Abb. 8).

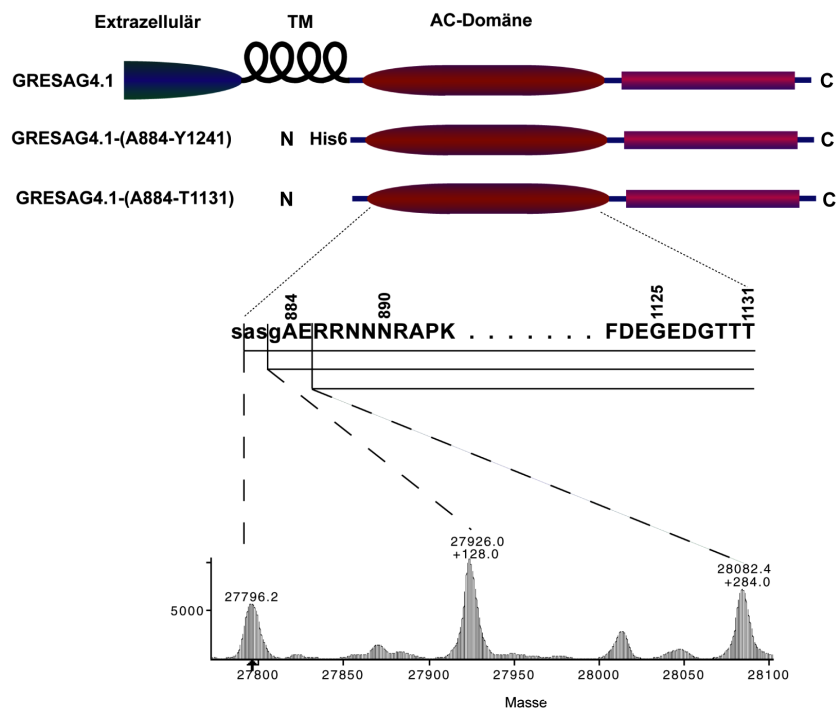


Abbildung 8: ESI-MS des subtilisinbehandelten GRESAG4.1-(A884-Y1241)-Fragmentes. Das Massenspektrum weist drei Hauptpeaks mit den Molekulargewichten 27.80 kDa, 27.93 kDa und 28.08 kDa auf. Die durch Edman-Abbau bestimmten N-Termini sind darüber dargestellt und den Massenpeaks entsprechend zugeordnet. Beide Analysemethoden zeigen, daß das subtilisinverdaute GRESAG4.1-

Fragment eine N-terminale Heterogenität über die Aminosäuren A881-E885 aufweist, während der C-Terminus aller Fragmente einheitlich mit T1131 endet.

Die biochemische Charakterisierung der auf die AC/GC-Domäne reduzierten tAC-Fragmente ergab Aktivitätsprofile, die denen der aus AC/GC-Domäne und trypanosomalen variablen Domäne bestehenden tACs sehr ähnlich waren. Insbesondere lagen die spezifischen Aktivitäten der Proteolyseprodukte wie die der intakten Proteine bei 4-5 nmol/min*mg. Desweiteren zeigte die Abspaltung der C-terminalen Region nur mäßige Effekte auf den $K_M(\text{ATP})$ -Wert bzw. V_{\max} von GRESAG4.1-(A884-T1131) (Tab. 5). Auch die Abhängigkeit von den zweiwertigen Ionen Magnesium und Mangan blieb durch die Entfernung der variablen trypanosomalen Domäne unbeeinflusst (Abb. 7). Dies zeigte, daß unter den gewählten experimentellen Bedingungen die katalytische AC/GC-Domäne der tACs von der variablen, trypanosomalen Domäne in ihrer katalytischen Aktivität unabhängig ist.

4.1.2.4 Einfluss von Ca^{2+} , Anionen und P-Site Inhibitoren auf die spezifische Aktivität der tACs

Untersuchungen an permeabilisierten Zellen und Membranfraktionen von *T. brucei* bzw. an tACs-überexprimierenden Hefezellen deuteten auf einen differentiellen Einfluß von Ca^{2+} auf die katalytische Aktivität der trypanosomalen Isozyme hin. So wird einzig die Blutstrom-spezifische Form ESAG4 um einen Faktor von 2.3 stimuliert, während das konstitutiv exprimierte Isozym GRESAG4.1 unbeeinflusst bleibt (Paindavoine et al., 1992; Rolin *et al.*, 1990; Voorheis & Martin, 1980; Voorheis & Martin, 1981; Voorheis & Martin, 1982). Eine Untersuchung der Wirkung von Ca^{2+} in An- und Abwesenheit von trypanosomalen Calmodulin zeigte jedoch keinen Effekt auf die Aktivität der tACs. Insofern muß geschlossen werden, daß eine ESAG4-spezifische Aktivierung durch Calcium nicht auf die zytosolische Region unmittelbar zurückzuführen ist, sondern weitere Bereiche des Enzyms, z.B. die extrazelluläre Domäne, darin involviert sind.

Spez. Aktivität	GRESAG4.1-(A884-Y1241)	GRESAG4.3-(L866-V1229)	ESAG 4-(P897-R1296)
Wildtyp	100 %	100 %	100 %
0.1 mM Ca ²⁺	100 % ± 0.2	97.5 % ± 1	99.3 % ± 3.3
4 µM CaM	100 % ± 0.2	89.6 % ± 6.2	96.8 % ± 7.7
4 µM CaM / 0.1 mM Ca ²⁺	72.0 % ± 3.7	77.6 % ± 5.4	79.5 % ± 6.9

Tabelle 6: Vergleich der Aktivität der zytosolischen-Fragmente der tACs in Gegenwart und Abwesenheit von Ca²⁺, Ca/CaM. Wie aus den Werten ersichtlich ist, kann innerhalb der Fehlergrenzen kein Einfluß von Ca²⁺ oder Ca²⁺/CaM auf die hier untersuchten tACs beobachtet werden. Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 0.5 nM, bei 25 °C und pH 8.0 in einer Triplikatbestimmung durchgeführt, das trypanosomale CaM wurde von Curtis L. Patton erhalten.

Klasse I ACs werden in Gegenwart von Pyrophosphat von sogenannten P-Site Inhibitoren wie 2'-Deoxy-adenosin und seiner 3'-Mono- oder Polyphosphatderivate nicht-kompetitiv inhibiert (Desaubry *et al.*, 1996a; Desaubry *et al.*, 1996b). Diese P-Site Inhibitoren gehören zu den stärksten bisher bekannten Inhibitoren von Klasse I Adenylatzykласen, was sich in ihren extrem niedrigen IC₅₀-Werten, die im nanomolaren Bereich liegen, widerspiegelt. Wurde GRESAG4.1-(A884-T1131) mit 2'-Deoxyadenosin bzw. seinem 3'-Monophosphatderivat in Konzentrationen bis zu 100 µM, in Gegenwart von Pyrophosphat inkubiert, so wurde keine Abnahme der katalytischen Aktivität beobachtet (Abb. 9).

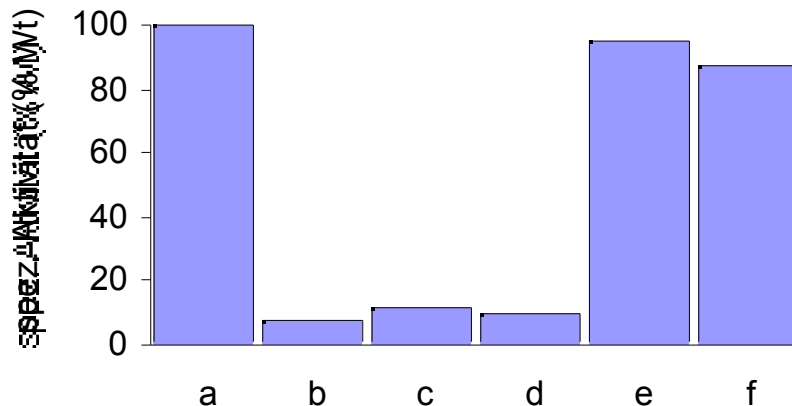


Abbildung 9: Effekt von Pyrophosphat und den P-Site Inhibitoren 2'-Deoxyadenosin bzw. seinem 2'-Deoxyadenosin-3'-phosphat auf GRESAG4.1-(A884-T1131).

a: -

b: 100 µM 2'-Deoxyadenosin

d:100 μ M Pyrophosphat + 100 μ M 2'-Deoxyadenosin-3'-phosphat

e:100 μ M 2'-Deoxyadenosin

f:100 μ M 2'-Deoxyadenosin-3'-phosphat

Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 2.0 nM, bei 25 °C und pH 8.0 in einer Duplikatbestimmung durchgeführt.

Somit sind tACs, ebenso wie lösliche bakterielle und eukaryontische ACs (Johnson & Shoshani, 1990) insensitiv gegenüber P-Site Inhibitoren. Dagegen bewirkte das Polyanion Pyrophosphat mit einem IC_{50} -Wert < 1.0 mM eine deutliche Inhibition von GRESAG4.1-(A884-T1131), wie auch schon frühere Untersuchungen an intakten Membranfraktionen von *T. brucei* zeigten (Martin et al., 1978). Neben Pyrophosphat üben auch Phosphat und Sulfat mit IC_{50} -Werten von 21 ± 5 mM bzw. 53 ± 7 mM einen inhibierenden Effekt aus (Abb. 10).

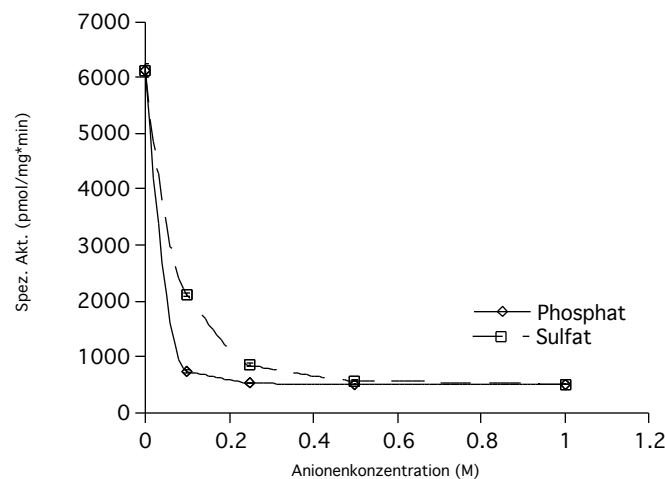


Abbildung 10: Effekt der Anionen Phosphat und Sulfat auf die spezifische Aktivität von GRESAG4.1-(A884-T1131). Die IC_{50} -Werte betragen 21 mM für Phosphat bzw. 53 mM für Sulfat. Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 2.0 nM, bei 25 °C und pH 8.0 in einer Duplikatbestimmung durchgeführt.

4.1.3 Röntgenstrukturanalyse von GRESAG4.1-(A884-T1131) und der GRESAG4.3-AC-Domäne

4.1.3.1 Orthorhombische Kristallform A von GRESAG 4.1-(A884-T1131)

Die Suche nach Kristallisationsbedingungen für das GRESAG4.1-Fragment erfolgte mit Hilfe der nicht-kompletten Faktorendurchmusterung (*sparse matrix sampling*, Jancarik & Kim, 1991). Anders als für die komplette zytosolische Region von GRESAG4.1-(A884-Y1241), die unter allen getesteten Kristallisationsbedingungen nur Aggregation zeigte, konnte für

GRESAG4.1-(A884-T1131) Kristallisation unter Bedingung Nr. 4 beobachtet werden (siehe Anhang, Tab. 10 für Kristallisationsbedingungen des *sparse matrix screens*). Davon ausgehend wurde die Kristallisationsbedingung auf 4 mg/ml GRESAG4.1-(A884-T1131), 1.9 M Ammoniumsulfat, 2.5 mM DL-DTT, 0.1 M Tris/HCl, pH 7.75, 18 °C für die Züchtung säulenförmiger Kristalle optimiert (Abbildung 11a). Die Kristalle der GRESAG4.1-AC-Domäne erreichten in einem Zeitraum von 1-4 Tagen maximale Ausmaße von 0.3 x 0.1 x 0.1 mm₃.

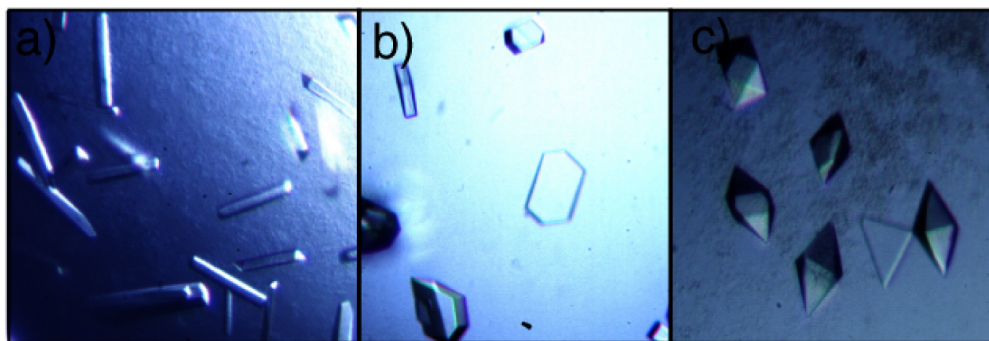


Abbildung 11: Kristalle der katalytischen AC-Domänen aus GRESAG4.1 in Kristallform A und B a) b) bzw. aus GRESAG4.3 c).

Für diese Kristalle wurde die orthorhombische Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit den Zellmaßen $a = 49.9 \text{ \AA}$, $b = 60.1 \text{ \AA}$, $c = 79.7 \text{ \AA}$ ermittelt. Unter der Annahme einer Besetzung mit einem Monomer pro asymmetrischer Einheitszelle wurde ein Solvensgehalt der Kristalle von 35 % berechnet (Matthews, 1968). Die orthorhombischen GRESAG4.1-(A884-T1131)-Kristalle wurden für die Datensammlung in kryokompatiblen Kristallisationspuffer (1.8 M Ammoniumsulfat, 2.5 mM DL-DTT, 0.1 M Tris/HCl, pH 7.75, 20 % v/v Glycerin) für 2-10 min äquilibriert und im Kryostaten bei 100 K schockgefroren. Die Sammlung eines ersten nativen Datensatzes erfolgte an der BW6 beamline (DESY, Hamburg) bis zu einem Diffraktionslimit von 1.9 \AA auf einer 13.5 cm MAR CCD-Kamera, ein zweiter nativer Datensatz wurde an der BW7B beamline (EMBL, DESY, Hamburg) auf einer 30 cm MAR *imaging plate* bis 1.45 \AA gesammelt (siehe Anhang, Tab. 11). Die Vollständigkeit der Daten des hochaufgelösten Datensatzes, der schließlich für die Strukturverfeinerung herangezogen wurde, betrug 98.7 %

4.1.3.2 Orthorhombische Kristallform B von GRESAG 4.1 (A884-T1131)

Eine zweite Kristallform von GRESAG4.1-(A884-T1131) wurde in Kristallisationsbedingung Nr. 38 des *sparse matrix screens* erhalten (Abbildung 11b). Die optimierte Bedingung für diese Kristallform war 4 mg/ml GRESAG4.1-(A884-T1131), 2.0 M Natriumcitrat, 2.5 mM DL-DTT 0.1 M Tris/HCl, pH 5.5, 18°C. Die Indizierung der Kristalle ordnete sie der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12$ mit den Zellmaßen $a=123.8 \text{ \AA}$, $b=35.8 \text{ \AA}$, $c=59.3 \text{ \AA}$ zu. Auch diese Kristallform wies ein Monomer pro asymmetrischer Einheitszelle auf, wodurch der Solvensgehalt 40 % betrug. Die Kristallform B von GRESAG4.1-(A884-T1131) war weniger reproduzierbar als Kristallform A und stellte in ihren Diffraktionseigenschaften mit einem an einer RU-200 CuK α -Drehanode (Rigaku, 50 kV, 80 mA, $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$) gemessenen maximalen Auflösungslimit von 2.1 \AA keine Verbesserung gegenüber der Kristallform A dar. Die Sammlung eines kompletten Datensatzes eines bei 100 K im Kristallisationspuffer schockgefrorenen Kristalls erfolgte auf einer 30 cm MAR *imaging plate* an der Röntgendrehanode (siehe Anhang, Tab. 11). Die Vollständigkeit der Daten betrug 88.2 % (68.8 %) mit einem R_{merge} von 0.045 (0.250).

4.1.3.3 Tetragonale Kristallform der GRESAG4.3-AC-Domäne

Die AC-Domäne von GRESAG4.3 konnte unter einer Vielzahl von Bedingungen des *sparse matrix screens* kristallisiert werden, wobei jedoch aufgrund einer hohen Nukleationsneigung zumeist das Auftreten von Kristallschauern zu beobachten war. Ausgehend von Bedingung Nr. 6 des *sparse matrix screens* konnte nach Variation des pH-Wertes und der Fällungsmittelkonzentration die Nukleationsbildung soweit reduziert werden, daß Einkristalle (Abbildung 11 c) bei 6 mg/ml der GRESAG4.3-AC-Domäne, 20 % (w/v) PEG 4000, 2.5 mM DL-DTT, 0.1 M Tris/HCl, pH 7.0, 18 °C erhältlich wurden. Die GRESAG4.3-Kristalle wuchsen in einem Zeitraum von 1-4 Tagen heran, wobei nach 2 Tagen die Fällungsmittelkonzentration von 20 % (w/v) PEG 4000 auf 35 % (w/v) erhöht wurde, um die Wachstumsphase zu verlängern

GRESAG4.3-AC-Domäne gehören zur tetragonalen Raumgruppe $I4_1$ mit den Zellparametern $a=b=89.7 \text{ \AA}$, $c=67.4 \text{ \AA}$. Der Solvensgehalt der Kristalle betrug 40 %, wobei die asymmetrische Einheitszelle ebenfalls mit einem Monomer besetzt war. Es wurden zwei Datensätze von im Kryostrahl bei 100 K schockgefrorenen Kristallen jeweils auf einem MAR CCD-Detektor aufgenommen: ein nativer Datensatz bis 1.63 \AA Auflösung an der ID14/3 beamline des ESRF, Grenoble, und ein 1.9 \AA Datensatz eines in Gegenwart von 0.2 M Magnesiumchlorid gewachsenen Kristalls, der an der BW6 beamline, MPG-ASMB HASYLAB, Hamburg vermessen wurde (Siehe Anhang, Tab. 11). Die Vollständigkeit der Daten des nativen Datensatzes betrug 91.7 % (99.7 %) mit einem R_{merge} von 0.036 (0.084).

4.1.3.4 Phasenbestimmung von GRESAG 4.1-(A884-T1131)

Die Struktur von GRESAG4.1-(A884-T1131) wurde nach der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes (MIR) gelöst, nachdem Versuche erfolglos waren, die Struktur mittels *molecular replacement* und den vorhandenen Strukturen für die C1 und C2 Domänen aus Klasse I ACs zu lösen. Für die MIR-basierte Phasierung wurden neben dem nativen Datensatz drei Datensätze von Schwermetallderivaten der Kristallform A aufgenommen. Die Derivatisierung erfolgte dabei durch Inkubation der Kristalle in Gefrierpuffer in Gegenwart von 10 mM des entsprechenden Schwermetallsalzes für 2-8 h bei Raumtemperatur. Die Datensätze der in Gegenwart von Methylquecksilberhydroxid bzw. Trimethylbleiacetat inkubierten Kristalle wurden an der BW6 beamline bis zu einem Diffraktionslimit von 2.3 \AA bzw. 1.5 \AA aufgenommen (Anhang, Tab. 11). Aufgrund hinreichender Isomorphie und eines hohen Substitutionsgrades betrug die *phasing power* des Trimethylbleiacetat-Derivates 1.91, bzw. des Methylquecksilberhydroxid-Derivates 1.39. Trotz der hohen Qualität der beiden Schwermetallderivate war die aus den experimentellen Phasen erhaltene Elektronendichtekarte nach Anwendung von *solvent flattening* Protokollen zunächst nicht interpretierbar, was auf den geringen Solvensgehalt der orthorhombischen Kristallform A zurückgeführt wurde. Erst nach

CuK : = 1.5418 Å) (Anhang Tab. 11), der hohe Anteile anomaler Streuung aufwies, wurde nach Phasenverfeinerung in SHARP (La Fortelle & Bricogne, 1997) und *solvent flipping* mit SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) eine 1.9 Å MIR-Elektronendichtekarte erhalten, in der die Modellstruktur semi-automatisch mit dem Programm WARP (Lamzin & Wilson, 1997) erzeugt werden konnte.

4.1.3.5 Strukturbestimmung der GRESAG 4.3-AC-Domäne

Die Bestimmung der Struktur der GRESAG4.3-AC-Domäne Struktur gelang nach der Methode des Molekularen Ersatzes unter Verwendung der vorigen GRESAG4.1-(A884-T1131) Struktur als Suchmodell. Die Rotations- und Translationssuche erfolgte mit dem Programm AMORE in einem Auflösungsbereich von 4-15 bzw. 4-10 Å. Die beste Lösung wurde mit einem Korrelationskoeffizienten von 42.6 (zweitbeste Lösung 13.6) und einem R-Faktor von 43.6 % (zweitbeste Lösung 51.8 %) erhalten. Nach *rigid body*-Verfeinerung dieser Lösung stieg der Korrelationskoeffizient auf 61.4 % und der R-Faktor sank auf 38.9 %.

4.1.3.6 Strukturverfeinerung von GRESAG4.1-(A884-T1131) und GRESAG 4.3-(A867-T1118)

Das Modell von GRESAG4.1-(A884-T1131) wurde bis zu einem R-Faktor/freien R-Faktor von 17.8/20.5 % für Daten zwischen 10.0 Å und 1.46 Å verfeinert (Anhang, Tab. 11). Die beiden Modelle für die GRESAG4.3-AC-Domäne in An- bzw. Abwesenheit von Mg²⁺ wurden für Daten zwischen 10.0 Å und 1.9 Å bzw. 10.0 Å und 1.6 Å bis zu einem R-Faktor/freien R-Faktor von 22.0/23.0 % bzw. 21.0/24.0 % verfeinert (Siehe Anhang, Tab. 11). Die Stereochemie der Modelle von GRESAG4.1-(A884-T1131) und der GRESAG4.3-AC-Domäne wurde auf Konsistenz durch Ramachandran-Plots und dem Computerprogramm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) überprüft, wobei die folgenden Seitenketten durch Elektronendichte nicht definiert waren:

GRESAG4.1-(A884-T1131)	GRESAG4.3-AC-Domäne
11026	1085 (CD, CEF)

R1092 (CD-NH2)	K1027 (CG-NZ)
D1117 (CB-OD2)	R1080 (CG-NH2)
E1119 (CB-OE2)	

Tabelle 7: Tabellarische Listung der Seitenketten, die in den Strukturmodellen von GRESAG4.1 und GRESAG4.3 keine Definition durch Elektronendichte aufwiesen. Im Strukturmodell von GRESAG4.1 wiesen die Seitenketten der Reste E908, E967, C971, S1013 und M1065 alternative Konformationen auf.

4.1.3.7 Struktur von GRESAG4.1-(A884-T1131) und der GRESAG4.3-AC-Domäne

Die bei einer Auflösung von 1.46 Å konvergent verfeinerte Struktur von GRESAG4.1-(A884-T1131) enthält die Reste N888-A1122, ein Molekül (2S,3S)-1,4-dimercapto-2,3-butandiol (D-DTT), ein Sulfation und 276 Wassermoleküle. Fünf weitestgehend solvensexponierte Seitenketten wurden in alternativen Konformationen beobachtet (Tab. 5). Die hohe Qualität der $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte ist in Abb. 12 dargestellt. Die native und die Magnesium-komplexierte Struktur der GRESAG4.3-AC-Domäne enthalten die Reste D876-D1105 und 265 bzw. 264 Wassermoleküle und ein Magnesiumion.

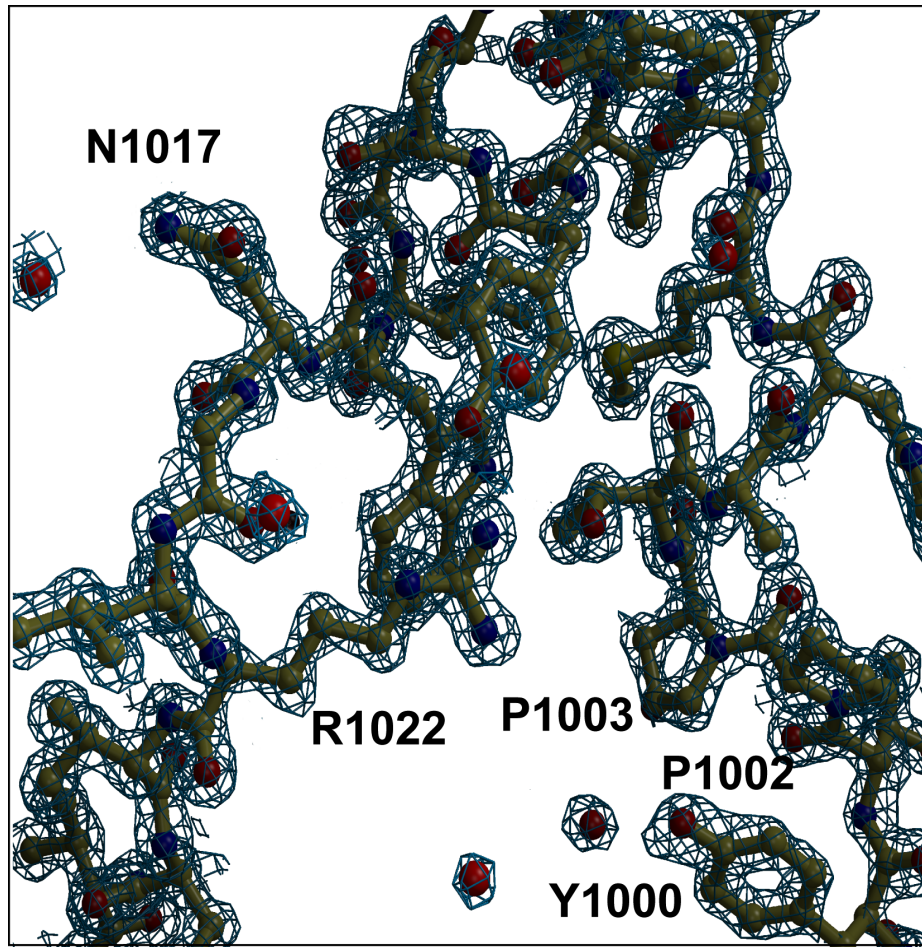


Abbildung 12: $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte des Strukturmodells von GRESAG4.1 bei 1.46 Å Auflösung nach Verfeinerung mit CNS (R-Faktor/freier R-Faktor 17.8 %/20.5 %, Konturierungslevel: 2.0 σ).

Die beiden trypanosomalen Adenylatzyklasten GRESAG4.1 und GRESAG4.3 haben die gleiche Gesamtstruktur, bestehend aus einem siebensträngigen β -Faltblatt, das an seiner Rückseite über zwei parallele α -Helices 2 und 3 und an der Frontseite über Helix 4, die die β -Stränge 1-4 kreuzt, verbunden ist (Abb. 13). Zusammen mit den β -Strängen 1-4 formen die Helices 1-2 und 3 ein $\alpha\beta$ -Sandwich. C-terminal schließt sich an dieses Strukturmotiv ein β -Haarnadelmotiv an, daß durch 4 und 5 ausgebildet wird (Reste D1032-T1045).

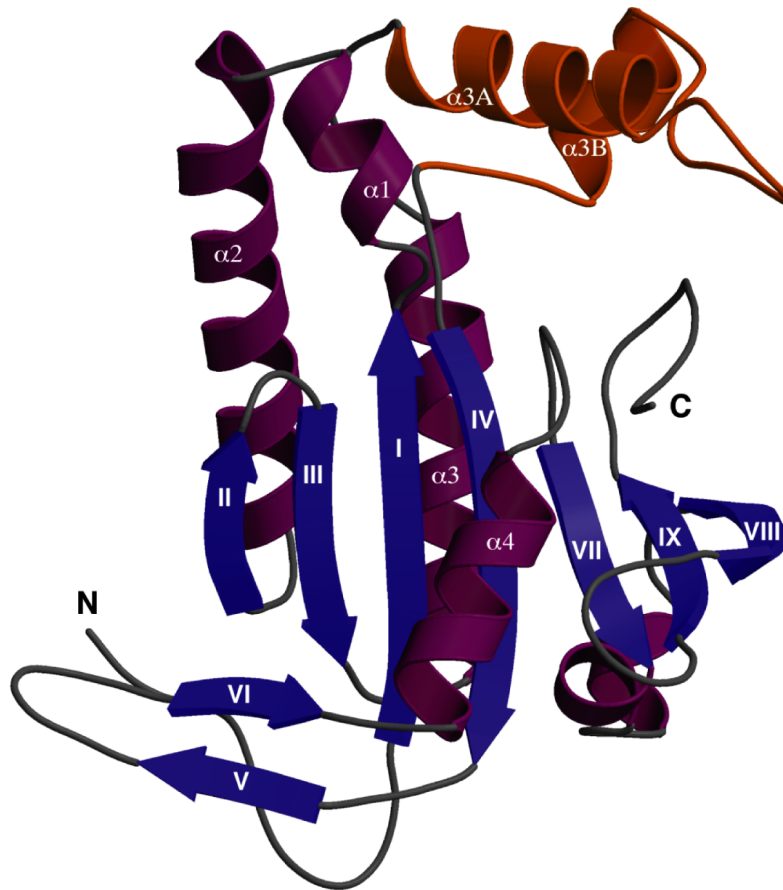


Abbildung 13: Struktur von GRESAG4.3. α -Faltblätter sind in blau, α -Helices in lila dargestellt. Die α -Subdomäne, bestehend aus den beiden α -Helices $\alpha3A$ und $\alpha3B$ ist in orange dargestellt.

Das α -Haarnadelmotiv ist über $\alpha4$ C-terminal mit den letzten drei antiparallel angeordneten α -Strängen 7-9 verbunden, die von einem langen C-terminalen Strang (Reste L1103-A1122) gefolgt werden. Die beiden tAC-AC Strukturen zeigen hohe strukturelle Ähnlichkeiten zueinander, mit einem rmsd von 0.067 Å für 227 äquivalente C-Atompositionen. Kleinere strukturelle Unterschiede weisen lediglich die Spitze des verlängerten α -Haarnadelmotives (Reste D1032-T1045), die Schleife zwischen $\alpha3A$ und $\alpha3B$ (Reste C999-D1009) und der C-Terminus auf. Diese Unterschiede sind sehr wahrscheinlich auf die erhöhte Flexibilität dieser Regionen, die in beiden Strukturen die höchsten B-Faktoren aufweisen, zurückzuführen.

4.1.3.8 Ionenbindung auf der katalytischen Oberfläche der tACs

In der 1.46 Å Struktur von GRESAG4.1 wurde ein aus dem Kristallisationspuffer

stammendes Sulfation beobachtet, das auf der katalytischen Oberfläche, das an die Seitenketten von R1116 (NH1 3.03 Å) und R1023 (NH2 3.03 Å, NH1 2.95 Å) bindet (Abb. 14b). In der Struktur des in Gegenwart von 0.2 M Magnesiumchlorid gezüchteten Kristalls von GRESAG4.3 war ein Magnesiumion mit den hochkonservierten Aspartaten D894 (OD1 2.45 Å; OD2 2.89 Å) und D937 (OD1 2.29 Å) koordiniert (Abb. 14a), was sich in den niedrigen Temperaturfaktoren ($B = 22.3 \text{ Å}^2$) und der Koordinationsgeometrie widerspiegelte.

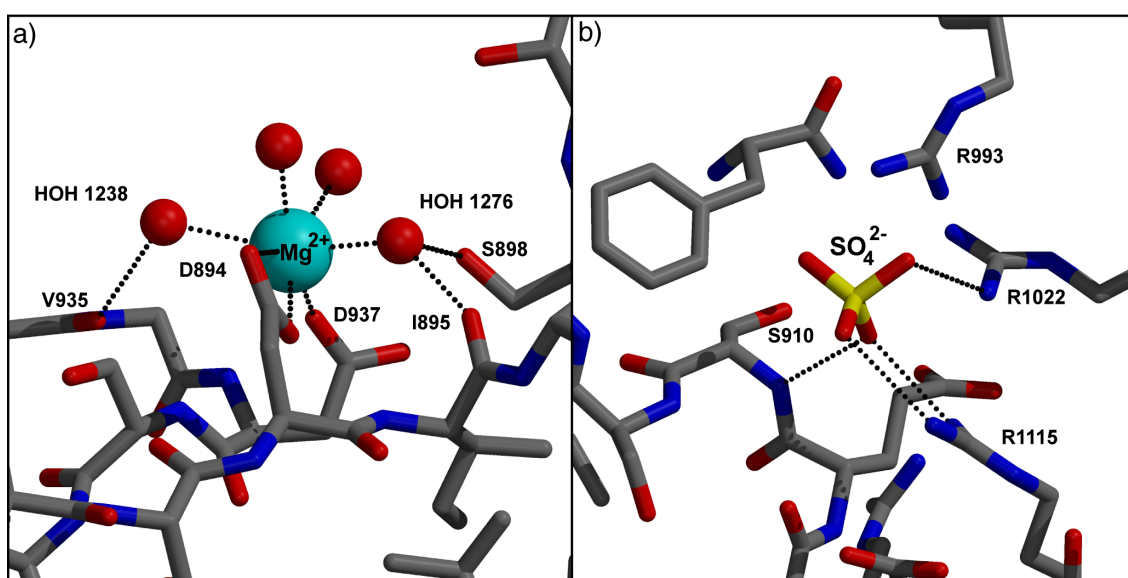


Abbildung 14: In a) In der Struktur der Mg^{2+} -komplexierten AC-Domäne von GRESAG4.3 wird das Magnesiumion durch zwei hochkonservierte Aspartate, D894 und D937, koordiniert. Da die Magnesiumbindung in Abwesenheit von Substrat erfolgte, wurde die verzerrt oktaedrische Koordinationssphäre um das Metallion von vier Wassermolekülen ausgebildet, von denen zwei in weitere Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein involviert waren.

b) In der Struktur von GRESAG4.1, Kristallform A, wurde ein Sulfatatom lokalisiert, das an der katalytischen Oberfläche teilweise von konservierten Resten (R1022) des katalytischen Zentrums über Wasserstoffbrückenbindungen koordiniert ist.

Die verzerrt oktaedrische Koordinationssphäre des Metallions wurde auf der dem Lösungsmittel zugewandten Seite durch vier Wassermoleküle vervollständigt. Der Vergleich zwischen der Magnesium-gebundenen und -freien Struktur von GRESAG4.3 zeigte keine signifikanten strukturellen Unterschiede. In der magnesiumfreien Struktur wurde die Position des Magnesiumions durch ein Wassermolekül besetzt, was vermutlich dazu führt, daß die Metallbindung ohne größere konformationelle Änderungen auf der katalytischen Oberfläche

4.1.3.9 Die α -Subdomäne und eine putative allosterische Kavität

Klasse I Adenylatzyklen werden durch G_s , membrangebundene Guanylatzyklen (pGCs) aus Retina durch das Guanylatzyklase-aktivierende Protein (GCAP) stimuliert (Sokal *et al.*, 1999; Tesmer *et al.*, 1997). Die Bindungsstelle für diese regulatorischen Proteine befindet sich bei den Nukleotidzyklen in einer Region, die durch $\alpha 2$ und die $\alpha 3$ - $\alpha 4$ Schleife ausgebildet wird. In den tACs weist diese Region die größte topologische Differenz zu den AC/GC-Domänen anderer Nukleotidzyklen durch eine Insertion von 36 Resten zwischen $\alpha 3$ und $\alpha 4$ auf, die die 26 Å lange α -Helix $\alpha 3A$ (A982-R994) und die kürzere α -Helix $\alpha 3B$ (P1010-L1016) umfaßt. Aufgrund ihres β -förmigen Erscheinungsbildes bei Aufsicht auf die tAC-Domäne wird diese Insertion im folgenden kurz als β -Subdomäne bezeichnet (Abbildung 13). Ein Sequenzvergleich aller Nukleotidzyklaseklassen zeigt deutlich, daß diese β -Subdomäne ausschließlich bei den Klasse II Adenylatzyklen von *T. brucei* und *L. donovani* auftritt, ansonsten aber in keiner anderen AC-Klasse anzutreffen ist. Teile der α -Helix $\alpha 3A$ sind eng mit $\alpha 1$ und dem vorangehenden β -Knick assoziiert, etwa über die Seitenketten V983 und F990, die zusammen mit A913 und L914 einen hydrophoben Cluster ausbilden. Desweiteren organisiert der am N-Terminus des α -Strangs $\alpha 4$ lokalisierte Rest R1021 einen erheblichen Teil der β -Subdomäne durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu Y987 (OH 3.1 Å), E991 (OE2 3.0 Å), T1005 (OG1 3.0 Å) und Y1013 (OH 2.8 Å). Aus diesen stabilisierenden Interaktionen mit dem globulären Proteinkern resultiert eine hohe Invarianz der β -Subdomäne zwischen den GRESAG4.1 und GRESAG4.3 Strukturen, die sich auch in den niedrigen Temperaturfaktoren widerspiegelt. Lediglich die Schleife (G997-E1000) zwischen $\alpha 3A$ und $\alpha 3B$, die in keine weiteren Interaktionen mit dem Protein involviert ist, weist erhöhte Temperaturfaktoren auf. Die Oberfläche der β -Subdomäne unterscheidet sich von der übrigen Oberfläche der tAC AC-Domäne durch ihren Überschuß an sauren Resten und einem daraus

von 4 und 8 umschließen die beiden Helices 3A und 3B eine innere Kavität, deren Volumen gemäß einer Berechnung mit GRASP 95 Å³, beträgt (Nicholls, 1992). Diese Kavität ist von einer Wandung umschlossen, die weitestgehend von Hauptkettenatomen ausgebildet wird. Lediglich die Seitenketten von R110 von 8 und Q970, lokalisiert auf 3, weisen direkt in das Innere der Kavität.

Während der Verfeinerung der 1.46 Å Struktur von GRESAG4.1 wurde in der Kavität das Auftreten positiver $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Differenzelektronendichte beobachtet, die eindeutig einem D-DTT Molekül zugeordnet werden konnte (Abb. 15).

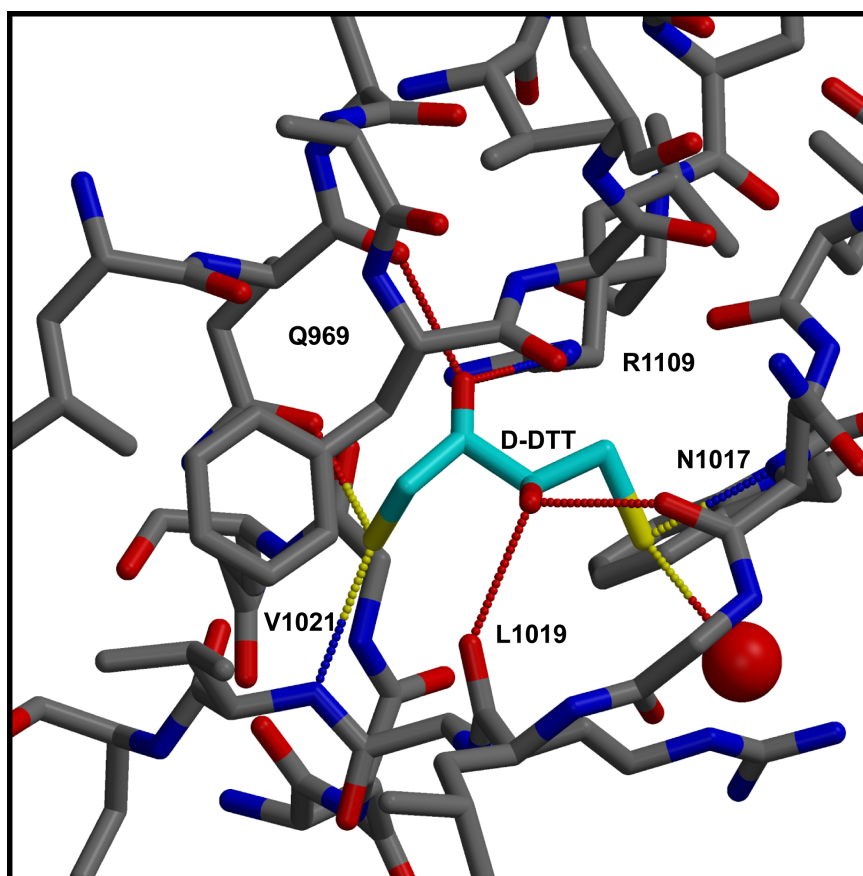


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Bindung des D-DTT Moleküls an GRESAG4.1 unterhalb der -Subdomäne. Jede Hydroxyl-, bzw. Sulfhydrylgruppe ist zweifach koordiniert, was auf eine feste Bindung des Moleküls in der von der sonstigen Proteinoberfläche Oberfläche abgeschlossenen Kavität schliessen läßt.

Das D-DTT Molekül war über eine Reihe von stereospezifischen Interaktionen in der Kavität gebunden, wobei die meisten Wechselwirkungen zwischen den Sulfhydryl und Hydroxyl

O1 2.6 Å, OE1-S1 2.7 Å), N1017 (O-O2 2.6 Å und N-S2 2.8 Å), L1019 (O-O2 2.7 Å), V1021 (N-S1 2.8 Å). Lediglich zwei Proteinseitenketten waren in Wasserstoffbrückenbindungen mit dem D-DTT Molekül involviert: (O1 - R1109 NH2 2.9 Å, S1- Q969 OE1 2.7 Å). Zudem interagierte das D-DTT Molekül über O2 (2.3 Å) und S2 (2.7 Å) mit zwei Wassermolekülen. In allen tAC Strukturen war die Kavität vollständig umschlossen, so daß kein Zugang zum Solvens existierte. In der Struktur von GRESAG4.3 wurden anstelle des D-DTT Moleküls vier Wassermoleküle in der Kavität lokalisiert, die Wasserstoffbrücken zu den Resten R1109, Q969, V1021 und N1017 ausbildeten. Wie in anderen strukturell gut charakterisierten Kohlenhydratbindungstaschen (Quioco, 1993) besetzen diese Wassermoleküle in der D-DTT freien Struktur nahezu die identischen Positionen wie die Hydroxyl- und Sulfhydrylgruppen des D-DTT Moleküls im GRESAG4.1/D-DTT Komplex. Untersuchungen des Einflusses von DTT auf die katalytische Aktivität der AC-Domänen der tACs wiesen lediglich auf eine deutlich verminderte Stabilität und Aktivität von in Abwesenheit von DL-DTT renaturiertem Protein hin. Desweiteren zeigte so gewonnenes Protein eine deutlich erhöhte Aggregationstendenz und konnte unter identischen Kristallisationsbedingungen nicht mehr zur Kristallisation gebracht werden. Untersuchungen strukturverwandter Verbindungen, wie z.B. Threitol, Erythritol, Threose und Erythrose und Verbindungen die aufgrund der Stoffwechselphysiologie des Organismus als putative Aktivatoren in Betracht gezogen wurden, wiesen allesamt keinen nennenswerten Einfluß auf die tAC Aktivität auf. Somit ergab sich letztendlich keine klare Aussage über die physiologische Bedeutung der hochkoordinierten D-DTT Bindung in der abgeschlossenen Kavität unterhalb der -Subdomäne.

4.1.4 Aktivitätsstudien an Mutanten der katalytischen Oberfläche von GRESAG4.1

Ein Proteinsequenzvergleich der tAC AC-Domänen mit den C1- und C2-Domänen der Klasse I Adenylatzyklasten aus Säugern weist auf die Gegenwart hochkonservierter Reste in den AC-Domänen hin. Um zu überprüfen, ob diese Reste von vergleichbarer funktioneller

Bedeutung wie in den Klasse I ACs sind, wurden entsprechende Mutanten der AC-Domäne von GRESAG4.1-(A884-Y1241) erzeugt. Dazu wurden acht konservierte Reste wegen ihrer Rolle in Katalyse und Substratbindung ausgewählt, gegen Alanin punktmuiert und die katalytischen Eigenschaften der Punktmuianten untersucht (Abb. 16).

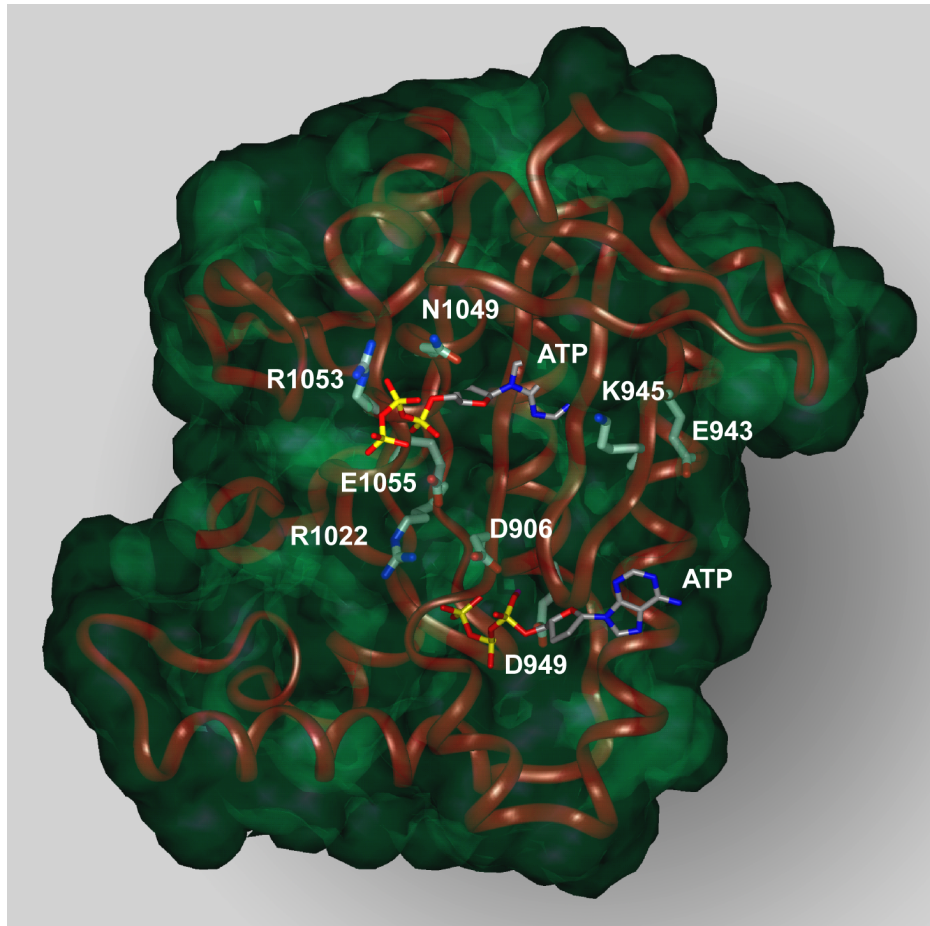


Abbildung 16: Die Aufsicht auf die katalytische Oberfläche von GRESAG4.1 zeigt die Lokalisation der konservierten, für die Katalyse und ATP-Bindung essentiellen Seitenketten, die jeweils gegen Alanin punktmuiert wurden.

Wie in Tab. 9 gezeigt, führten die Mutationen von den Resten D906 und D949, die an der Metallbindung beteiligt sind, oder von R1053, dessen Homolog in der C2-Domäne von Klasse I ACs den pentavalenten Übergangszustand am γ -Phosphat stabilisiert, zu einer signifikanten Abnahme der katalytischen Aktivität. Andererseits führte die Mutation des konservierten Restes R1022, der an der γ -Phosphatbindung beteiligt ist, zu keiner wesentlichen Aktivitätsänderung. Der K_M^{ATP} -Wert dieser Mutante war mit 45 μM dreimal so hoch wie der des Wildtypes und auch der konservative K_M -Wert war mit 1,2 $\mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}$ lediglich halbiert, womit sich deutlich

zeigte, daß R1022 einen nur geringfügigen Beitrag zur Substratbindung und Reaktionsgeschwindigkeit hat. Insgesamt zeigte der Vergleich der Aktivitätsprofile der GRESAG4.1 Mutanten mit denen der VC₁ und IIC₂ Domänen (Tesmer et al., 1997) eine eindeutige Korrelation und unterstützt somit die Annahme, daß die Konservierung der essentiellen Reste auf eine mechanistische Verwandtschaft der beiden AC Klassen zurückzuführen ist.

Mutation GRESAG4.1	spezifische Aktivität (% Wildtyp)	Korrelation mit den Säuger ACs (Tesmer et al., 1997)	Kontext in den Klasse I ACs (VC ₁ oder IIC ₂) (Tesmer et al., 1997)	V _{max}
D906A	0.005	Mg ²⁺ -Bindung	D396 VC ₁	-
E943A	0.08	Salzbrücke mit R934	K936 VC ₁ (Salzbrücke mit D923; C1-C2 Interface)	Wildtyp-10fach verringert (Tang <i>et al.</i> , 1995)
D949A	0.008	Mg ²⁺ -Bindung	D440 VC ₁	< 10fach verringert- inaktiv (Tang et al., 1995)
E1055A	54	Salzbrücke mit R1023	E518 VC ₁ (Salzbrücke mit R484)	Wildtyp (Dessauer <i>et al.</i> , 1997; Tang et al., 1995)
K945A	0.1	Dimerinterface	K436 VC ₁ (C1/C2 Interface)	Wildtyp (Tang et al., 1995)
R1022A	60	-Phosphat Bindung	R484 VC ₁	Wildtyp-10fach verringert (Tang et al., 1995)
N1049A	0.03	Wasserkoordination in der Struktur des katalytischen Zentrums	N1025 IIC ₂	< 10fach verringert- inaktiv (Yan <i>et al.</i> , 1997)
R1053A	0.1	Stabilisation des Übergangszustandes; Bindung von P am Pyrophosphat	R1029 IIC ₂	< 10fach verringert- inaktiv (Tang et al., 1995; Yan et al., 1997)

Tabelle 8: Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Punktmutanten der katalytischen Oberfläche von GRESAG4.1 mit den korrespondierenden Punktmutanten der VC₁ und IIC₂AC-Domänen aus Säugern. Die Messungen wurden abhängig von der spezifischen Aktivität der Punktmutante mit einer Proteinkonzentration von 5.0 nM – 1.0 µM, bei 25 °C und pH 8.0 in einer Duplikatbestimmung durchgeführt.

4.1.5 Der monomere Assoziationszustand der tACs

Aufgrund der C1-C2 Struktur der Klasse I ACs und biochemischen Untersuchungen an membrangebundenen Guanylatzyklasen (pGCs) und löslichen Guanylatzyklasen (sGCs) (Garbers, 1989; Harteneck *et al.*, 1990; Whisnant et al., 1996) wird allgemein gefolgert, daß alle Nukleotidzyklasen katalytisch aktive Homo- bzw. Heterodimere ausbilden. Da die tAC AC-Domänen in allen Kristallformen jedoch in einer monomeren Form vorliegen, wurde ihr

4.1.5.1 Analytische Gelfiltration

In analytischen Gelfiltrationsexperimenten wurde der Assoziationszustand der AC-Domänen von GRESAG4.1 und GRESAG4.3 bei steigenden Ionenstärken im Elutionspuffer untersucht. Wie aus Abb. 17 ersichtlich, eluierten die tAC-AC-Domänen bei geringen Ionenstärken mit einem R_f -Wert, der mit dem Molekulargewicht eines tAC Homodimers korrelierte (57 kDa).

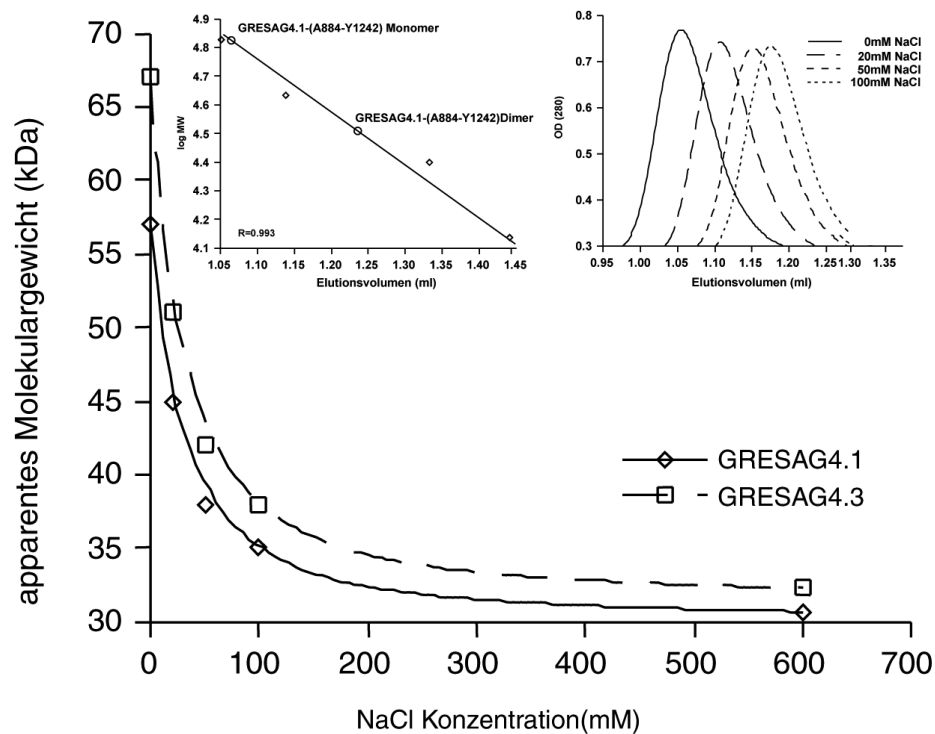


Abbildung 17: Analytische Gelfiltration der beiden AC-Domänen von GRESAG4.1 und GRESAG4.3. Aus dem Diagramm ist deutlich die Verschiebung des apparenten Molekulargewichtes von einer dimeren zu einer monomeren Assoziationsform mit steigender Salzkonzentration abzulesen. Die obere linke Abbildung zeigt die Eichgerade der Gelfiltrationssäule S75 3/20 mit den Eichproteinen Bovine Serum Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuclease A (13.7 kDa). Die Elutionsvolumina der monomeren und der dimeren Spezies von GRESAG4.1 sind markiert. Die obere rechte Abbildung zeigt die Elutionskurven, wie sie bei den verschiedenen Salzkonzentrationen erhalten wurden.

Bereits ein geringfügiger Anstieg der Ionenstärke führte jedoch zu einer starken Verschiebung des R_f -Wertes zu einem apparenten Molekulargewicht, das zwischen dem einer dimeren bzw. monomeren Spezies lag. In Gegenwart von 600 mM NaCl im Elutionspuffer korrelierte der R_f -

(30 kDa). Die kontinuierliche Verschiebung der Elutionsprofile mit steigender Ionenstärke wies auf die Existenz eines dynamischen Gleichgewichts zwischen monomerer und dimerer Spezies hin. Dabei erfolgte die Assoziation und Dissoziation der Proteine so schnell, daß das Verhältnis der monomeren zur dimeren Spezies zeitlich konstant war und die beobachteten apparenten Molekulargewichte den relativen Anteilen beider Spezies im Elutionspeak entsprachen. Ein qualitativ ähnliches Verhalten wurde bei Gelfiltrationsexperimenten mit C1- und C2-Domänen beobachtet (Yan et al., 1996), jedoch waren hier weitaus höhere Salzkonzentrationen nötig, um eine deutliche Verschiebung des R_f -Wertes zu erzielen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Dimerisierung von tACs weitaus stärker von polaren Interaktionen abhängt.

4.1.5.2 Identifikation des Assoziationszustandes der katalytisch aktiven Form der tAC-AC-Domänen anhand von Komplementationstudien mit Punktmutanten von GRESAG4.1

Nachdem die Existenz eines Gleichgewichtes zwischen monomerer und dimerer Spezies der tAC AC-Domänen in Lösung gezeigt war, blieb die Frage zu beantworten, ob der monomere oder der homodimere Assoziationsmodus der katalytisch aktiven Form der tACs entsprach. Dazu machte man sich die in einem Homodimer gegenwärtige zweizählige Symmetrie zunutze, die die Ausbildung zweier äquivalenter katalytischer Zentren bedingt (Abb. 18a). Die Zugabe katalytisch inaktiver Mutanten zu intaktem tAC AC-Domänen sollte die Aktivität einer dimeren Spezies durch die selektive Inaktivierung eines oder beider katalytischer Zentren beeinträchtigen, während eine katalytisch aktive monomere Form keine Beeinträchtigung durch die Gegenwart des Mutanten Proteins erfahren sollte. Titration einer 2.0 bzw. 4.0 nM GRESAG4.1-(A884-T1131) Lösung mit der Mutante D949A bzw. der Doppelmutante D949A/R1053A führte zu einer Abnahme der spezifischen Aktivität bis auf 40 % bzw. 10 % der Basalaktivität bei Zugabe der Mutanten im Überschuß (Abb. 18c,d) was konsistent mit dem Verlust eines bzw. beider katalytischen Zentren in einem wildtyp-mutante-Heterodimer ist.

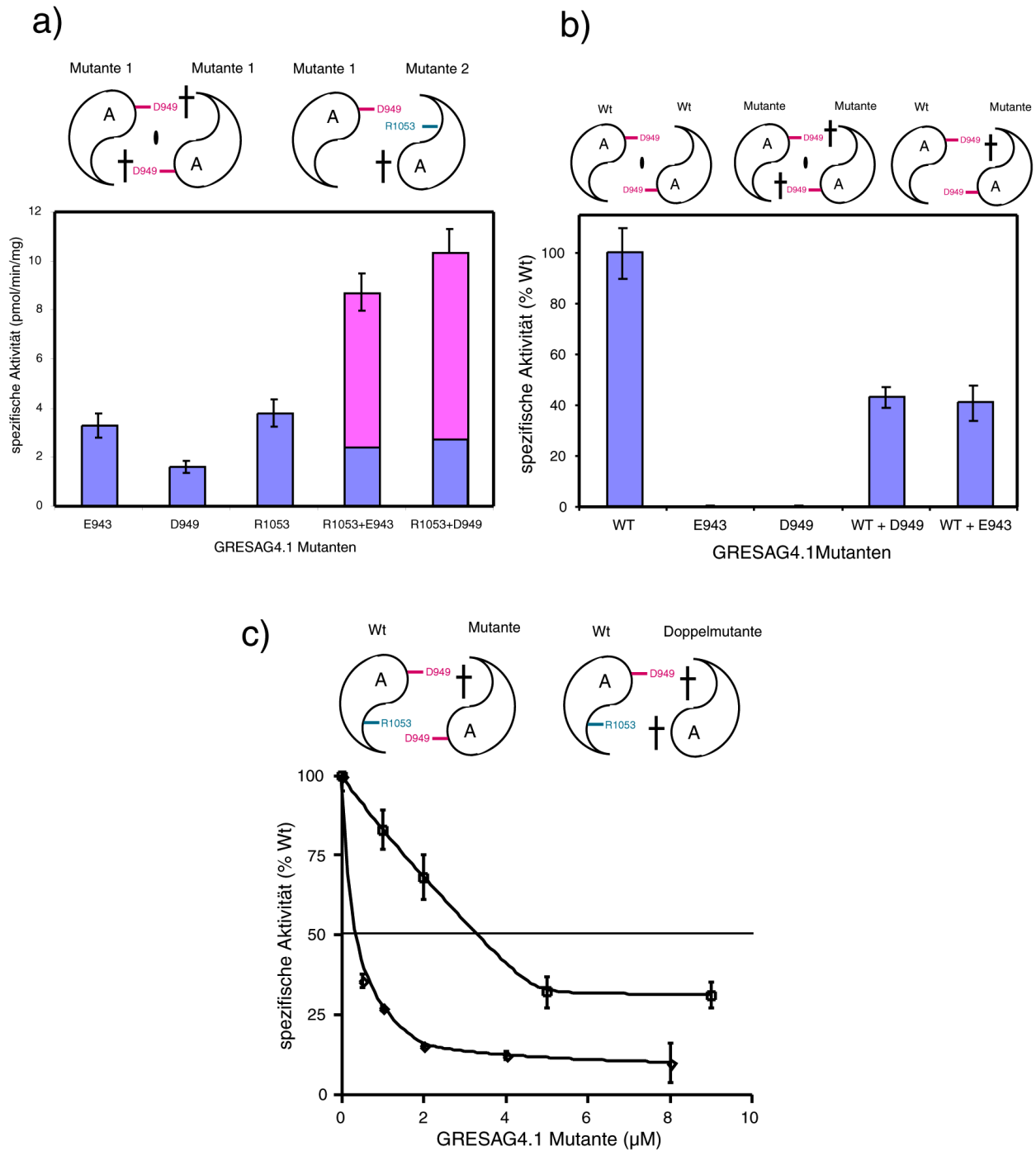


Abbildung 18: a) Das Balkendiagramm zeigt wie in Rekonstitutionsexperimenten durch Mischung inaktiver Mutanten, deren Punktmutation auf der komplementären aktiven Oberflächen angeordnet ist, eine Zunahme der spezifischen Aktivität zu beobachten war (rosa unterlegte Balken). Das Modell veranschaulicht die Ausbildung eines Heterodimers mit einem inaktiven katalytischen Zentrum (†) und einem katalytisch aktiven, daß für eine Zunahme der Aktivität bis um den Faktor vier verantwortlich ist.

b) Inhibition von Wildtypprotein durch Zugabe von katalytisch inaktiven Punktmutanten im Überschuß.

c) Titration einer konstanten Menge Wildtypproteins von GRESAG4.1 (2 bzw. 4 nM) mit Einzel- bzw. Doppelmutanten. Das Modell zeigt wie die Ausbildung katalytisch inaktiver Heterodimere mit der Einzelmutante D949A bzw. der Doppelmutante D949A/R1053A zu einer Inaktivierung eines/beider katalytischer Zentren führt. Die Messungen wurden entsprechend der Aktivität der Mutanten bzw. des Wildtyps mit Proteinkonzentration von 2.0 nM-0.5 µM, bei 25 °C und pH 8.0

Weiterhin sollte bei Existenz einer katalytischen dimeren tAC-AC Spezies in Mischungen komplementärer Punktmutanten eine Wiederherstellung eines katalytischen Zentrums in aus zwei Mutanten bestehenden Heterodimeren beobachtet werden. Entsprechend konnte bei Mischung äquimolarer Mengen der Punktmutanten D949A bzw. E943A mit R1053A ein Anstieg der katalytischen Aktivität um den Faktor vier verglichen mit den Basalaktivitäten der Einzelmутanten beobachtet werden (Abb. 18b).

Diese Ergebnisse erbrachten somit den Nachweis, daß trypanosomale Klasse II ACs katalytisch aktive Homodimere ausbilden. Ihr Assoziationsverhalten deutet jedoch auf eine ausgeprägte Koexistenz monomerer und dimerer Spezies in freier Lösung, wie die Analyse der Kristallkontakte und die analytischen Gelfiltrationsexperimente zeigten.

4.2 Die trypanosomale PDE 1

4.2.1 Rekombinante Produktion der trypanosomalen PDE1 sowie der N-terminalen Verkürzungen PDE1-(R189-T620) und PDE1-(K321-T620)

Eine Proteinsequenzanalyse der PDE1 aus *T. brucei* zeigte, daß diese Phosphodiesterase aus drei Domänen besteht (Abb. 19).

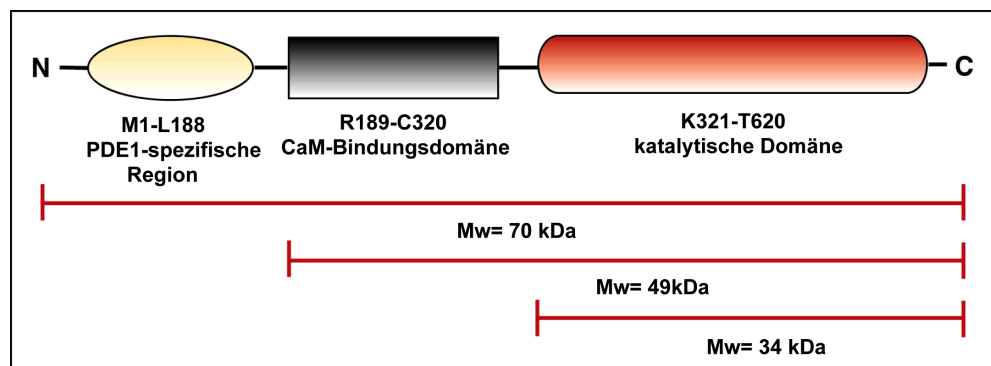


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Domänenanordnung der PDE1 aus *T. brucei*, wie sie anhand von Sequenzvergleichen mit anderen CaM-abhängigen Phosphodiesterasen ermittelt wurde.

Die N-terminale 188 Reste große Region weist keine Homologie zu bekannten PDEs oder anderen Proteinen auf. Ihr schließt sich eine aus 120 Resten bestehende CaM-Bindungsdomäne

aufweist. Die letzten 299 Reste bilden die C-terminale, katalytische Domäne von PDE1 aus. Aufgrund dieser Architektur wurden neben dem intakten Gen zwei Genfragmente, die für N-terminal verkürzte Proteine kodierten, kloniert. Das für die trypanosomale PDE1 (Reste M1-T620) kodierende Gen (1.86 kBp) wurde aus genomischer DNA des *T. brucei* Stammes 927 amplifiziert und unter Verwendung der Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den *E. coli* Expressionsvektor pET28a (Novagen) kloniert. Das erhaltene Plasmid pET-PDE1-(M1-T620) diente als Vorlage für die Amplifikation zweier Genfragmente, die für die N-terminalen Verkürzungen PDE1-(R189-T620) und PDE1-(K321-T620) kodierten, und ebenfalls in pET28a einkloniert wurden. Die Gensequenz aller drei Konstrukte wurde mittels Sequenzierung nach der Dideoxy-Methode überprüft. Die Plasmidkonstrukte pET-PDE1-(M1-T620), pET-PDE1-(R189-T620) und pET-PDE1-(K321 T620) wurden in *E. coli* BL21(DE3) Zellen transformiert. Die Proteine PDE1-(M1-T620) und PDE1-(R189-T620) konnten nach 4 h Induktion mit 0.5 mM IPTG und Expression bei 24 °C in guten Ausbeuten löslich erhalten werden. Die N-terminale Verkürzung PDE1-(K321-T620) war zu keinem Zeitpunkt in löslicher Form zugänglich, konnte jedoch in Form von *inclusion bodies* produziert werden, deren Renaturierung mittels Dialyse allerdings mißlang. PDE1-(M1-T620) und PDE1-(R189-T620) wurden über einen IMAC-Aufreinigungsschritt auf einer 5 ml Ni²⁺-NTA Säule (Qiagen) und einem linearen Imidazolgradienten (0-250 mM Imidazol in 1xPBS Puffer) mit einer Reinheit > 95 % und Ausbeuten von 5-8 mg/L Kultur erhalten. Die aufgereinigten Phosphodiesterasen zeigten eine deutliche Tendenz zur Aggregation, die bei PDE1-(M1-T620) besonders ausgeprägt war. Die Aggregationsneigung beider Proteine konnte auf die Anwesenheit der N-terminalen His₆-Fusion zurückgeführt werden, da nach Thrombinverdau zur Abspaltung des Histidinhexamers und anschließender Aufreinigung über eine Ni²⁺-NTA Säule die Löslichkeit deutlich verbessert werden konnte. Die N-terminale Sequenzierung von PDE1-(M1-T620) zeigte jedoch, daß die Thrombinspaltung zu einem über die ersten 30 Aminosäurereste heterogenen Spaltprodukt

von PDE1-(R189-T620) erhaltene Spaltprodukt wurde dagegen homogen an der vorgesehenen Thrombinschnittstelle gespalten und zeigte katalytische Aktivität (Abb. 20).

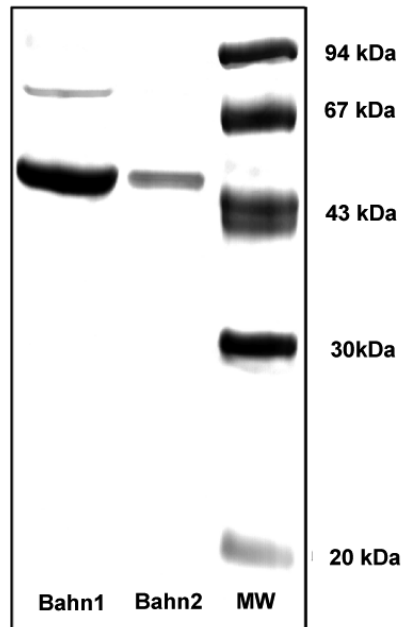


Abbildung 20: 15%iges SDS-PAGE von PDE1-(R189-T620) nach einem IMAC-Aufreinigungsschritt (Bahn 1) und anschließendem Thrombinverdau bzw. weiterer IMAC-Aufreinigung des Spaltproduktes (Bahn 2).

4.2.2 Biochemische Charakterisierung der PDE1-(R189-T620)

4.2.2.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität und des K_M^{cAMP} -Wertes

Die spezifische Aktivität der aufgereinigten PDE1-(R189-T620) betrug 1.0 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$. Nach reziproker Auftragung der linearen Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen in einem Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 21), wurde der K_M^{cAMP} -Wert zu 142 μM und eine apparente Maximalgeschwindigkeit V_{max} von 51 $\text{nmol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ ermittelt.

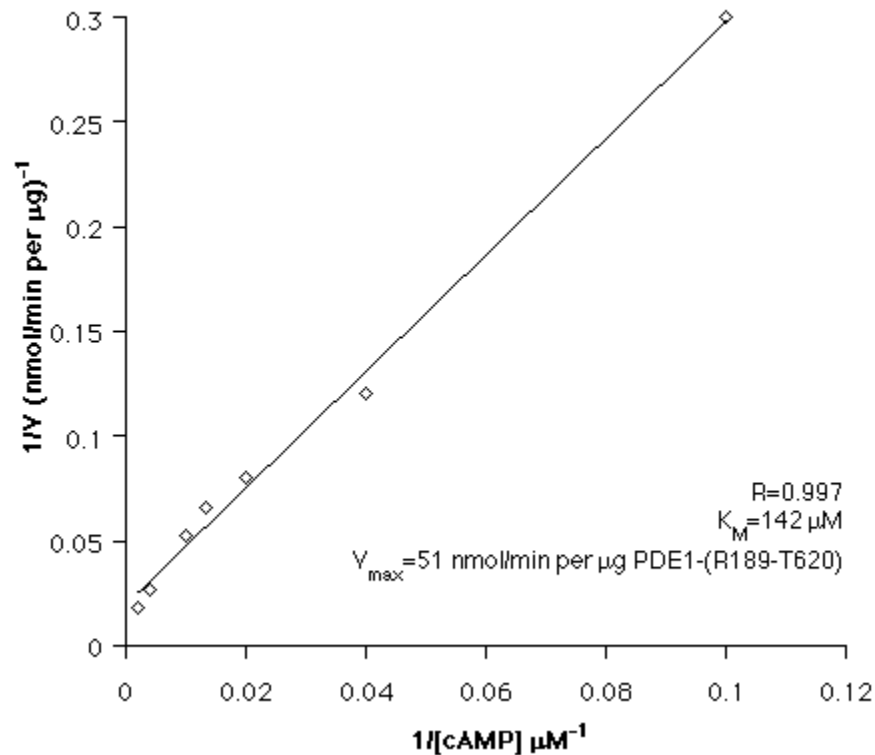


Abbildung 21: Lineweaver-Burk Diagramm für die Ermittlung des $K_M(\text{cAMP})$ -Wertes für cAMP von PDE1-(R189-T620)

Der K_M^{cAMP} -Wertes der PDE1 aus *T. brucei* liegt um den Faktor 100-1000 höher als der üblicherweise für cAMP-spezifische PDEs beobachtete K_M^{cAMP} -Werte. Somit scheint die PDE1 eine sehr geringe Affinität zu ihrem Substrat cAMP zu besitzen, was darauf schließen läßt, daß sie erst bei sehr hohen cAMP-Konzentrationen volle Aktivität zeigt.

4.2.2.2 Bestimmung der Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von den zweiwertigen Ionen Magnesium und Mangan

Wie bereits für andere PDEs gezeigt, hängt auch die trypanosomale PDE1-(R189-T620) in ihrer spezifischen Aktivität von den divalenten Kationen Magnesium und Mangan ab (Abb. 22). Wie typischerweise für PDEs beobachtet, so ist auch die spezifische Aktivität der PDE1-(R189-T620) in Gegenwart von Mangan höher als von Magnesium. In Gegenwart von Mangan wird die maximale spezifische Aktivität bei einer Konzentration von 25 mM erreicht, während in Gegenwart von Magnesium die Maximalaktivität erst bei wesentlich höheren Konzentration

Mg^{2+} 14 ± 6.0 mM.

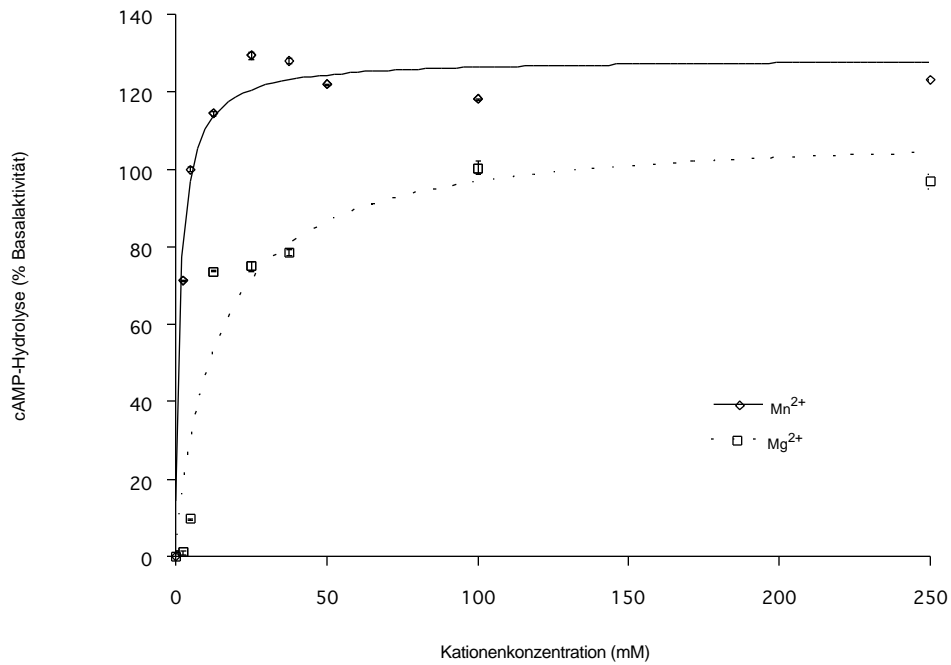


Abbildung 22: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von PDE1-(R189-T620) von den divalenten Kationen Magnesium (gepunktete Kurve) bzw. Mangan (durchgezogene Kurve).

4.2.2.3 Bestimmung der IC_{50} -Werte diverser Phosphodiesterase Inhibitoren

Es wurde ein Inhibitionsprofil von PDE1 mit den drei Phosphodiesteraseinhibitoren IBMX, Rolipram und Ethazolot erstellt. Während in Gegenwart von IBMX und Rolipram bis zu 500 μM keine Inhibition beobachtet wurde, inhibierte Ethazolot das Protein mit einem IC_{50} -Wert von 260 μM (Abb. 23).

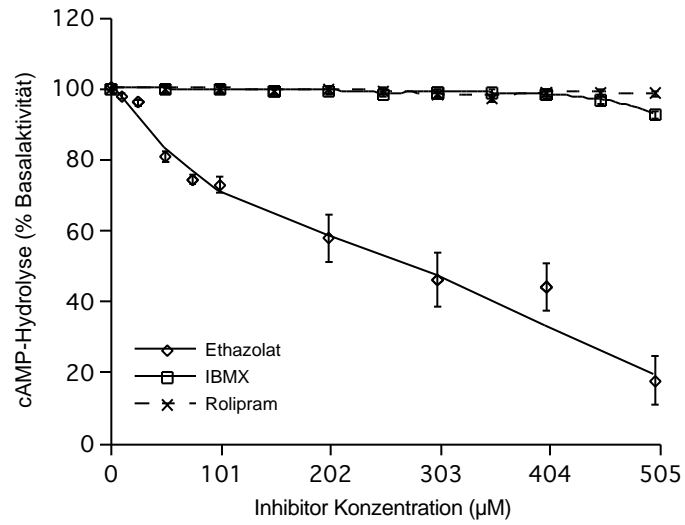


Abbildung 23: Inhibition der spezifischen Aktivität von PDE1-(R189-T620) durch die Phosphodiesteraseinhibitoren Rolipram (durchgezogene Linie), IBMX (gestrichelte Linie) und Ethazolat (gepunktete Linie). Lediglich Ethazolat übt einen nennenswerten inhibitorischen Effekt auf das Protein aus.

5. Diskussion

5.1 Gegenwärtiger Stand der Struktur- Funktionsuntersuchungen von ACs

ACs werden bereits seit mehr als vierzig Jahren untersucht, grundlegende und detaillierte molekulare Informationen über diese Enzyme sind aber erst seit der Gewinnung der cDNA von Vertretern dieser Enzymfamilie zugänglich (Krupinski *et al.*, 1989). Da es sich bei ACs nahezu ausschließlich um integrale Membranproteine handelt, sind Studien an nativen Proteinen äußerst schwierig, da die für die Solubilisierung notwendigen Detergenzien mit der strukturellen Integrität und Funktionalität dieser Enzyme interferieren (Tang & Gilman, 1992). Desweiteren ist die Isolierung größerer Mengen aus natürlichen Geweben bzw. Zellkulturen aufgrund ihres geringen Vorkommens problematisch (ca 0.001–0.01 % der gesamten Membranproteinmasse, Sunahara *et al.*, 1996). Klasse I ACs sind, obwohl sie die komplizierteste Architektur aller Nukleotidzyklase-Klassen aufweisen, die biochemisch und strukturell am besten charakterisierten ACs (Ishikawa & Homcy, 1997). Die Erforschung dieser Enzymfamilie erfuhr einen wesentlichen Aufschwung mit der Konstruktion von löslichen, katalytisch aktiven Fragmenten, die rekombinant darstellbar waren und denen ein Großteil der regulatorischen Eigenschaften des Holoenzym innewohnte (Tang & Gilman, 1995). Während von der katalytischen Einheit der Klasse I ACs mittlerweile Strukturinformationen vorliegen, ist die Erforschung anderer AC-Klassen sowie der Guanylatzyklasen weit weniger fortgeschritten. Hierfür sind vor allem die schwierigen Löslichkeits- und Struktureigenschaften der Proteine verantwortlich (Chinkers & Garbers, 1989; Garbers, 1989; Lowe, 1992), die einen Umgang mit den nativen Enzymen erheblich erschweren. Neue interessante Erkenntnisse auf dem Forschungsgebiet der Nukleotidzyklasen verspricht jedoch die Erforschung der jüngst in Spermatozoen aus Säugern bzw. in Insektenzelllinien entdeckten löslichen ACs, die in nativer Form wesentlich leichter zu handhaben sein sollten (Buck *et al.*, 1999; Kawabe *et al.*, 1996).

5.2 Rekombinante trypanosomale ACs: enzymologische Charakterisierung und Domänenkartierung

Bei Untersuchungen der Klasse II ACs des Protozoen *T. brucei* treten neben den in Kap. 5.1 geschilderten Problemen zusätzliche Komplikationen auf wegen der Existenz einer in mehreren Kopien im Genom des Parasiten existierenden AC-Multigenfamilie, deren Expressionsmuster z.T. stadiumsspezifisch ist (Alexandre et al., 1996; Paindavoine et al., 1992; Rolin et al., 1990). Diese Tatsache erschwert zum einen den Zugang zu spezifischen Isozymen über homologe Überexpression, zum anderen wird eine gezielte Deletion AC-kodierender Gene und eine anschließende phänotypische Charakterisierung nahezu unmöglich gemacht. Enzymologische Daten der nativen tACs stammten bisher aus Untersuchungen an Membranrohfraktionen bzw. permeabilisierten Zellen, die ein zellstadiumsspezifisches Gemisch der koexprimierten Isozyme aufwiesen, oder von Untersuchungen an Membranrohfraktionen von tAC-überexprimierenden Hefezellen (Paindavoine et al., 1992; Rolin et al., 1990). Um die Problematik der Handhabung nativer, membrangebundener Klasse II ACs zu umgehen, wurde in dieser Arbeit ein bereits im Falle der Klasse I ACs erfolgreicher Ansatz (Dessauer & Gilman, 1996) für die rekombinante Darstellung löslicher Spezies dieser ACs gewählt, wobei die einfachere Topologie der tACs die Konstruktion katalytisch aktiver Proteine maßgeblich erleichterte (Abb. 24). Der Zugang zu rekombinanten, löslichen Formen der tACs ermöglichte somit erstmals eine isozymspezifische Quantifizierung enzymologischer Daten.

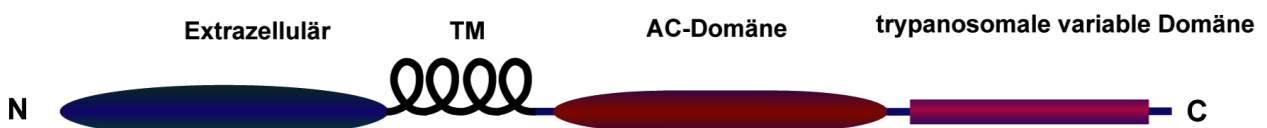


Abbildung 24: Domänenstruktur der trypanosomalen Klasse II Adenylatzyklen, wie sie anhand von Sequenzvergleichen mit anderen Klasse II Adenylatzyklen erstellt wurde. Aufgrund der topologischen Analogie zu den pGCs wird eine putative Rezeptorfunktion für die ca. 80 kDa große extrazelluläre Region vermutet (Alexandre et al., 1990), während die Funktion der trypanosomalen variablen Domäne unbekannt ist. Die genaue Domänengrenze der AC-Domäne und der trypanosomalen variablen konnten mittels der in Kap. 4.1.2.3 beschriebenen Domänenkartierung identifiziert werden.

Die biochemische Charakterisierung der löslichen Spezies von GRESAG4.1, GRESAG4.3 und

wobei der Vergleich mit entsprechenden Daten der nativen tACs sowie der Klasse I ACs darauf hinwies, daß die rekombinanten tAC-Fragmente physiologisch relevante Aktivitäten besaßen. Somit ist in Analogie zu den Klasse I ACs der Membrankontext keine Notwendigkeit für katalytische Aktivität, da alle für die Katalyse essentiellen Eigenschaften der Proteine im zytosolischen Bereich lokalisiert sind. Die Domänenstruktur der zytosolischen Region der tACs wurde z.T. aus Sequenzvergleichen mit anderen ACs abgeleitet, wobei die tAC-AC-Domänen ca 20 % Identität zu denen der anderen ACs aufwies, bzw. 83-87 % Identität zwischen den Isozymen gefunden wurde. Dagegen war in der trypanosomalen variablen Domäne, deren Funktion bisher unbekannt ist, die Sequenzidentität mit 54-78 % unter den tAC-Isozymen vergleichsweise gering. Mittels der in Kap. 4.1.2.3 am Beispiel von GRESAG4.1 durchgeführten Domänenkartierung konnten die Domänengrenzen der AC-Domäne sowie trypanosomalen variablen Domäne eindeutig identifiziert (Abb. 24) und der Einfluß der trypanosomalen variablen Domäne auf die katalytische Aktivität überprüft werden. Ein Vergleich der enzymologischen Daten der beide zytosolische Domänen umfassenden Spezies von GRESAG4.1 mit der isolierten AC-Domäne wies lediglich geringe Abweichungen auf, was verdeutlichte, daß die trypanosomale variable Domäne keinen Einfluß auf die Aktivität der tACs ausübte. Somit ist die AC-Domäne der tACs ebenso wie die synthetischen löslichen Fusionen der C1- und C2-Domänen aus Klasse I ACs (Dessauer & Gilman, 1996) die kleinste isolierbare, katalytisch voll funktionsfähige Einheit.

5.3 Strukturvergleich der tACs mit verwandten Proteinen

Vergleicht man die Struktur der tAC AC-Domäne mit denen der DNA-Polymerasen oder NDP-Kinasen, fällt die außergewöhnliche topologische Ähnlichkeit in der N-terminalen Region, also den α -Strängen 1-4 und den Helices 1-3, zu diesen Enzymen auf (Abb. 25). Trotz nicht signifikanter Sequenzkonservierung in dieser Region ist das diesen Proteinen gemeinsame

Strukturmerkmal, das auf konvergent, das Überlappungen der AC-Domäne mit den DNA

Polymerase von *T. aquaticus* mit einem rmsd von 1.9 Å für 73 C Atome bzw. mit der NDP-Kinase von *D. melanogaster* mit einem rmsd von 2.3 Å für 42 C Atome erfolgen. Das

Motiv wurde erstmals in den DNA-Polymerasen von *E. coli* und *T. aquaticus* gefunden und als ``Palm-Domäne`` bezeichnet (Artymiuk *et al.*, 1997; Beese *et al.*, 1993; Eom *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1995; Ollis *et al.*, 1985). In den DNA-Polymerasen sind alle Reste, die an der Ausbildung des katalytischen Zentrums und der Substratbindung beteiligt sind auf der Oberfläche der Palm-Domäne lokalisiert. NDP-Kinasen weisen ebenfalls das Strukturmotiv der Palm-Domäne auf, jedoch ist in diesen Enzymen das katalytische Zentrum nicht auf der Oberfläche der Palm-Domäne vorzufinden (Morera *et al.*, 1995). Sowohl bei den AC-Domänen der tACs als auch den übrigen Nukleotidzyklasen sind alle katalytischen Reste auf der Palm-Domäne lokalisiert, was auf eine allgemeine Verwandtschaft von Nukleotidzyklasen zu den DNA-Polymerasen hindeutet, die sich nicht aus der Primärstruktur, jedoch deutlich aus der Tertiärstruktur der Proteine ableiten läßt. Beide Enzymfamilien katalysieren die von divalenten Metallionen unterstützte nukleophile Substitutionsreaktion der 3'-Hydroxylfunktion von Ribose bzw. Desoxyribose am -Phosphatatom eines Nukleotidtriphosphats, was die Ausbildung eines ähnlich gearteten Übergangszustandes impliziert. Damit weisen die ACs zu den DNA-Polymerasen neben einer engen strukturellen Verwandtschaft auch eine mechanistische Verwandtschaft auf, ``Zwei Metallionen``-Katalyse (siehe Kap. 5.3) wurde in der PolI Familie bereits klar demonstriert (Park *et al.*, 1997), weshalb eine evolutionäre Verwandtschaft beider Enzymtypen postuliert wurde.

Obwohl Strukturlösungsversuche der tAC AC-Domänen mit den C1- bzw. C2-Domänen als Suchstrukturen für molekularen Ersatz erfolglos waren, weisen die tAC AC-Domänen eine enge strukturelle Verwandtschaft zu den AC-Domänen der Klasse I ACs auf (Abb. 26). Eine Überlagerung der AC-Domäne von GRESAG4.1 auf die C1 Domänen der AC V aus Hunden ergibt einen rmsd von 1.45 Å für 127 äquivalente C Positionen. Gleichmaßen lassen sich

äquivalente C Positionen überlagern. Infolgedessen sind die strukturellen Abweichungen zwischen GRESAG4.1 und der C1 und C2 Domäne von ähnlicher Größenordnung wie zwischen den beiden letzteren Domänen untereinander (rmsd von 1.3 Å für 153 C Positionen).

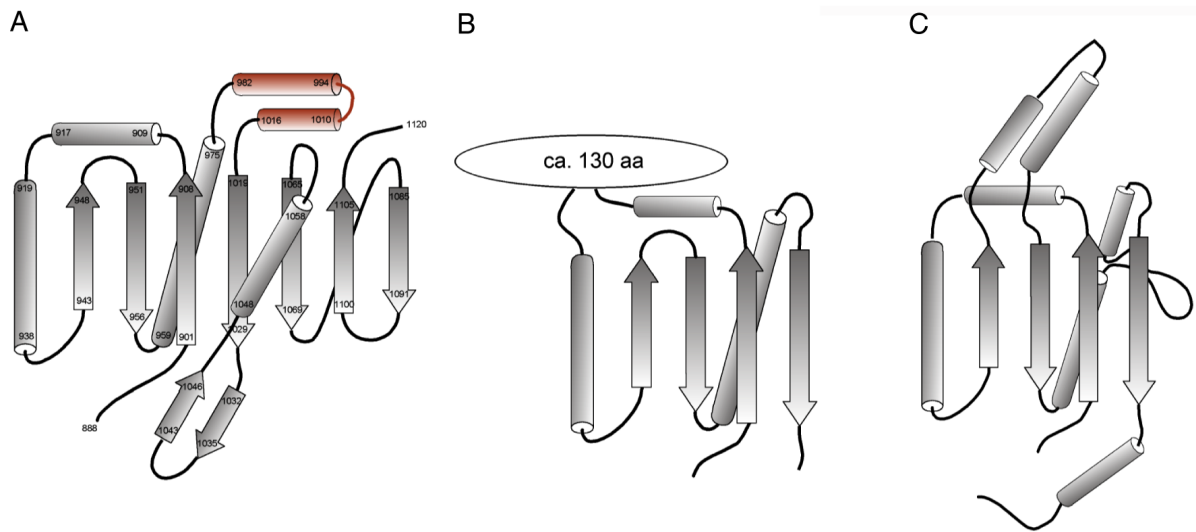


Abbildung 25: Bei dem Vergleich der Topologiediagramme von GRESAG4.1 (A), der *T. aquaticus* DNA-Polymerase (B) und der NDP-Kinase aus *D. melanogaster* (C) erkennt man das allen drei Enzymen gemeinsame Strukturmotiv, das in der ersten Hälfte der AC-Domäne der tACs von den Sekundärstrukturelementen 1-4 und 1-3 ausgebildet wird. Den drei Enzymfamilien ist gemeinsam, daß diese sogenannte "Palm"-Domäne die Region im Protein ist, auf der sich das katalytische Zentrum befindet.

Lediglich an zwei Stellen weisen die tAC AC-Domänen deutliche strukturelle Abweichungen zu den AC-Domänen der Klasse I ACs auf. Bei der einen handelt es sich um die in Kap. 4.1.3.9 beschriebene -Domäne, die zwischen 3 und 4 lokalisiert ist und lediglich bei den trypanosomalen Klasse II ACs zu finden ist. Die andere ist ein in allen tAC Strukturen existenter geordneter C-Terminus (GRESAG4.1:T1105-R1122, GRESAG4.3:A1093-A1106). In der Struktur von GRESAG4.1-(A884-T1131) ist dieser C-Terminus zusätzlich über die katalytische Oberfläche verlängert, wobei er an der Ausbildung verschiedener polarer Interaktionen mit einigen katalytischen Resten beteiligt ist. Die Bindung des C-terminalen Stranges entlang der aktiven Oberfläche beruhte jedoch offensichtlich auf der Art der Kristallpackung und nicht auf einer autoinhibitorischen Funktion, da eine verkürzte AC-Domäne (A884-D1117) ähnliche

Die Sekundärstrukturelemente mit dem höchsten Konservierungsgrad, 1- 4 und 2, sind alle auf der Vorderseite der Palm-Domäne lokalisiert, wo sie zur Ausbildung der katalytischen Oberfläche beitragen. Zwei weitere Sekundärstrukturelemente, 5 und 6, die in den AC-Strukturen der tACs und den Klasse I ACs an der Ausbildung einer konservierten γ -Haarnadelschleife beteiligt sind, weisen bei den tACs untereinander, jedoch nicht zu den C1- und C2-Domänen der Klasse I ACs eine hohe Sequenzkonservierung auf. Der Bereich von 7 bis zum C-Terminus ist auf der gegenüberliegenden Seite der katalytischen Oberfläche unterhalb des tAC-spezifischen γ -Subdomäne lokalisiert. Dieser Bereich, ebenso wie die Helices 2 und 3 auf der Rückseite der AC-Domäne, ist nicht in der Katalyse involviert und weist somit eine verringerte Sequenzkonservierung zu den entsprechenden Strukturelementen anderer AC-Domänen auf.

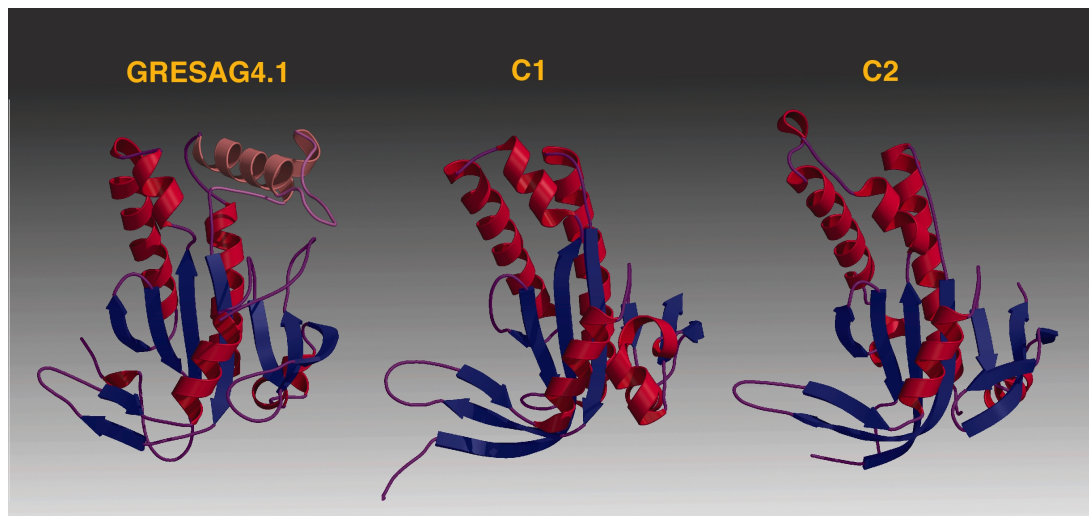


Abbildung 26: Strukturvergleich zwischen den AC-Domänen der trypanosomalen Klasse II AC GRESAG4.1 und den C1- und C2-Domänen der Klasse I ACs. Die drei Strukturen weisen eine auffällig hohe topologische Ähnlichkeit zueinander auf. Lediglich die γ -Subdomäne (farbig hervorgehobene Region) stellt einen deutlichen Unterschied zwischen den drei Strukturen dar.

Obwohl Klasse II ACs den membrangebundenen Guanylatzyklen topologisch näher verwandt sind als den Klasse I ACs, konnte anhand eines strukturbasierten Sequenzvergleiches und anschließender Kalkulation der phylogenetischen Verwandtschaft eine frühe Divergenz von Guanylatzyklen und Adenylatzyklen beobachtet werden, die mit einer weiteren

enge Verwandtschaft der parasitären Klasse II Adenylatzykylasen zu den bakteriellen Adenylatzykylasen z.B. von Mycobakterien oder *Stigmatella aurantiaca*. Diesen ACs ist voraussichtlich gemeinsam, daß sie nicht als Heterodimere sondern als Homodimere katalytisch aktiv sind. Die Topologie der Membranassoziation ist somit kein Indiz für eine evolutionäre Verwandtschaft verschiedener Nukleotidzyklasefamilien, denn gleichgeartete Membranassoziation kann auch bei phylogenetisch entfernten Adenylatzyklasefamilien, wie der AC aus *S. aurantiaca* und den Klasse I ACs aus Säugern beobachtet werden.

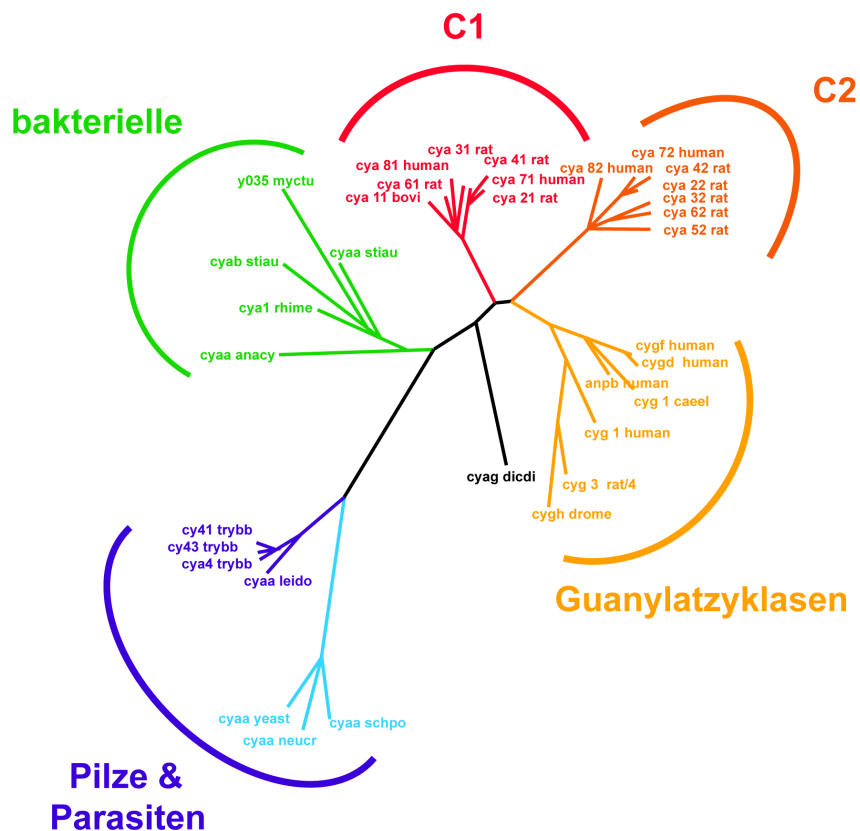


Abbildung 27: Der phylogenetische Stammbaum der Nukleotidzyklen, wie er anhand eines strukturbasierten Sequenzvergleiches (siehe Anhang, 7.4) mit dem Computerprogramm PHYLIP (Phylogeny Inference Package V 3.57 (J. Felsenstein, Juli 1995) berechnet wurde. Verwandte Nukleotidzyklen sind farbig unterlegt. Es wird deutlich, daß die GCs eine von den ACs deutlich abgetrennte Familie unter den Nukleotidzyklen bilden, und die tACs eine engere Verwandtschaft zu den ACs aus Pilzen bzw. Bakterien besitzen als zu den topologisch ähnlich organisierten pGCs.

5.4 Der monomere Zustand der tACs

Alle bisher untersuchten Nukleotidzyklaseklassen wie pGCs, sGCs und Klasse I ACs sind in Form von Homo- oder Heterodimeren aktiv (Garbers, 1989; Harteneck et al., 1990; Whisnant et al., 1996), weshalb die meisten Aktivatoren dieser Enzyme wie G_s oder GCAP über eine Stabilisierung des dimeren Zustandes wirken (Olshevskaya *et al.*, 1999; Sunahara et al., 1997). Der unphysiologische Aktivator Forskolin stimuliert Klasse I ACs ebenfalls durch die Ausbildung zusätzlicher Interaktionen im Interfacebereich der beiden AC-Domänen (Dessauer et al., 1997; Yan et al., 1996). Bisher untersuchte Nukleotidzyklasen lagen jedoch auch in Abwesenheit von Aktivatoren fast ausschließlich assoziiert vor, was auf eine ausgeprägte Stabilität des dimeren Zustandes schließen läßt (Buechler *et al.*, 1991; Garbers, 1989; Harteneck et al., 1990; Yan et al., 1996). Entsprechend lagen in den beiden Kristallstrukturen der in Gegenwart von Forskolin kristallisierten C2-Domäne (Zhang *et al.*, 1997b) und in dem chimären Komplex zwischen G_s , der C1-Domäne von ACV aus Hunden und der C2-Domäne von ACII aus Ratte (Tesmer et al., 1997) die AC-Domänen als Homo- bzw. Heterodimer vor. Im Gegensatz hierzu ordneten sich die tAC AC-Domänen in allen Kristallformen ausschließlich in einer monomeren Form an. Der Vergleich der verschiedenen Kristallpackungen zeigte keine Konservierung von Protein-Protein Kontakten (Abb. 28).

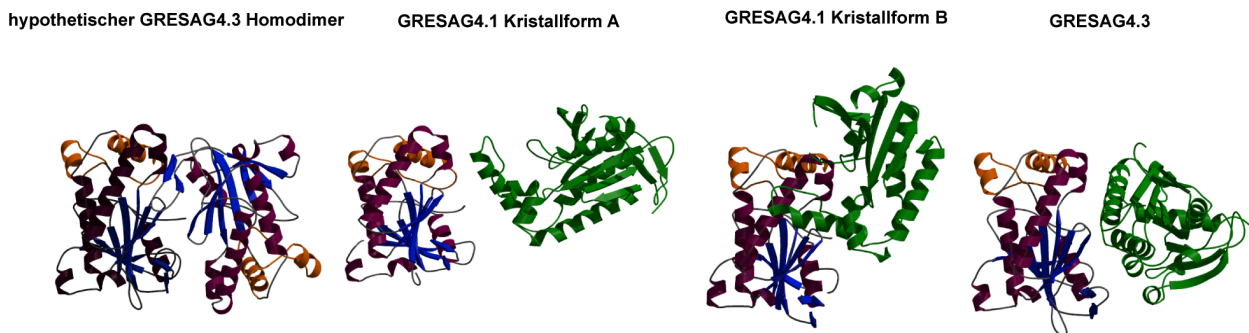


Abbildung 28: Vergleich der AC-Domänen Packung im Kristall mit einem hypothetischen tAC Homodimer, wie er durch Superposition zweier tAC AC-Domänen auf die C1-C2-Struktur dargestellt wird. In keinem der Kristalle entspricht die Orientierung auch nur annähernd der postulierten Assoziation im Homodimer, was darauf zurückzuführen ist, daß die Tendenz der tACs zur Homodimerausbildung erheblich geringer als bei den Klasse I

Dennoch konnte eindeutig mittels der in Kap. 4.1.5 beschriebenen biophysikalischen und biochemischen Untersuchungen die Existenz einer homodimeren tAC Spezies nachgewiesen werden, die in einem empfindlichen Gleichgewicht mit der monomeren Form stand. Desweiteren wurde das Homodimer, trotz seiner geringen Assoziationstendenz, eindeutig als die katalytisch aktive Spezies identifiziert. Somit präsentiert die Struktur der monomeren tAC AC-Domänen einen Blick auf die inaktive Form dieser Enzyme. Ein putativer tAC AC-Homodimer, wie er bereits aufgrund früherer Modellierungsstudien auf der Grundlage der Struktur des C2-Heterodimers postuliert wurde (Liu *et al.*, 1997) kann mittels Überlagerung zweier tAC AC-Domänen auf die Struktur des C1-C2-Heterodimers modelliert werden (Abb. 28,29).

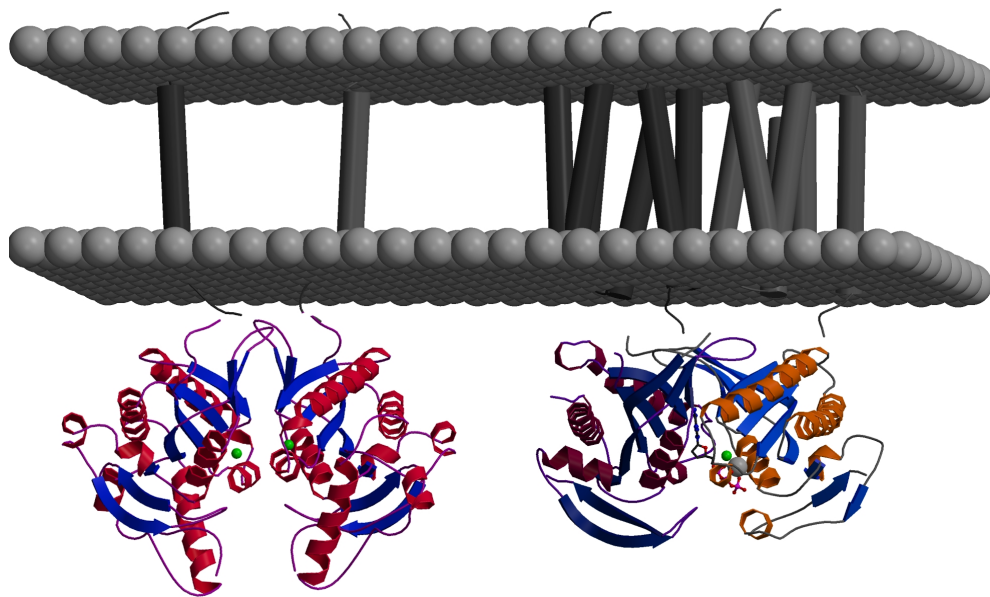


Abbildung 29: Modell der Klasse I ACs (rechts) und eines hypothetischen tAC Homodimers (links) im Membrankontext, wie er sich aufgrund der geringen, mit wenigen Resten zu überbrückenden Distanz zwischen AC-Domäne und Transmembranhelix leicht arrangieren läßt. Beide Strukturen lassen sich gleichartig ohne das Auftreten sterischer Interferenzen an die Membranoberfläche docken. Die zweizählige bzw. pseudozweizählige Symmetrieachse die bei der Dimerisierung entsteht, verlaufen in dieser Abbildung parallel zur Papierebene.

Der Modelldimer weist keine intermolekularen sterischen Interferenzen auf, was deutlich macht, daß eine Dimerisierung ohne größere konformationelle Änderungen erfolgen kann. Desweiteren läßt sich ohne Auftreten sterischer Interferenzen in der gleichen Orientierung wie das C1C2 Heterodimer ein tAC-Homodimer auf der Membranoberfläche positionieren (Abb. 29). Ungleich

aktive Zentren, bezogen durch eine zweifache Symmetrieachse, ausgebildet, während im pseudosymmetrischen Interface des C1C2-Heterodimers neben dem aktiven Zentrum nur eine katalytisch inaktive Kavität an äquivalenter Position vorliegt, die Forskolin binden kann. Dieser bedeutende strukturelle Unterschied zwischen den beiden Enzymklassen erklärt, warum tACs ebenso wie alle anderen Klasse II ACs (ACG) und pGCs keine Aktivierung durch Forskolin erfahren (Rolin *et al.*, 1996). Obwohl das tAC AC Modelldimer hohe strukturelle Homologien zu dem C1C2-Heterodimer aufweist, macht eine Analyse der intermolekularen Wechselwirkungen Diskrepanzen hinsichtlich der Dimerinteraktionen deutlich. Die meisten der im C1C2 Heterodimer existierenden 20 polaren Wechselwirkungen werden im tAC Homodimer aufgrund von Sequenzunterschieden nicht vorgefunden und können somit ein wesentlicher Grund für die geringere Assoziationstendenz der tACs sein (Tab. 9).

GRESAG4.1	C1-Domäne	C2-Domäne	GRESAG4.1
	H380	E901	
P897	K386	E907	
T912	T401	N916	A917
A927	N417	E917	
R934	D424	D923	R934
E944	R434	E935	Y943
K946	K436	L936	E944
T947	I437	K938	K946
L1030	R491	T939	T947
D1036	G498	G1011	
E1037	L499	A1012	
V1038	R500	Q1013	
T1039	K501	D1018	D1044
R1048	N509	R1029	R1094

Tabelle9: Die in der C1-C2-Struktur 20 vorgefundenen intermolekularen Wechselwirkungen im Vergleich gegenüber den drei polaren Wechselwirkungen die in einem putativen tAC Homodimer

In Klasse I ACs treten die meisten Interaktionen zwischen Seitenketten der Helix 2 und der von 5 und 6 ausgebildeten β -Haarnadelschleife auf. In den tACs ist eine gute Konservierung der relativen Orientierung dieser Sekundärstrukturelemente zu beobachten, trotzdem wurde keine Ausbildung konservierter oder alternativer intermolekularer Salzbrücken beobachtet. Die von 5 und 6 ausgebildete β -Haarnadelschleife, ist auf der ventralen Seite des C1C2-Heterodimers lokalisiert und liefert einen essentiellen Beitrag zur Stabilisierung der dimeren Struktur. Die Überlagerung der β -Haarnadelschleifen der C1- und C2-Domäne mit der von GRESAG4.1 (Reste D1031-T1045) läßt trotz einer geringen Sequenzkonservierung sowie Unterschieden bezüglich der Länge, die β -Haarnadelschleifen in den tACs ist um einen Rest verkürzt, strukturelle Ähnlichkeiten dieses Strukturelementes erkennen (Abb. 30a). In beiden tAC Strukturen weist die β -Haarnadelschleife eine hohe Ordnung auf, was auch die niedrigen B-Faktoren dieses Strukturelementes widerspiegeln. An den C- und N-terminalen Enden der β -Haarnadelschleife nehmen zwei hochkonservierte Glyzine (G1028 und G1045) für andere Aminosäuren unvorteilhafte Torsionswinkel ein (G1028: $\phi = -176^\circ / \psi = 170^\circ$, G1045: $\phi = 106^\circ / \psi = -163^\circ$), was ein orthogonales Abknicken der β -Haarnadelschleife von den benachbarten Sekundärstrukturelementen 4 und 4 bewirkt (Abb. 30b).

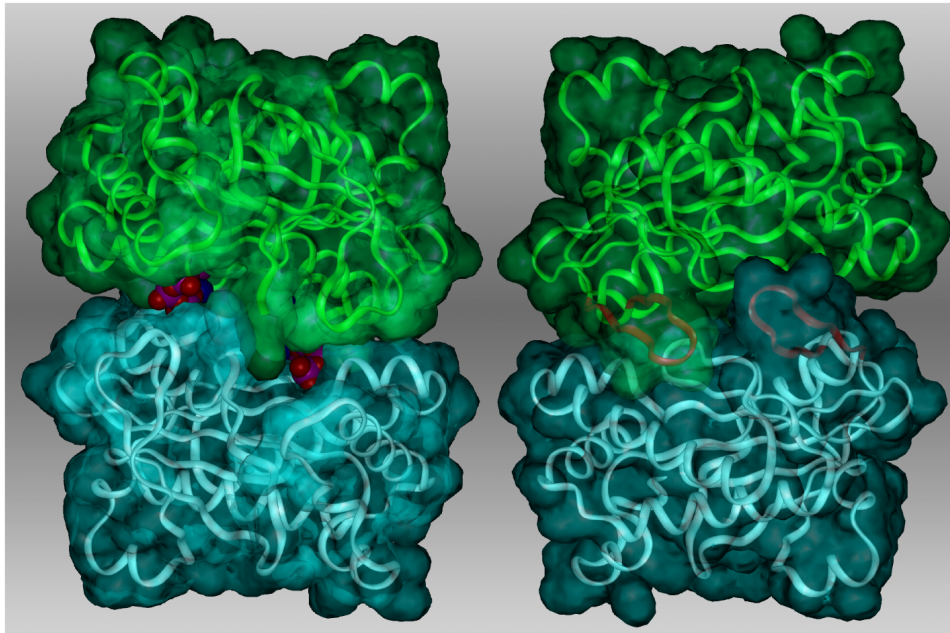
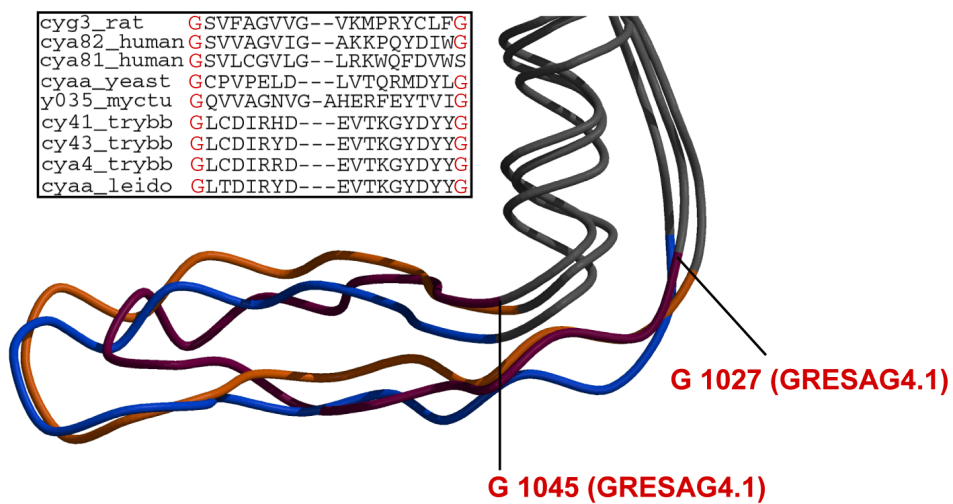
a**b**

Abbildung 30: a) In der Oberflächendarstellung des putativen tAC AC-Homodimers sind die beiden Monomere wie die beiden Hälften einer Muschelschale assoziiert. In der Vorderansicht (links) erkennt man deutlich die γ -Phosphate der beiden in die aktiven Zentren modellierten Substratmoleküle (CPK-Modell). Auf der Rückseite dagegen (rechts) versperren die beiden orthogonal abknickenden Armregionen (orange) jeglichen Zugang zum Interfacebereich.

b) Überlagerung der γ -Haarnadelschleife von GRESAG4.1 (rot) mit der C1-Domäne (gelb) und der C2-Domäne (blau) der Säuger ACs. Wie aus dem Sequenzalignment ersichtlich zeigen die Reste der γ -Haarnadelschleife nur eine geringe Sequenzkonservierung zwischen den einzelnen Nukleotidzyklaseklassen auf. Dennoch ist die strukturelle Homologie dieses Strukturelementes zwischen den tAC Klasse II ACs und der C1- und C2-Domäne deutlich erkennbar.

Diese Orientierung ermöglicht der α -Haarnadelschleife im C1C2-Heterodimer die Ausbildung einer Vielzahl intermolekularer Wechselwirkungen zur Stabilisierung des Heterodimers. Die Beobachtung, daß die α -Haarnadelschleife in monomeren AC-Domänen nahezu die gleiche Konformation annimmt wie im Dimer, weist darauf hin, daß lediglich geringe konformelle Änderungen bei der Ausbildung von tAC-Dimeren zu erwarten sind. Neben der hohen strukturellen Konservierung der α -Haarnadelschleife ist auf diesem Strukturelement der auch zwischen evolutionär entfernten ACs konservierte Rest D1042 auf $\alpha 5$ angesiedelt, der mit K945 auf $\alpha 2$ eine hochkonservierte Salzbrücke ausbildet (2.8 Å). In Klasse I ACs bildet das korrespondierende Lys/Glu Paar auf der C2 Domäne (K938, D1018) Wasserstoffbrücken zu den N1 und N6 Atomen des Adeninringes des gebundenen Substrats aus (Tesmer et al., 1997). Mutationen an diesen Positionen verringern die Substratspezifität der Klasse I Adenylatzyklasten (Beuve, 1999), obwohl nicht klar ist bis zu welchem Anteil die präzise Hauptketten-Konformation der α -Haarnadelschleife zur Substratspezifität beiträgt. Aufgrund der hier beschriebenen Abwesenheit dominanter Interaktionen in den tAC Homodimeren könnte erst die Wechselwirkung der Seitenketten der α -Haarnadelschleife mit der Base des Substrates zu einer transienten tAC Dimerisierung führen. Wenn das unter nicht physiologischen Bedingungen beobachtete Verhalten gleichermaßen auf die nativen tACs im Membrankontext übertragbar ist, wie dies bei den Klasse I ACs der Fall war, dann könnte die Aktivierung der tACs vielmehr über eine Induktion der Dimerisierung erfolgen als über eine Reorientierung zuvor assoziierter AC-Domänen. Im Vergleich hierzu deuteten jüngste strukturelle Studien der extrazellulären Rezeptorkomponente des *atrial natriuretic peptide* (ANP)-Rezeptors auf eine auch in Abwesenheit von Liganden existierende Dimerisierungsneigung der pGCs hin. Diese ist jedoch wesentlich weniger stark ausgeprägt als in Gegenwart von Liganden, die durch symmetrische Anbindung in der Interface-Region zweier Rezeptorkomponenten die Ausbildung katalytischer Homodimere unterstützen (Akker et al., 2000). Auch in biochemischen Studien konnte gezeigt

Liganden in einer oligomeren Form vorliegen, wobei die Oligomerisierung auf eine zytosolisch lokalisierte PKC-artige Domäne zurückgeführt wurde (Chinkers & Garbers, 1989; Wilson & Chinkers, 1995). Ebenso wie die membrangebundenen Guanylatzyklasen liegen auch bei den Klasse I ACs die C1 und C2 Domänen in einer intramolekular vorassoziierten Form im Membrankontext vor, so daß eine Aktivierung lediglich aus der Stabilisierung einer für die Katalyse geeigneten Orientierung resultiert. Dagegen könnte bei tACs die Bindung von Effektormolekülen entweder an die extrazellulären putativen Rezeptordomänen, ähnlich wie bei den membrangebundenen Guanylatzyklasen, oder an der zytosolischen Region die Dimerisierung und somit die Aktivierung dieser Enzyme induzieren. Bei einem solchen hypothetischen Aktivierungsmechanismus lägen die tACs im inaktiven Zustand weitgehend in monomerer Form vor, woraus eine bedeutend geringere Basalaktivität der Proteine in Abwesenheit von Effektormolekülen resultieren würde. Dennoch sollte die partielle Immobilisierung im Membrankontext und die damit verbundene zweidimensionale Diffusion in entsprechenden Regionen der Zytoplasmamembran eine schnelle Assoziation und eine daraus resultierende Aktivierung begünstigen.

5.5 Die aktive Oberfläche der tACs und ihre Implikationen für den Katalysemechanismus von Nukleotidzyklasen

Bei Untersuchungen der Stereoselektivität der ATP-Zyklisierungsreaktion wurde eine Inversion der Konfiguration am γ -Phosphat ohne das Auftreten eines Phosphoenzym-Intermediats nachgewiesen (Koch *et al.*, 1990). Dies stützt die Theorie einer nach einem S_N2 -Mechanismus verlaufende Zyklisierungsreaktion, bei der ein direkter nukleophiler Angriff der 3'-Hydroxyfunktion der Ribose auf das γ -Phosphat erfolgt. Allgemein kann eine nach einem S_N2 -Mechanismus verlaufende Reaktion durch Steigerung der Nukleophilie des Substituenten, Stabilisierung des pentavalenten Übergangszustands und Kompensation der entstehenden Ladung der Abgangsgruppe eine Katalyse erfahren. Die Aufklärung des Mechanismus der

Adenylatzyklisierungsreaktion auf molekularer Ebene war bisher jedoch nicht möglich, da die für eine eindeutige Identifikation und Lokalisation der an der Katalyse beteiligten Reste benötigten Strukturinformationen nicht ausreichen. So kann z.B. aufgrund der niedrigen Auflösung und der hohen Anisotropie bisheriger Daten für Strukturen des C1C2-Heterodimers mit gebundenen Substratanaloga keine Aussage über die etwaige Rolle katalytisch essentieller Wassermoleküle im aktiven Zentrum gemacht werden, denen bei Hydrolysereaktionen an Nukleotidphosphaten, wie z. B. bei der durch trimere G-Proteinen katalysierten GTP-Hydrolyse (Coleman *et al.*, 1994; Sondek *et al.*, 1994) durchaus eine essentielle Funktion zukommen kann.

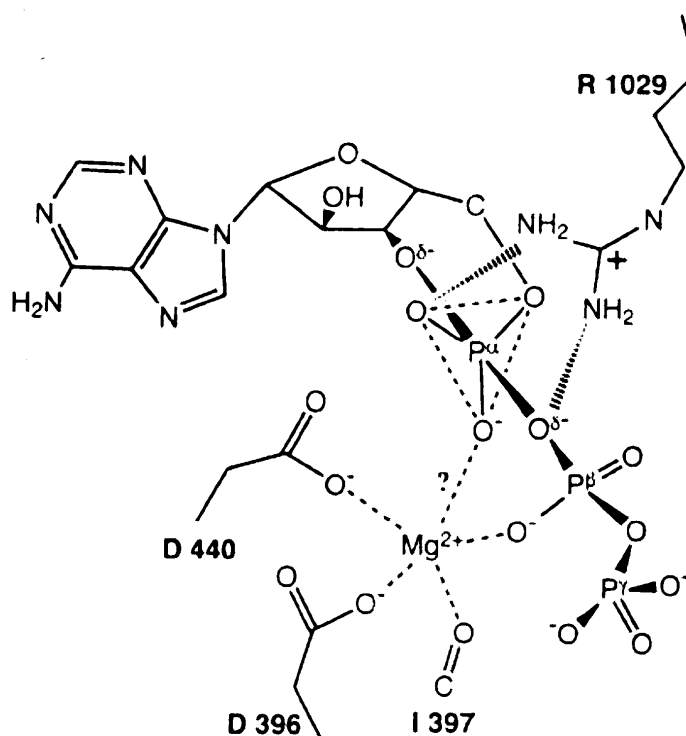


Abbildung 31: Modell des während der Zyklisierungsreaktion am γ -Phosphat ausgebildeten pentavalenten Übergangszustands (Tesmer & Sprang, 1998). Dieses Modell stützt sich sowohl auf die Daten der C1-C2-Strukturen mit einer Reihe von Nukleotidanaloga als auch auf Mutagenesestudien (Tesmer *et al.*, 1997). Diesem Mechanismus zufolge erfolgt die Stabilisation des am γ -Phosphat ausgebildeten pentavalenten Übergangszustandes durch das essentielle R1029 und wahrscheinlich durch das an der Metallbindungsstelle koordinierte Magnesiumion (mit ? markierte Wechselwirkung). Desweiteren trägt das Magnesiumion durch Kompensation der negativen Ladungsdichte am Phosphatrückgrat zu einer Stabilisation der während der Substitutionsreaktion freiwerdenden Abgangsgruppe Pyrophosphat bei. Jüngere strukturelle Studien konnten deutlich die Anwesenheit eines zweiten Metallions im katalytischen Zentrum zeigen, das in der hier gezeigten Darstellung nicht auftaucht (Tesmer *et al.*, 1999). Dies macht deutlich wie unvollständig die bisherigen Informationen bezüglich des Katalysemechanismus der Zyklisierungsreaktion ist.

Es war jedoch möglich mit der Strukturinformation der C1C2-Struktur im Komplex mit Nukleotidanaloga und den Informationen aus Mutagenesestudien einen Großteil der strukturellen Elemente, die für Substraterkennung und Katalyse wichtig sind, zu identifizieren (Abb. 31). Desweiteren bestätigten jüngere strukturelle Daten von Säuger AC-Domänen mit nicht hydrolysierbaren Substratanaloga bestätigten die bereits aufgrund kinetischer Daten entstandene Vermutung einer ``Zwei-Metallionen``-Katalyse (Zimmermann *et al.*, 1998; Tesmer *et al.*, 1999), wobei das zweite Metallion nicht an Seitenketten im katalytischen Zentrum sondern ausschließlich von den Phosphaten des Substrates koordiniert ist.

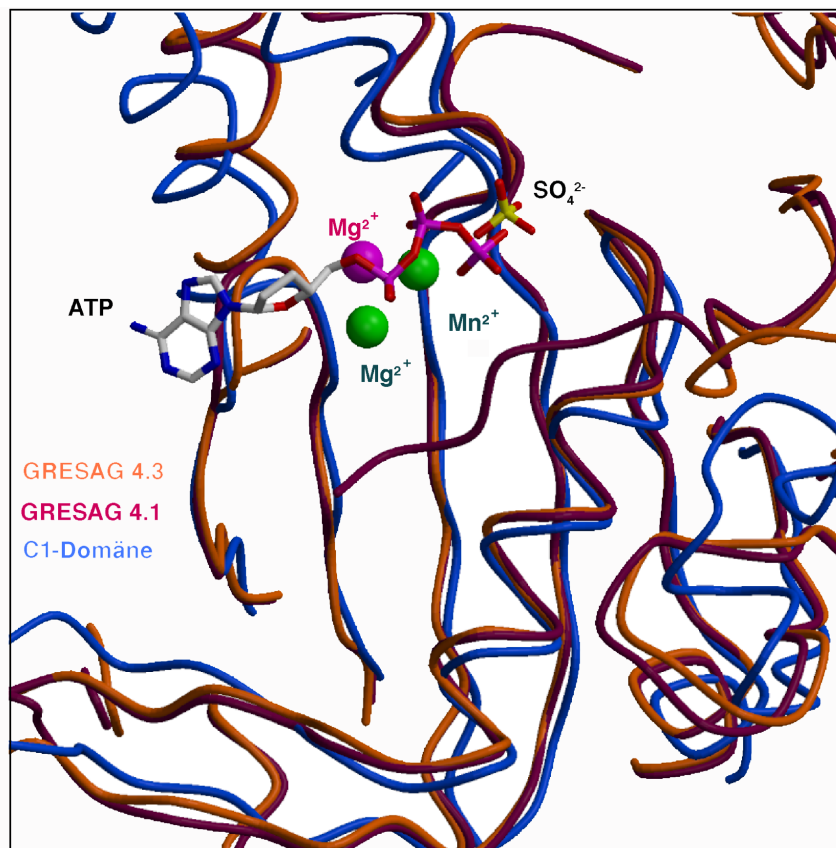


Abbildung 32: Überlagerung der Strukturen der AC-Domänen von GRESAG4.1 und GRESAG4.3 mit der C1-Domäne der Klasse I ACs. In der Überlagerung hat das in der GRESAG4.3 Struktur gebundene Magnesium einen Abstand von 2.0 Å zu dem Magnesium in der C1-Struktur. Das in der GRESAG4.1-Struktur gebundene Sulfat hat einen Abstand von 2.8 Å zum γ -Phosphat des in der C1-Struktur gebundenen Nukleotidanalogs. Desweiteren zeigen die Sekundärstrukturelemente der katalytischen Oberfläche in allen drei AC-Domänen eine sehr ähnliche Orientierung, während weiter entfernte Regionen deutlichere strukturelle Unterschiede aufweisen.

Das in Kap. 4.1.4 vorgestellte, anhand von Sequenzhomologien erstellte Mutageneseprofil der

ACs auf. Entsprechend konnte in einer Überlagerung der AC-Domänen von GRESAG4.1 bzw. GRESAG4.3 auf die C1-Domäne der Klasse I ACs eine hohe strukturelle Ähnlichkeit im Bereich der katalytischen Oberfläche beobachtet werden, während entferntere Regionen deutlichere Abweichungen aufwiesen (Abb. 32). Desweiteren weisen die in den Strukturen lokalisierten Magnesiumionen in der Überlagerung eine Distanz von 2.0 Å auf, während das in der GRESAG4.1 Struktur lokalisierte Sulfation lediglich 2.8 Å von der γ -Phosphorylgruppe des Substratanalogons ATP S in der C1C2 Struktur entfernt ist (Abb. 32). Diese Daten lassen zweifelsohne auf eine nahezu identische Ausbildung der katalytischen Zentren und damit verbunden einem gleichartigen Katalysemechanismus beider AC-Klassen schließen. Die hohe Neigung der tACs in der monomeren Form zu kristallisieren unterband jeglichen Versuch der Cokristallisation einer dimeren tAC-Spezies in Gegenwart von Nukleotidanaloga. Jedoch konnten auf aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit der katalytischen Reste im GRESAG4.1-Homodimer, die Substratmoleküle in die beiden katalytischen Zentren in der Interfaceregion auf der Grundlage eines früheren Modell des Substrats ATP in der C1C2 Struktur ohne das Auftreten sterischer Interferenzen modelliert werden (Tesmer et al., 1997; Tesmer et al., 1999; Abb. 33). Die hohe Distanz der beiden im modellierten tAC AC-Homodimer gebundenen Substratmoleküle (die Minimaldistanz beträgt 10 Å zwischen den beiden ATP-Molekülen), ebenso wie die in Kap. 4.1.2.1 kalkulierten Hill-Koeffizienten lassen darauf schließen, daß keine Kommunikation zwischen den katalytischen Zentren erfolgt.

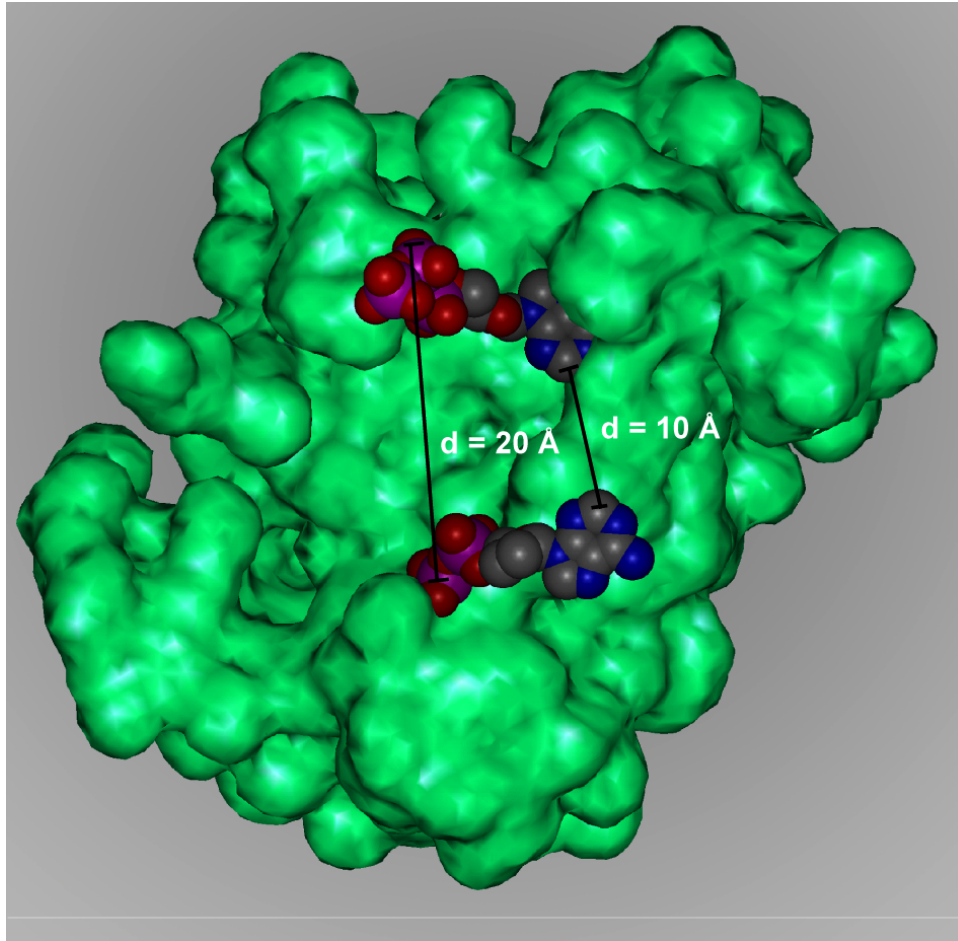


Abbildung 33: Aufsicht auf die katalytische Oberfläche der GRESAG4.1 AC-Domäne. Die beiden auf der Grundlage der C1-C2-Struktur modellierten Substratmoleküle sind als Kalottenmodelle dargestellt.

In dem modellierten tAC-ATP Komplex wird die terminale γ -Phosphatgruppe des ATPs durch die beiden Reste, die im GRESAG4.1-Sulfat-Komplex an der Sulfatbindung beteiligt waren (R1010 und R1103), gebunden. Für das zu R1010 homologe, ebenfalls auf 4 lokalisierte R484 der Säuger C1-Domäne konnte eine Interaktion mit der γ -Phosphatgruppe des ATP S gezeigt werden (Tesmer et al., 1997; Tesmer et al., 1999). Das auf dem C-terminalen Strang lokalisierte Arginin R1103 kann jedoch lediglich bei den tAC AC-Domänen nahe dem γ -Phosphat platziert werden, da hier der C-Terminus gut geordnet zwischen 9 und der helikalen Subdomäne, wie in Kap. 5.4 dargestellt, packt, während in der Struktur des C1-C2-Heterodimers die gleiche Region ungeordnet vorliegt. Ein Vergleich der kinetischen Daten der Punktmutante R1103A der GRESAG4.1 AC-Domäne mit denen des Wildtypproteins (Kap. 4.1.4) zeigte keinen deutlich

Bindung des γ -Phosphats an R1103. Neben dieser direkten ionischen Wechselwirkung mit dem γ -Phosphat liefert das Dipolmoment der Helix 1, deren N-Terminus lediglich 6.3 Å entfernt und direkt auf das Sulfation bzw. das γ -Phosphat orientiert ist, einen wichtigen Beitrag zur Ladungskompensation am Phosphatrückgrat und damit zur Stabilisation der Abgangsgruppe. Die korrekte Orientierung der Helix 1 relativ zum γ -Phosphat wird durch einen hochkonservierten γ -Knick (I908-S911), der den C-Terminus von 1 mit 1 verbindet, kontrolliert. In DNA-Polymerasen existiert eine korrespondierende Helix mit der gleichen ladungskompensierenden Funktion, die ebenfalls durch einen γ -Knick eines vorausgehenden γ -Stranges in ihrer Orientierung fixiert wird. Somit ist dieses Strukturmerkmal neben den in Kap. 5.3 aufgezeigten strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten ein weiteres Indiz für eine über die strukturelle Verwandtschaft hinausgehende Homologie zwischen ACs und DNA-Polymerasen.

In dem modellierten tAC-ATP Komplex sind die konservierten Reste der Adenosin-Bindungsregion ähnlich wie in der C1C2 Struktur angeordnet ist, weshalb in beiden Strukturen eine gleichartige Koordination des Adenosingerüsts erfolgt. Trotzdem unterscheiden sich tACs und Klasse I ACs stark in ihrem Verhalten auf sogenannte P-Site Inhibitoren, die in Gegenwart von Mg^{2+} -Pyrophosphat mit hoher Affinität nichtkompetitiv in der Nukleotidbindungstasche der Klasse I ACs binden (Desaubry et al., 1996a; Desaubry et al., 1996b). Die in Kap. 4.1.2.4 beschriebenen Untersuchungen deuteten eine generelle Insensitivität der tAC AC-Domänen gegenüber P-Site Inhibitoren, wie 2'-Deoxyadenosin und seine 3'-Mono- oder Polyphosphat-Derivate an. Gleichmaßen wurde auch für bakterielle ACs von *Bordella pertussis* und lösliche ACs aus Spermien eine Insensitivität gegenüber P-site Inhibitoren beschrieben (Johnson & Shoshani, 1990). Wie die strukturellen Studien des C1C2-Heterodimers der Säuger ACs zeigten, besetzen P-Site Inhibitoren zusammen mit Mg^{2+} -Pyrophosphat das katalytische Zentrum in der gleichen Weise wie Nukleotidanaloga (Tesmer et al., 1997). In Forskolin und G_s aktivierten Klasse I ACs liegen die C1C2-Domänen in vorassoziiert Form vor, weshalb die

effizient anbinden können. Da im tAC Homodimer keine strukturellen Differenzen zu den Klasse I ACs hinsichtlich der Adeninbindungsregion selber auftreten, kann der Grund für ihre ausgesprochene Insensitivität gegenüber P-Site Inhibitoren nicht strukturell begründet sein. Vielmehr scheint die Ursache für die beobachtete Insensitivität in der deutlich verringerten Assoziationstendenz der tACs gegenüber den Klasse I ACs ihren Ursprung zu haben. In monomeren tAC AC-Domänen ist wohl die Anionenbindungsregion, nicht aber die Adeninbindungsregion präformiert, weshalb, wie in Kap. 4.1.2.4 dargestellt und strukturell gezeigt, diese Anionen effektiv zu binden vermögen, nicht aber P-Site Inhibitoren, für deren Bindung es einer korrekt ausgebildeten Adeninbindungstasche bedarf.

5.6 Die D-DTT Bindungsstelle - ein Fall von molekularer Mimikry?

Klasse I Adenylatzyklen und retinale Guanylatzyklen werden durch die stimulatorischen Proteine G_s und das Guanylatzyklase aktivierende Protein (GCAP) stimuliert, wobei in beiden Fällen die bedeutendsten Interaktionen mit dem Aktivatorprotein an der 3- 4-Schleife eines Monomers der dimeren Nukleotidzyklen stattfinden (Sokal et al., 1999; Yan et al., 1996). In der Region der 3- 4-Schleife weisen die tACs die auffälligsten topologischen Differenzen zu anderen Nukleotidzyklen auf (Abb. 25); bei ihnen ist die in den trypanosomalen Klasse II ACs von *T. brucei* und *L. donovani* hochkonservierte -Subdomäne bestehend aus den beiden Helices 3A (A982-R994) und 3B (P1010-L1016) lokalisiert. Dieses Strukturelement zeichnet sich durch eine hohe negative Partialladung verglichen mit der Ladungsverteilung der restlichen Proteinoberfläche aus (Abb. 34).

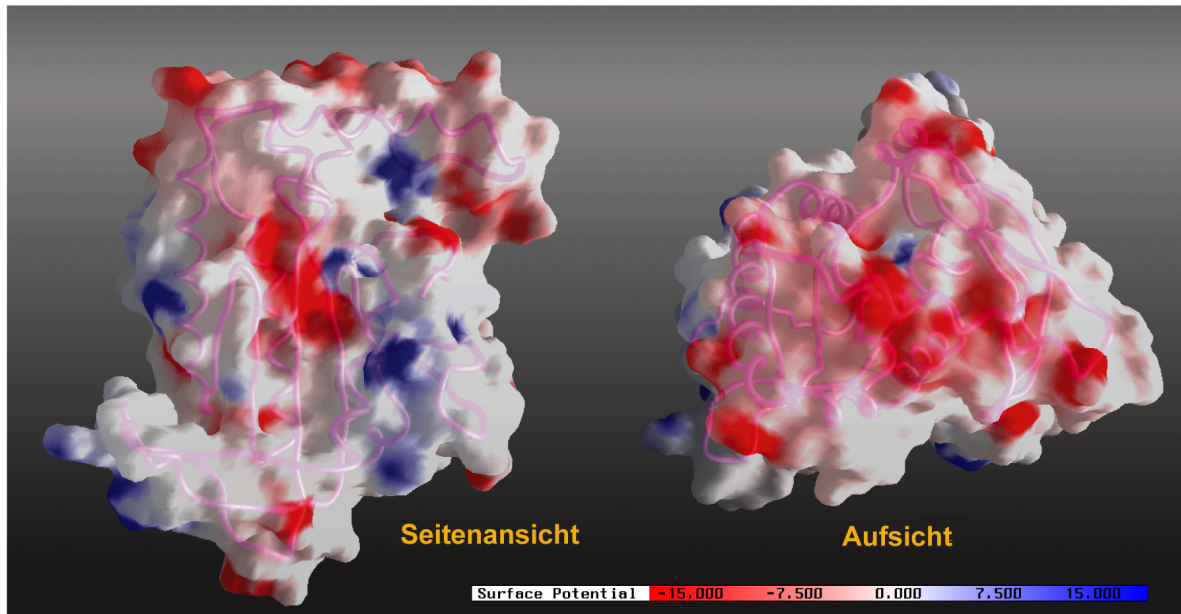


Abbildung 34: Darstellung der Oberflächenpotentialverteilung der AC-Domäne von GRESAG4.1 (Oberflächenregionen mit negativer Partialladung sind durch Rotfärbung, mit positiver Partialladung durch Blaufärbung gekennzeichnet, das Oberflächenpotential ist in kcal/mol angegeben). Links ist die Seitenansicht mit direktem Blick auf die katalytische Oberfläche der Palm-Domäne dargestellt. Rechts ist die Aufsicht auf die -Domäne dargestellt, die sich deutlich durch ihre hohe negative Partialladung gegenüber den übrigen Proteinoberflächen abhebt.

Die in allen tAC Strukturen gleichgeartete Orientierung dieses Strukturelements weist auf eine hohe Ordnung dieser Subdomäne hin, wie auch durch die niedrigen B-Faktoren in dieser Region angedeutet wird. Die gerade an einer Stelle auftretende Insertion, an der andere Nukleotidzyklasen mit ihren Effektoren wechselwirken, sowie die Besonderheit der DTT-Bindung direkt unterhalb dieser Region (Abb. 35) legt die Vermutung einer ligandenvermittelten regulativen Funktion der -Subdomäne nahe.

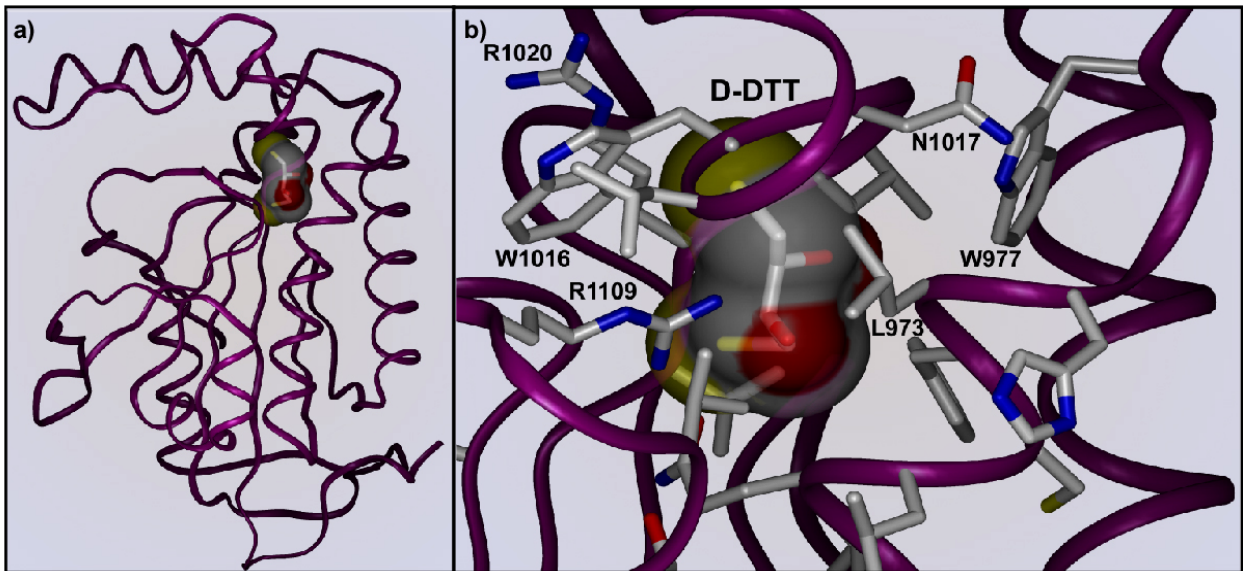


Abbildung 35: a) Darstellung der AC-Domäne von GRESAG4.1 mit der unterhalb der α -Domäne lokalisierten 95 Å³ großen Kavität (halbtransparente Darstellung) und dem darin gebundenen D-DTT Molekül (ball and stick Darstellung). b) Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Proteinregion um die Kavität herum, wobei die Unzugänglichkeit zur Proteinoberfläche deutlich wird. Das D-DTT Molekül in der Kavität bildet eine Vielzahl von Bindungen zum die Kavität umgebenden Peptidrückgrat aus. Lediglich die Seitenketten von R1109 und Q969 bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit dem D-DTT Molekül aus.

Es ist anzunehmen, daß die α -Subdomäne in Lösung eine erhöhte Flexibilität aufweist, was es einem zytosolisch lokalisierten Liganden ermöglicht leicht diffusiv in die Kavität unterhalb der α -Subdomäne zu gelangen und ähnlich dem vorgefundenen DTT Molekül zu binden. Dies hätte eine mögliche Fixierung der α -Subdomäne in einer für die Katalyse günstigen Orientierung zufolge, wie sie der in den tAC-Strukturen vorgefunden wird. Ein physiologischer Ligand könnte der niedermolekulare *cell density factor* (SIF) sein, eine polare niedermolekulare Verbindung mit bisher unbekannter Struktur, deren cAMP-vermittelte zelltransformierende Wirkung in *T. brucei* bekannt ist (Vassella et al., 1997). Ein putativer Wirkmechanismus wäre die enge Kopplung der ligandenvermittelten Fixierung der α -Subdomäne mit der Verkipfung der Helix 1 und der damit verbundenen optimalen Ausrichtung ihres Dipolmoments für die beschriebene Stabilisation der negativen Ladung der Abgangsgruppe. Insgesamt sprechen die strukturellen Beobachtungen dafür, daß es sich bei der α -Subdomäne und der darunter befindlichen Kavität um eine allosterische Bindestelle handeln könnte, zumal die scheinbar hochspezifische D-DTT

dieser Region schließen läßt. Es gibt zum jetzigen Zeitpunkt keine konkreten Informationen über Struktur und Verbindungstyp eines allosterischen Liganden der tACs. Auch der hierfür in Frage kommende SIF ist strukturell völlig unbekannt und nicht isolierbar. Dies erschwert erheblich die Suche, nach physiologisch relevanten hypothetischen Aktivatoren der tACs, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine spezifische Aktivierung der tACs zeigen müssten, um die Hypothese einer allosterisch vermittelten Regulation zu stützen.

5.7 Hypothese einer metabolisch gekoppelten konstitutiven Regulation der tAC Aktivität

Eine Reihe zellbiologischer Untersuchungen verifizierten die regulative Funktion der tACs auf den parasitären Lebenszyklus (Naula & Seebeck, 2000). Dabei konnte eine G-Protein gekoppelte Regulation der Enzyme in einer Reihe von Untersuchungen ausgeschlossen werden, zumal der Parasit keine Gene für G-Protein gekoppelte Rezeptoren aufweist (Rolin et al., 1996). Dies legt die Vermutung einer ligandeninduzierten Steuerung der tACs nahe, wobei eine Ligandeninteraktion sowohl an der extrazellulären Region, analog zu den membrangebundenen Guanylatzyklasen, als auch intrazellulär an der trypanosomalen variablen Domäne bzw. der AC-Domäne erfolgen kann. Jüngste P-NMR und elektronenmikroskopische Studien an Zellrohlysaten bzw. intakten trypanosomalen Zellen offenbarten die Gegenwart von Vakuolen, die aufgrund ihres niedrigen pH-Werts und hohen Ca^{2+} -Gehaltes Azidocalcisomen genannt werden (Urbina *et al.*, 1999). Azidocalcisomen zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an unlöslichen Calcium-, Magnesium- und Zink-Pyrophosphatsalzen mit unbekannter Stöchiometrie aus. Der Pyrophosphatgehalt der Zellen sowohl in der prozyklischen im Insekt lebenden, als auch in der Blutstromform des Parasiten ist derart hoch, daß die Pyrophosphat-Konzentration 6-10-fach über der zellulären ATP-Konzentration liegt (Urbina et al., 1999). Während Pyrophosphat lange Zeit für ein Nebenprodukt enzymatischer Reaktionen gehalten wurde, sind inzwischen mehrere pyrophosphatabhängige Enzyme identifiziert worden.

anstelle von ATP Pyrophosphat metabolisieren (Mansurova, 1989). In der Membran der Azidocalcisomen liegen V-Typ- H^+ -PPasen vor, die unter Pyrophosphathydrolyse einen Protonengradienten an der Azidocalcisomenmembran aufbauen, dessen Existenz für den trypanosomalen Parasiten essentiell, dessen genaue Funktion jedoch bisher unbekannt ist (Rodrigues *et al.*, 1999). Die in Kap. 4.1.2.4 beschriebenen Untersuchungen machten eine Sensitivität der tACs gegenüber den anorganischen Ionen Sulfat und Phosphat, vor allem aber Pyrophosphat deutlich. Die hohe Pyrophosphat-Sensitivität der tACs wurde bereits früher bei Untersuchungen der tACs in Membranfraktionen beobachtet, bei denen ein IC_{50} -Wert für Pyrophosphat von 135 μM ermittelt wurde (Martin *et al.*, 1978), und konnte auch bei den rekombinant dargestellten AC-Domänen beobachtet werden (Kap. 4.1.2.4). Desweiteren kann bei den tACs, wie in Kap. 5.4 dargelegt, bereits im monomeren Zustand eine Anionenbindung erfolgen, die mit einer späteren Substratbindung konkurriert.

Aufgrund dieser Befunde kann eine einfache Hypothese für die Regulation der AC-Aktivität und die damit verbundene Steuerung der Transformation postuliert werden: Eine hohe Konzentration an Pyrophosphat im Zytosol bedingt eine konstitutive Inhibition der AC-Aktivität. Die Abnahme der zytosolischen Pyrophosphatkonzentration führt zu einer Aktivierung der ACs was die Transformation der Parasiten einleitet (Abb. 36).

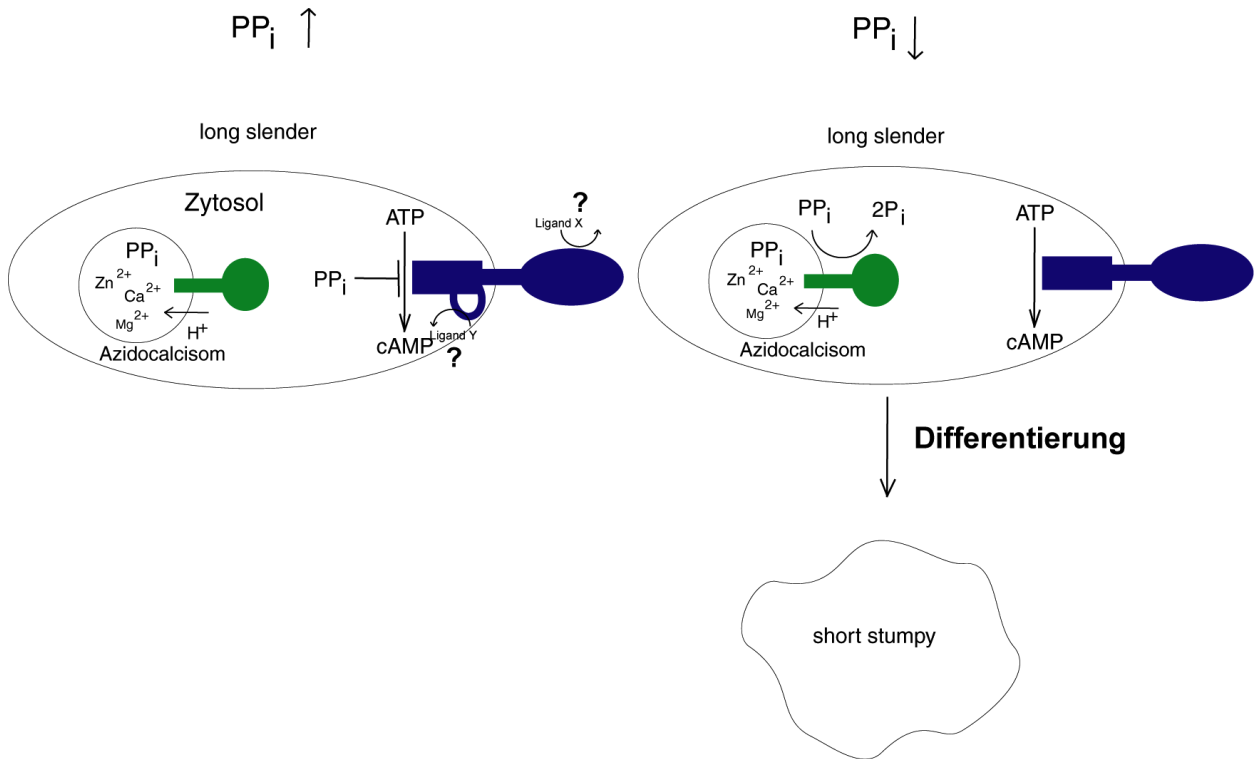


Abbildung 36: Schematische Darstellung eines hypothetischen Regulationsmechanismus der tACs über metabolische Kopplung. Eine hohe Pyrophosphatkonzentration im Zytosol bedingt eine konstitutive Inaktivierung der tACs. Sinkt die Pyrophosphatkonzentration aufgrund von Variationen im Metabolismus, so führt dies zu einer Aktivierung der tACs, wodurch die Transformation eingeleitet wird. Bei dieser Hypothese sind weitere putative Regulationsmechanismen (angedeutet durch ?) über an der extrazellulären Domäne oder der –Domäne wirkende Effektoren, die eine komplexe Steuerung der tAC-Aktivität ermöglichen, nicht auszuschließen.

Eine solche metabolisch gekoppelte Adenylatzyklaseaktivität, würde dem Parasiten eine permanente Kontrolle der Umgebungsbedingungen ermöglichen und entsprechend bei Verschlechterung derselben eine rasche Induktion der Zelltransformation. Metaboliten-regulierte Adenylatzyklasen wurden bereits mehrfach sowohl für prokaryontische als auch eukaryontische Zellen beschrieben (Chen *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 1975; Peters *et al.*, 1991). Um von der hier aufgestellten Hypothese einer metabolischen Regulation der tACs auf den tatsächlichen Regulationsmechanismus schließen zu können bedarf es noch einer Reihe weiterer Untersuchungen *in vivo*, die eine Korrelation zwischen der zytosolischen Pyrophosphatkonzentration und der Adenylatzyklase Aktivität aufzeigen. Desweiteren ist in dem dargestellten Regulationsschema der PDE1 keine Funktion zugeordnet worden, da ihre Regulation und Aufgabe bisher ungeklärt ist. Es kann aber davon ausgegangen werden, daß

Trypanosomen zukommt.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit ist darauf ausgerichtet am Beispiel der trypanosomalen Klasse II Adenylatzyklasen ESAG4, GRESAG4.1 und GRESAG4.3 eine Reihe grundlegender Postulate hinsichtlich der Regulation und Funktionsweise von Nukleotidzyklasen zu überprüfen. Bisher wurden allgemeine strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Nukleotidzyklasen von der C1-C2 Struktur der Klasse I ACs abgeleitet, wobei aufgrund der geringen Auflösung und Qualität vorliegender Strukturen nur begrenzte Aussagen möglich waren. Die strukturelle Aufklärung der AC-Domänen der trypanosomalen Klasse II Adenylatzyklasen GRESAG4.1 und GRESAG4.3 sowie ihre grundlegende biochemische und enzymologische Charakterisierung ermöglicht es, geltende Postulate an einer weiteren, bisher weit weniger gut untersuchten, AC-Klasse zu überprüfen und auf diese auszuweiten.

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Struktur- und Mutagenesestudien wird gezeigt, daß der bisher für Klasse I ACs postulierte Katalysemechanismus für beide AC-Klassen gleichermaßen gültig ist und, konform mit den geltenden Postulaten, die dimere Form der tACs die katalytisch aktive Spezies ist. Jedoch weisen diese Enzyme gegenüber den Klasse I ACs deutliche Unterschiede im Assoziationsverhalten auf, die auf einen andersgearteten Regulationsmechanismus schließen lassen.

Einen möglichen Ansatz zur Aufklärung des Regulationsmechanismus der trypanosomalen Enzyme liefert die Beobachtung eines in der GRESAG4.1-Struktur fest gebundenen D-DTT-Moleküls in einer Region, die den deutlichsten topologischen Unterschied der tACs zu anderen ACs darstellt. Dies legt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um eine allosterische Bindungsregion handelt, die in einer Art molekularem Mimikry von D-DTT besetzt wird.

Einen weiteren Ansatz zur Aufklärung der Regulationsmechanismen der tACs liefert die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese einer direkten Kopplung der tACs mit dem Metabolismus des Parasiten. Diese Hypothese beruht auf der auffällig hohen Sensitivität der tACs gegenüber

Parasiten zukommt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen können Ansätze für die Aufklärung der Funktion und Regulation der tACs liefern, die aufgrund ihrer Schlüsselfunktion im Parasiten geeignete Objekte für die Entwicklung neuer pharmakologischer Ansätze darstellen.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
AC	Adenylatzyklase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
bidest.	bidestilliert
cAMP	zyklisches 3', 5'-Adenosinmonophosphat
cpm	counts per minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Mischung aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESAG	expression site-associated antigen
FPLC	Fast Pressure Liquid Chromatography
GC	Guanylatzyklasen
GRESAG	genes related to esag
GST	Glutathion S-transferase
GPI	Glycosylphosphatidyl-Inositol
DTBP	Dimethyl-3,3'-Dithiopropionimidat
Ig	Immunglobulin
IMAC	immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
Kan	Kanamycin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MW	Molekulargewicht
MCS	multiple cloning site
NBT	Nitroblautetrazolium
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PPS	"Phosphate buffered saline"

PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylen-sulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> als Einheit einer Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
VSG	<i>variant surface glycoprotein</i>

7.2 Sparse Matrix Screening

Screen I

1. 0.02 M Calcium Chloride dihydrate	1. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	1. 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
2. None	2. None	2. 0.4 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate
3. None	3. None	3. 0.4 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
4. None	4. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	4. 2.0 M Ammonium Sulfate
5. 0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	5. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	5. 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
6. 0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	6. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	6. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000
7. None	7. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	7. 1.4 M Sodium Acetate trihydrate
8. 0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	8. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	8. 30% v/v iso-Propanol
9. 0.2 M Ammonium Acetate	9. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	9. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000
10. 0.2 M Ammonium Acetate	10. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	10. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000
11. None	11. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	11. 1.0 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
12. 0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	12. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	12. 30% v/v iso-Propanol
13. 0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	13. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	13. 30% v/v Polyethylene Glycol 400
14. 0.2 M Calcium Chloride dihydrate	14. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	14. 28% v/v Polyethylene Glycol 400
15. 0.2 M Ammonium Sulfate	15. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	15. 30% w/v Polyethylene Glycol 8000
16. None	16. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	16. 1.5 M Lithium Sulfate monohydrate
17. 0.2 M Lithium Sulfate monohydrate	17. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	17. 30% Polyethylene Glycol 4000
18. 0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	18. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	18. 20% Polyethylene Glycol 8000
19. 0.2 M Ammonium Acetate	19. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	19. 30% v/v iso-Propanol
20. 0.2 M Ammonium Sulfate	20. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	20. 25% w/v Polyethylene Glycol 4000
21. 0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	21. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	21. 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
22. 0.2 M Sodium Acetate trihydrate	22. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	22. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000
23. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	23. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	23. 30% v/v Polyethylene Glycol 400
24. 0.2 M Calcium Chloride dihydrate	24. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	24. 20% v/v iso-Propanol
25. None	25. 0.1 M Imidazole pH 6.5	25. 1.0 M Sodium Acetate trihydrate
26. 0.2 M Ammonium Acetate	26. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	26. 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
27. 0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	27. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	27. 20% v/v iso-Propanol
28. 0.2 M Sodium Acetate trihydrate	28. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	28. 30% w/v Polyethylene Glycol 8000
29. None	29. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	29. 0.8 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate
30. 0.2 M Ammonium Sulfate	30. None	30. 30% w/v Polyethylene Glycol 8000
31. 0.2 M Ammonium Sulfate	31. None	31. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000
32. None	32. None	32. 2.0 M Ammonium Sulfate
33. None	33. None	33. 4.0 M Sodium Formate
34. None	34. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	34. 2.0 M Sodium Formate
35. None	35. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	35. 0.8 M mono-Sodium dihydrogen phosphate/0.8 M mono-Potassiumdihydrogen phosphate
36. None	36. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	36. 8% w/v Polyethylene Glycol 8000
37. None	37. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	37. 8% w/v Polyethylene Glycol 4000
38. None	38. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	38. 1.4 M tri-Sodium Citrate dihydrate
39. None	39. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	39. 2% v/v Polyethylene Glycol 400, 2.0 M Ammonium Sulfate
40. None	40. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	40. 20% v/v iso-Propanol, 20% w/v Polyethylene Glycol 4000
41. None	41. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	41. 10% v/v iso-Propanol, 20% w/v Polyethylene Glycol 4000
42. 0.05 M mono-Potassium dihydrogen Phosphate	42. None	42. 20% w/v Polyethylene Glycol 8000
43. None	43. None	43. 30% w/v Polyethylene Glycol 1500
44. None	44. None	44. 0.2 M Magnesium Formate
45. 0.2 M Zinc Acetate dihydrate	45. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	45. 18% w/v Polyethylene Glycol 8000
46. 0.2 M Calcium Acetate hydrate	46. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	46. 18% w/v Polyethylene Glycol 8000
47. None	47. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	47. 2.0 M Ammonium Sulfate
48. None	48. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	48. 2.0 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
49. 1.0 M Lithium Sulfate monohydrate	49. None	49. 2% w/v Polyethylene Glycol 8000
50. 0.5 M Lithium Sulfate monohydrate	50. None	50. 15% w/v Polyethylene Glycol 8000

Screen II

1. 2.0 M Sodium chloride	1. None	1. 10% w/v PEG 6000
2. 0.01 M Hexadecyltrimethylammonium Bromide	2. None	2. 0.5 M Sodium Chloride, 0.01 M Magnesium Chloride hexahydrate
3. None	3. None	3. 25% v/v Ethylene Glycol
4. None	4. None	4. 35% v/v Dioxane
5. 2.0 M Ammonium Sulfate	5. None	5. 5% v/v iso-Propanol
6. None	6. None	6. 1.0 M Imidazole pH 7.0
7. None	7. None	7. 10% w/v Polyethylene Glycol 1000 10% w/v Polyethylene Glycol 8000
8. 1.5 M Sodium Chloride	8. None	8. 10% v/v Ethanol
9. None	9. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	9. 2.0 M Sodium Chloride
10. 0.2 M Sodium Chloride	10. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	10. 30% v/v MPD
11. 0.01 M Cobaltous Chloride hexahydrate	11. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	11. 1.0 M 1,6 Hexanediol
12. 0.1 M Cadmium Chloride dihydrate	12. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	12. 30% v/v Polyethylene Glycol 400
13. 0.2 M Ammonium Sulfate	13. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	13. 30% w/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 2000
14. 0.2 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate	14. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	14. 2.0 M Ammonium Sulfate
15. 0.5 M Ammonium Sulfate	15. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	15. 1.0 M Lithium Sulfate monohydrate
16. 0.5 M Sodium Chloride	16. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	16. 4% w/v Ethylene Imine Polymer
17. None	17. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	17. 35% v/v tert-Butanol
18. 0.01 M Ferric Chloride hexahydrate	18. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	18. 10% v/v Jeffamine M-600
19. None	19. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	19. 2.5 M 1,6 Hexanediol
20. None	20. 0.1 M MES pH 6.5	20. 1.6 M Magnesium Sulfate heptahydrate
21. 0.1 M Sodium dihydrogen phosphate mono	21. 0.1 M MES pH 6.5	21. 2.0 M Sodium Chloride
0.1 M mono-Potassium dihydrogen Phosphate		
22. None	22. 0.1 M MES pH 6.5	22. 12% w/v Polyethylene Glycol 20,000
23. 1.6 M Ammonium Sulfate	23. 0.1 M MES pH 6.5	23. 10% v/v Dioxane
24. 0.05 M Cesium Chloride	24. 0.1 M MES pH 6.5	24. 30% v/v Jeffamine M-600
25. 0.01 M Cobaltous Chloride hexahydrate	25. 0.1 M MES pH 6.5	25. 1.8 M Ammonium Sulfate
26. 0.2 M Ammonium Sulfate	26. 0.1 M MES pH 6.5	26. 30% w/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 5000
27. 0.01 M Zinc Sulfate heptahydrate	27. 0.1 M MES pH 6.5	27. 25% v/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 550
28. None	28. None	28. 1.6 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 6.5
29. 0.5 M Ammonium Sulfate	29. 0.1 M HEPES pH 7.5	29. 30% v/v MPD
30. None	30. 0.1 M HEPES pH 7.5	30. 10% w/v Polyethylene Glycol 6000, 5% v/v MPD
31. None	31. 0.1 M HEPES pH 7.5	31. 20% v/v Jeffamine M-600
32. 0.1 M Sodium Chloride	32. 0.1 M HEPES pH 7.5	32. 1.6 M Ammonium Sulfate
33. None	33. 0.1 M HEPES pH 7.5	33. 2.0 M Ammonium Formate
34. 0.05 M Cadmium Sulfate hydrate	34. 0.1 M HEPES pH 7.5	34. 1.0 M Sodium acetate
35. None	35. 0.1 M HEPES pH 7.5	35. 70% v/v MPD
36. None	36. 0.1 M HEPES pH 7.5	36. 4.3 M Sodium Chloride
37. None	37. 0.1 M HEPES pH 7.5	37. 10% w/v Polyethylene Glycol 8000, 8% v/v Ethylene Glycol
38. None	38. 0.1 M HEPES pH 7.5	38. 20% w/v Polyethylene Glycol 10,000
39. 0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	39. 0.1 M TRIS pH 8.5	39. 3.4 M 1,6 Hexanediol
40. None	40. 0.1 M TRIS pH 8.5	40. 25% v/v tert-Butanol
41. 0.01 M Nickel(II) Chloride hexahydrate	41. 0.1 M TRIS pH 8.5	41. 1.0 M Lithium Sulfate monohydrate
42. 1.5 M Ammonium Sulfate	42. 0.1 M TRIS pH 8.5	42. 12% v/v Glycerol anhydrous
43. 0.2 M mono Ammonium dihydrogen Phosphate	43. 0.1 M TRIS pH 8.5	43. 50% v/v MPD
44. None	44. 0.1 M TRIS pH 8.5	44. 20% v/v Ethanol
45. 0.01 M Nickel(II) Chloride hexahydrate	45. 0.1 M TRIS pH 8.5	45. 20% w/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 2000
46. 0.1 M Sodium Chloride	46. 0.1 M Bicine pH 9.0	46. 30% w/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 550
47. None	47. 0.1 M Bicine pH 9.0	47. 2.0 M Magnesium Chloride hexahydrate
48. 2% v/v Dioxane	48. 0.1 M Bicine pH 9.0	48. 10% w/v Polyethylene Glycol 20,000

Tabelle 10: *Sparse matrix screening* von Kristallisationsbedingungen

7.3 Aminosäuresequenzen

Die im folgenden aufgelisteten Aminosäuresequenzen wurden mittels Sequenzanalyse aus den in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide pET-gres4.1cyto, pET-gres4.3cyto, pET-es4cyto und pET-PDE1-(M1-T620) abgeleitet.

GRESAG4.1-(A884-Y1241):

```

1  SASGAERRNN NRAPKEPTDP VTLIFTDIES STALWAAHPD LMPDAVAHH
51  RMVRSLLIGRY KCYEVKTVGD SFMIASKSPF AAVQLAQELQ LCFLHHDWGT
101 NALDDSYREF EEQRAEGECE YTPPTAHMDP EVYSRLWNGL RVRVGIHTGL
151 CDIIRHDEVT KGYDYYGRTP NMAARTESVA NGGQVLMTHA AYMSLSAEDR

```


251 TTTSTSDHSS SRADVSESGQ IIATALQSLI STFKTAHREK LLLPYCERWR
 301 VPLPRKAASE WDDAYCEEVW RRIAVKVGRV ADHGADSGSE SSSTQGSSSI
 351 IIVPFYDMHL QEY*

GRESAG4.3-AC-Domäne :

1 LACFTLRGTR DNDSAPKEPT GPVTLIFTDI ESSTALWAAH PDLMPDAVAT
 51 HHRLIRSLIT RYECYEVKTV GDSFMIASKS PFAAVQLAQE LQLRFLRLDW
 101 ETNALDESYR EFEEQRAEGE CEYTPPTAHM DPEVYSRLWN GLRVRVGIHT
 151 GLCDIRYDEV TKGYDYYGRT SNMAARTESV ANGGQVLMTH AAYMSLSGED
 201 RNQLDVTTLG ATVLRGVPEP VRMYQLNAVP GRNFAALRLD RELFNDGEDE
 251 TTTSCSDHSS LRAELSIAAQ TIAASLQSLI GTFTPAQRQK ALTPFCERCQ
 301 VTLPRKMGHV WDNDSCQEVI RRIAAKVGHV VDRHAAETRE RSVCTLSSGS
 351 VIIISNDLSD MIRV*

ESAG4-(P897-R1269):

1 PVTLIFTDIE SSTALWAAHP EVMPDAVATH HRLIRTLISK YECYEVKTVG
 51 DSFMIASKSP FAAVQLAQEL QLCFLHHDWG TNAIDESYQQ FEQQRAEDDS
 101 DYTPTTARLD PKVYSRLWNG LRVVRVGIHTG LCDIRRDEVT KGYDYYGRTS
 151 NMAARTESVA NGGQVLMTHA AYMSLSAEER QQIDVTALGD VPLRGVPKPV
 201 EMYRLNAVPG RTFSVLRLEL ELLNDDDEDQTT TSCSDHSSS RTDLSVAAQT
 251 IAASLQSLIG TFTPQRQKA LIPFCERWRV PLPQKVGNVW DDDGCQEVVR
 301 RVAAKVGRVM DFGTRKPSSS VTSLERGGSV FSGGGAAAIM LASSSSSSCV
 351 DGHCVTVQLI DLENDSATTL ER*

PDEI-(M1-T620):

1 MLEALRKCPM MFAVTSKGSS TMAKMDNSAR QLALFVATTN GEFYQSNFGE
 51 EALETIKYQL GKDAGWGLFF DVLRFNFGN CVSILARSED TAHILCGKED
 101 CSEKSAICFP IQKTEEDTSA TILKCLVDAN AVYANPKEEK NKVQKIMEEL
 151 EKAKLQVRML EEEVRLCEN NIWRRKQDTK NTLKIGKLRD NISRLSNQIN
 201 PKAKEVSETS VGETSGPHAE DSYIPGRKLL RLVFEKKECK EYDVELLRLI
 251 KSRWPKTEGS KACNASNCLI DPTYESELPE RLSRMSKKHK MVWGTNLGLD
 301 DWDYNVFELQ AAIDGDDINC KNDQSGCGAL FITMYALVVK YGFLRKFEIN

401 RQVLAALFAA AIHDYNHPGI NNNFSILTQT YNATLYNDRS VLENMHVASV
451 FELMRNPALN ILACFSEEHW RDFRNTVIDM VLATDMSLHE KYMTQFKRRL
501 SEKRPFTEDC DQNLALAMAL KLADISNCCR PLPLYLKWSE RVSDEFYTQG
551 DRERSLGMSC SPFMDRQTPM IAEGQTSFIN YIFIPFLEVM AEFLPSMGFT
601 LGLAAVCKSH RLVGNTGQGT*